



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“ESTUDIO DE EXOSOMAS DE *Leishmania mexicana* Y SU EFECTO
INMUNOMODULADOR SOBRE MACRÓFAGOS”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
M. en C. LAURA ENEDINA SOTO SERNA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. INGEBORG D. BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. ANDRÉS E. CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA**

C.U. MÉXICO D.F.

FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“Un científico en su laboratorio no solo es un técnico, es también un niño
colocado ante fenómenos naturales que le impresionan
cual cuento de hadas”*

Marie Curie



Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por darme el privilegio de realizar mis estudios dentro de sus programas e instalaciones.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por haberme otorgado la beca (No. 270872) para realizar mis estudios en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. Agradezco al Programa UNAM-PAPIIT IG201221 y a CONACyT 6682 por el apoyo recibido para realizar este trabajo de investigación.

A la Dra. Ingeborg D Becker Fauser, mi directora de tesis, porque me abrió las puertas del laboratorio de inmunoparasitología permitiéndome adentrarme en este hermoso camino, la investigación.

A mi comité tutorial: Dra. Gladis Fragoso González y el Dr. Andrés E. Castell Rodríguez por sus acertadas observaciones, por sus adecuadas sugerencias, el tiempo que dedicaron en la revisión y evaluación de este trabajo.

A mi jurado: la Dra. María Fernández Presas, la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, el Dr. Enrique Ortega Soto y el Dr. Armando Pérez Torres por el tiempo que dedicaron en la revisión de este trabajo y las observaciones que me brindaron para enriquecerlo.

A los doctores, Jaime Zamora Chimal y Edith A. Fernández Figueroa por llevarme de la mano durante mi camino del Doctorado, guiarme con las metodologías, enseñarme técnicas y apoyarme con las metodologías empleadas durante este proyecto. A la Bióloga Mariana Diupotex por su apoyo con la realización de técnicas y análisis de datos.

A las Doctoras Ma. Magdalena Aguirre G. y Alma Reyna Escalona Montaña por el apoyo con los materiales y reactivos utilizados para los westerns blot, por compartirme sus conocimientos sobre fosfatasas (PP2C) siempre de la mejor manera y abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Adriana Méndez Bernal por su apoyo en la técnica y las microfotografías de microscopía electrónica de los exosomas, por permitirme aprender de usted y buscar siempre opciones.

A Rocely Cervantes Sarabia por su apoyo con los cultivos de parásitos y las curvas de crecimiento, gracias por enseñarme, por la paciencia y consejos, a Adriana Ruiz Remigio y Arturo Wilkins por enseñarme a realizar la cuantificación de nitritos y compartirme sus conocimientos.

Al Dr. José Sotero Delgado por su apoyo con la purificación de la gp63 que fue utilizada para los westerns blot y demás experimentos.



Al Dr. J. Francisco Martínez Aguilar por su guía, recomendaciones y apoyo con la parte de proteómica del proyecto.

A todos los técnicos del laboratorio de inmunoparasitología la Dra. Norma Suazo Salaiza, el Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes e Isabel Cristina Castañeda que contribuyeron directa o indirectamente en este proyecto.

A mis amigos Aarón Rodríguez Caballero, Berenice González Rete y Diego M. Coria Paredes por compartirme sus conocimientos, por su apoyo, sus consejos y tiempo de esparcimiento. A Roció A. Ruiz Manzano por sus consejos y sugerencias.

A los compañeros que tuve durante mi estancia en el laboratorio: Raquel Torres, Lucia Villalva, Claudia Pedraza, Ronna Delgado, Diana Laura porque durante el desarrollo de la tesis me brindaron apoyo moral o activo siempre.

Gracias totales



Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi hija “Camille”, esperando entienda que si me perdí algún momento importante de su corta vida o desarrollo fue por alcanzar una de mis metas, porque muchas de mis ausencias fueron para poder desarrollar este proyecto. Gracias hija, porque a pesar de eso me sigues bendiciendo con tu amor.

A mi hermano Jesús Brandon Soto Serna, por todo el soporte brindado para seguir superándome, por tu tiempo y tu paciencia en el cuidado de mi hija mientras no estaba yo, por que siempre has velado por ella sobretodo en mis ausencias; a mi hermana Mariana Soto Serna por escucharme y aconsejarme, por ser una gran tía para mi hija, por distraerla y divertirla, pero sobretodo por todo tu apoyo.

A mi madre por ser mí apoyo incondicional, por que decidió impulsarme a lograr este proyecto de manera desinteresada, por siempre darme motivación. Por ayudarme con las responsabilidades para con mi hija cuando llegue a ausentarme, jamás tendré como pagarte por todo. Porque simplemente sin tu ayuda no lo hubiera logrado.

A todas las personas que me quieren sinceramente y que realmente valoran mi amistad, que me ayudan en todo momento.

Con cariño y agradecimiento infinito.

Laura



Abreviaturas

AP-1: Proteína activadora 1

B10R: Línea celular de macrófagos murinos B10R

C/EBP: $-\beta$ CCAAT/enhancer-binding protein beta

CD1d: Glicoproteína presentadora de antígenos CD1d

CD4: Linfocitos CD4 cooperadores

CD63: Tetraspanina CD63

CD8: Linfocitos CD8 citotóxicos

CD86: Molécula coestimuladora CD86

CD9: Tetraspanina CD9

CIITA: Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II

CPA: Célula presentadora de antígeno

EF-1 α : Factor de elongación 1 α

aExo: Exosomas de amastigotes de *L. mexicana*

FTs: Factores de transcripción

GFP: Proteína verde fluorescente

GLPS: Glicolípidos

Gp63: Glicoproteína de 63 kDa (metaloproteasa dependiente de Zn)

HSP100: Proteína de choque térmico de 100 kDa

HSP70: Proteína de choque térmico de 70 kDa

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible

INF- γ : Interferón gamma

IRF-1: Interferón regulador factor 1



JAK/STAT: Vía JAK/STAT

LPS: Lipopolisácarido

MAPK: Vía MAP cinasas

MHC-I: Molécula de histocompatibilidad clase I

MHC-II: Molécula de histocompatibilidad clase II

MVB: Cuerpo multivesicular

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NKT: Células asesinas naturales

ON: Óxido nítrico

PDL-1: Ligando 1 de la proteína de muerte celular

PP2C: Proteína fosfatasa 2C

PTPs: Proteínas tirosinas fosfatasas

ROI: Especies reactivas de oxígeno

SFBc: Suero fetal bovino completo

SFBs/exo: Suero fetal bovino sin exosomas

SHP-1: Proteína fosfatasa específica de tirosina 1

SNARE: Soluble NSF attachment protein

STAT-1: Signal transducer and activator of transcription 1



Índice

Agradecimientos.....	II, III
Dedicatoria.....	IV
Abreviaturas.....	V, VI
Índice.....	VII, VIII
Índice de figuras, tablas y anexos I, II y III	IX, X
1. Resumen.....	1
Abstract.....	2
2. Introducción	3
2.1 Epidemiología de la Leishmaniasis.....	4
2.2 Leishmaniasis en México.....	5
2.3 Especies de <i>leishmania</i> y cuadros clínicos.....	6
2.4 Agente etiológico	8
2.5 Biogénesis de los exosomas en el parásito	9
2.6 Ciclo biológico	11
2.7 Biogénesis de los exosomas en la célula hospedera.....	14
2.8 Los exosomas de <i>leishmania</i>	16
2.9 Modulación de la respuesta inmune por exosomas de <i>Leishmania</i>	17
3. Análisis de exosomas	20
4. Justificación.....	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivo	23
6.1 objetivos particulares.....	23
7. Metodología	25
7.1 Animales para el estudio.....	25
7.2 Eliminación de exosomas del SFB	25
7.3 Cultivo de parásitos de <i>l. mexicana</i>	26
7.4 Aislamiento de exosomas de promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i>	27
7.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET) de aExo	29
7.6 Extracción de proteínas	29
7.7 SDS-PAGE y western blot	30
7.8 Obtención de macrófagos derivados de médula ósea	31
7.9 Microscopía confocal de macrófagos con exosomas sfGFP.....	32
8. Infección de macrófagos provenientes de medula ósea con amastigotes de <i>l. mexicana</i>	33
8.1 Producción de óxido nítrico	34
8.2 Ensayo de supervivencia de amastigotes intracelulares.....	34



8.3 Citometría de flujo.....	30
8.4 Análisis estadístico.....	36
8.5 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).....	36
8.6 Preparación de las muestras para análisis proteómico.....	37
8.7 Análisis proteómico por HPLC-MS.....	37
9. Resultados.....	39
9.1 Los exosomas derivados del SFB no afectan el crecimiento de los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	39
9.2 La eliminación de exosomas de SFB no fue completa.....	40
9.3 Los exosomas secretados por amastigotes de <i>L. mexicana</i> contienen gp63, PP2C, el parásito CD9.....	41
9.4 Los exosomas de <i>L. mexicana</i> son internalizados por macrófagos derivados de médula ósea y co-localizados con la tetraspanina CD63	43
9.5 Los aExo de <i>L. mexicana</i> disminuyen la producción de ON y mejoran la supervivencia de los parásitos dentro de los macrófagos infectados.....	46
9.6 Los aExo de <i>L. mexicana</i> modulan la expresión de MHC-I y CD1d en macrófagos infectados.....	47
9.7 Los aExo de <i>L. mexicana</i> regulan a la baja las moléculas co-estimuladoras en macrófagos infectados.....	49
9.8 Se identificó a gp63 y PP2C en el análisis proteómico.....	50
10. Discusión.....	55
11. Conclusiones.....	70
12. Perspectivas.....	72
13. Referencias.....	73
14. Anexo I: figuras complementarias.....	79
15. Anexo II: Resumen de la identificación de proteínas analizadas por HPLC-MS de los exosomas de <i>L. mexicana</i>	82
16 Anexo III: Trabajos generados.....	109



Índice de figuras

Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis según la OMS.....	4
Figura 2. Estadios de <i>Leishmania</i>	8
Figura 3. Biogénesis y secreción de vesículas / exosomas de <i>Leishmania</i>	9
Figura 4. Microfotografías de exosomas de <i>Leishmania</i>	10
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> y sus exosomas.....	13
Figura 6. Formación de vesículas intraluminales (ILV) y cuerpos multivesiculares (MVB) dentro de una célula infectada con <i>Leishmania</i> y/o estimulada sus exosomas.....	15
Figura 7. Esquema de un exosoma de <i>Leishmania</i>	17
Figura 8. Estrategia experimental.....	24
Figura 9. Metodología utilizada para la obtención de exosomas de <i>L. mexicana</i>	28
Figura 10. Montaje de exosomas en rejilla de formvard para su observación al microscopio electrónico.....	29
Figura 11. Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones Balb/C.....	32
Figura 12. a) Cultivo de promastigotes en medio 199 durante 7 días. b) Cultivo de amastigotes en medio de grace's durante 10 días.....	39
Figura 13. Análisis de citometría de flujo de la eliminación de exosomas del SFB mediante ultracentrifugación (SFBs / exo).....	40
Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas de <i>L. mexicana</i>	42
Figura 15. Caracterización de exosomas de promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i>	43
Figura 16. Los exosomas de <i>L. mexicana</i> internalizados por macrófagos de médula ósea se co-localizan con CD63.....	45
Figura 17. Los exosomas de amastigotes de <i>L. mexicana</i> favorecen la supervivencia del parásito dentro de los macrófagos infectados.....	47
Figura 18. Los exosomas de <i>L. mexicana</i> modulan la expresión de MHC-I y CD1d.....	48
Figura 19. Los exosomas de <i>L. mexicana</i> modulan la expresión de moléculas coestimuladoras de macrófagos infectados estimulados con LPS.....	50
Figura 20. Secuencia de la proteína gp63 (leishmanolisina).....	52
Figura 21. Espectros cromatográficos de algunos péptidos de la proteína gp63.....	53
Figura 22. Secuencia de la proteína de choque térmico de 83 kDa.....	53



Figura 23. Espectros cromatográficos de algunos péptidos de la proteína de choque térmico de 83 kDa.....	54
Figura 24. Los exosomas de amastigotes de <i>L. mexicana</i> modulan los mecanismos microbicidas en macrófagos infectados.....	67
Figura 25. Microscopía electrónica de transmisión de las vesículas extracelulares secretadas por <i>L. mexicana</i> del aislado LCD.....	71

Índice de figuras complementarias

Figura complementaria 1. Fluorescencia de <i>L. mexicana</i> trasfectada con el gen sfGFP.....	83
Figura complementaria 2. Caracterización de exosomas de promastigotes <i>L. mexicana</i> trasfectada con la proteína verde fluorescente (sfGFP).....	84
Figura complementaria 3. a) Microscopía confocal de macrófagos sin estimular de exosomas; b) Microscopía confocal de macrófagos co-incubados con exosomas de <i>Leishmania</i> de sfGFP.....	85

Índice de tablas

Tabla 1. Formas clínicas ocasionadas por las diferentes especies de <i>Leishmania</i>	7
Tabla 2. Proteínas identificadas mediante HPLC-MS de los exosomas de promastigotes (pExo) y exosomas de los amastigotes (aExo) de <i>Leishmania mexicana</i>	51
Tabla 3. Proteínas identificadas en los exosomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> pExo (LCL).....	87
Tabla 4. Proteínas identificadas en los exosomas de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> aExo (LCL).....	103
Tabla 5. Proteínas identificadas en los exosomas de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> aExo (LCL) comparando con la especie <i>Bos Taurus</i>	105



Estudio de exosomas de *Leishmania mexicana* y su efecto inmunomodulador sobre macrófagos

1. Resumen

Los exosomas son microvesículas extracelulares de origen endosómico (cuerpos multivesiculares, MVB) liberadas constitutivamente por células eucariotas por fusión de MVB a la membrana plasmática. Los exosomas de *Leishmania* contienen una serie de moléculas, conocidas como factores de virulencia, capaces de modular la respuesta inmune del huésped y, por tanto, favorecer la supervivencia del parásito en el hospedero. En este trabajo se demostró que los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* (aExo) contienen proteínas como la gp63 y PP2C. Dichas proteínas se han relacionado con la supervivencia del parásito en el macrófago, mostrando que los exosomas pueden disminuir la producción de ON en los macrófagos infectados. Este resultado se reforzó por el análisis proteómico donde se identificó mediante espectrometría de masas la proteína LiTAT contenida en los aExo. Además se demostró que los exosomas alteran la expresión de moléculas presentadoras de antígenos y a moléculas coestimuladoras. Los exosomas de los amastigotes de *L. mexicana* pueden internalizarse en los macrófagos, colocalizando con la tetraspanina CD63. Los aExo tienen la capacidad de modular la activación de los macrófagos infectados de manera dosis dependiente. Encontramos que los exosomas disminuyen la expresión de MHC-I, aunque no modifican la expresión de MHC-II. Además, inducen la disminución de moléculas coestimuladoras como la CD86. Inesperadamente, encontramos que exosomas inducen un aumento de la expresión de CD1d, aunado a la disminución de PD-L1, a dosis altas de exosomas. Esto podría generar protección y estimular a su vez la activación de linfocitos T, posiblemente por la vía de antígenos lipídicos. Sin embargo, la falta de coestimulación podría generar tolerancia y llevar a anergia celular. En conclusión, los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* inhiben los mecanismos microbicidas de los macrófagos infectados, modificando la expresión de moléculas de superficie celular involucradas en la activación de los linfocitos T.



Abstract

Exosomes are extracellular microvesicles of endosomal origin (multivesicular bodies, MVBs) constitutively released by eukaryotic cells by fusion of MVBs to the plasma membrane. The exosomes from *Leishmania* parasites contain an array of parasite molecules such as virulence factors and survival messengers, capable of modulating the host immune response and thereby favoring the infection of the host. In this work we was demonstrated that the exosomes of amastigotes of *L. mexicana* contain proteins such as gp63 and PP2C. These proteins have been related to the survival of the parasite inside the macrophage, showing that the exosomes can decrease the production of NO in infected macrophages. In addition, exosomes were shown to alter the expression of antigen presenting and costimulatory molecules. The exosomes of the amastigotes of *L. mexicana* (aExo) can be internalized in macrophages, colocalizing with the tetraspanin CD63. They have the ability to immunomodulate the activation of infected macrophages in a dose-dependent manner. This result was reinforced by the proteomic analysis where the LiTAT protein was found within aExo. We found that exosomes reduce the expression of MHC-I, whereas MHC-II remains unchanged. In addition, a decrease in costimulatory molecules CD86 was observed. Unexpectedly, we found an increase in the expression of CD1d, together with a decrease in PDL-1, at high doses of exosomes. This could generate protection and stimulate the activation of T lymphocytes through lipid antigens. However, the lack of costimulation could generate tolerance and lead to cellular anergy. In conclusion, the exosomes of amastigotes of *L. mexicana* inhibit the microbicidal mechanisms of infected macrophages, modifying the expression of cell surface molecules involved in the activation of T lymphocytes.



2. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica tropical y subtropical que es causada por más de 20 especies de un protozooario parásito intracelular del género *Leishmania*, transmitido por la picadura de un insecto volador del género *Lutzomyia* (Nuevo mundo) o *Phlebotomus* (Viejo mundo) ([Gergiadou et al., 2015](#)). Se encuentra en casi todos los continentes, siendo una de las 7 enfermedades tropicales más importantes para la OMS, lo que representa un problema de salud pública a nivel mundial. En décadas pasadas la enfermedad se encontraba limitada a zonas rurales, sin embargo, en la actualidad se han dado casos en zonas urbanas, asociado al esparcimiento y adaptación de reservorios como algunos animales domésticos ([WHO, 2016](#)). En los últimos años, la enfermedad se ha expandido en América Latina, lo cual se ha asociado a varias situaciones: la destrucción de ecosistemas, modificación de ambientes naturales por deforestación, invasión de hábitat, industrialización (carreteras, explotaciones mineras, plantas hidroeléctricas), urbanización, migración de zonas endémicas a ciudades, etc. ([Marcondes y Day, 2019](#)).

En México, la enfermedad se conoce desde la época precolombina, principalmente en el sur de la península de Yucatán, donde crecía en abundancia el árbol del chicle o chicozapote (*Manilkara zapota*), ha sido considerado como hábitat de los reservorios, por lo que la enfermedad era comúnmente reportada en los trabajadores que extraían chicle del árbol en zonas selváticas. Los trabajadores mostraban lesiones ulcerosas en las orejas y desde entonces la enfermedad se conoce como “úlceras de los chicleros” ([Vargas-Martínez et al., 2011](#)).



2.1 Epidemiología de la leishmaniasis

La leishmaniasis se encuentra alrededor del mundo, se distribuye en 88 países tropicales y subtropicales con una población de 350 millones de personas en riesgo. Afecta principalmente países pobres en África y Latino América, y esta asociada a fallas en el sistema inmune. Hasta 2016, al menos 98 países se encontraban afectados con reportes de leishmaniasis cutánea y visceral (WHO, 2016), **figura 1**.

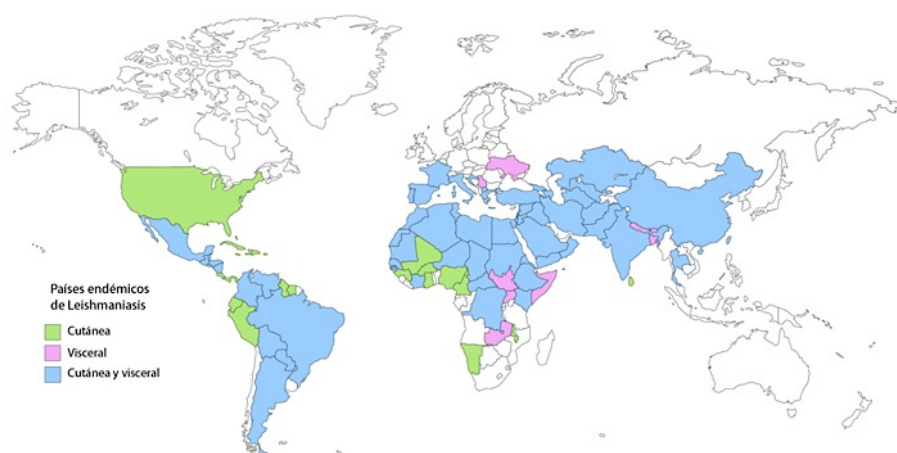


Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis según la OMS. Tomado de Cañeda-Guzman *et al*, 2018.

La infección puede ser causada por más de 20 especies de *Leishmania* que se encuentran en al menos 30 especies de flebotomos (vectores) (Gergiadou *et al*, 2015; Cañeda-Guzman *et al*, 2018). Se transmite por el vector infectado (hembra hematófaga) que se alimenta del algún reservorio mamífero como roedores, marsupiales, monos e incluso caninos domésticos, y los humanos se infectan accidentalmente al introducirse en el hábitat del vector (Gergiadou *et al*, 2015) donde existen cultivos de café, cacao,

plátano y caña, entre otros. La mordedura de estos insectos es principalmente en zonas de piel expuesta como cara, orejas, cuello, brazos y piernas (Bates *et al.*, 2015).

2.2 Leishmaniasis en México

En México se han registrado 11 especies de flébotomos infectados con *L. mexicana*, y los reportados con mayor prevalencia son *Lutzomyia olmeca* y *L. cruciata* (González-Salazar *et al.*, 2012).

En nuestro país la enfermedad se encuentra principalmente al sureste donde se han presentando las formas cutáneas de la enfermedad. La forma cutánea localizada (LCL), también llamada “Úlcera de los chicleros” es la forma más frecuente de la enfermedad (99% de los casos), es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedad emergente y no controlada (OMS, 2010; Vargas-Martínez *et al.*, 2011); mientras que la forma cutánea diseminada (LCD) es muy poco frecuente (<1% de los casos), sin embargo su severidad es mayor, ya que las lesiones se diseminan por todo el cuerpo sin conocerse la causa de dicho fenómeno. Un factor de riesgo para adquirir la infección es la ocupación laboral, pues se asocia a agricultores (café, plátano, cocoa), taladores, exploradores y quienes practican turismo ecológico (Vargas-Martínez *et al.*, 2011).

Los pacientes con LCL se caracterizan por la formación de una úlcera en el sitio de inoculación del parásito, generalmente presentan una respuesta inmune protectora que logra contener al parásito dentro de macrófagos predominando una respuesta



celular tipo Th1 la cual lleva a la curación de la enfermedad. Los pacientes con LCD presentan una respuesta predominante tipo Th2 permite la multiplicación incontrolada del parásito dentro de las células fagocíticas (Savoia *et al.*, 2015).

2.3 Especies de *Leishmania* y cuadros clínicos

La enfermedad representa un serio problema de salud, ya que presenta un amplio espectro en sus manifestaciones clínicas. Las diferentes formas clínicas varían de acuerdo a la especie del parásito y al fondo genético del hospedero. Estas se dividen en leishmaniasis cutánea (LC) localizada o diseminada, leishmaniasis mucocutánea (LM) y leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar. LC localizada se caracteriza por incremento local de temperatura e hinchazón en el sitio del piquete, con formación de una pápula eritematosa, que posteriormente se convertirá en pústula hasta ulcerarse y posiblemente prurito, comúnmente se origina en piel expuesta como orejas, nariz, mejillas, piernas, manos, antebrazos y tobillos (Dong *et al.*, 2019; WHO, 2015). LC diseminada se caracteriza por anergia (pérdida de la respuesta celular a antígenos de los parásitos), lo que produce diseminación por vía linfática y sanguínea, desarrollando lesiones en casi toda la piel del cuerpo excepto en cuero cabelludo y mucosas. No existe resolución espontánea y su evolución puede ser de hasta 20 años. LMC se presenta en menos del 1% de los pacientes, causa invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea causando prurito local e hinchazón (Fernández-Figueroa *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019). LV es una infección febril conocida también como Kala-azar (fiebre negra), caracterizada por presencia de sudores nocturnos, debilidad, pigmentación cutánea,



linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia y falla multisistémica (Dong *et al*, 2019). Diferentes especies de *Leishmania* son los agentes causales de los diferentes tipos de cuadros clínicos en la enfermedad, **Tabla 1** (WHO, 2015).

Tabla 1. Formas clínicas ocasionadas por las diferentes especies de *Leishmania*.

Familia	Género	Subgénero	Especies	Formas clínicas
<i>Trypanosomatidae</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> (<i>L. chagasi</i>)	LV
			<i>L. tropica</i>	LC
			<i>L. major</i>	LC
			<i>L. aethiopica</i>	LC, LCD
			<i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. venezuelensis</i>	LC, LCD
		<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. peruviana</i>	LC, LMC
			<i>L. iainsoni</i>	LC
			<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>	LC, LMC

LV: Leishmaniasis visceral, LC: Leishmaniasis cutánea, LCD: Leishmaniasis cutánea diseminada, LMC: Leishmaniasis mucocutánea. Fuente: WHO, 2015.



2.4 Agente etiológico

Es un protozoo de la familia *Trypanosomatidae*, del género *Leishmania*. Es un parásito digénico en su ciclo de vida en mamíferos, pues presenta dos estadios (Bates-Rogers, 2004; Rogers *et al.*, 2002). El **promastigote** este se multiplica en el tracto gástrico del vector hasta llegar a su forma infectante que es el *promastigote metacíclico*, este estadio es extracelular, alargado y presenta un flagelo en su parte posterior que sale de la bolsa flagelar que facilita su movilidad, mide alrededor de 8 - 14 μm (cuerpo sin flagelo) (Rogers *et al.*, 2002; Sunter *et al.*, 2017), **figura 2**. El **amastigote** es la forma intracelular y replicativa, su morfología es redondeada u oval, carece de flagelo y mide de ~2 - 5 μm (Rogers *et al.*, 2002).

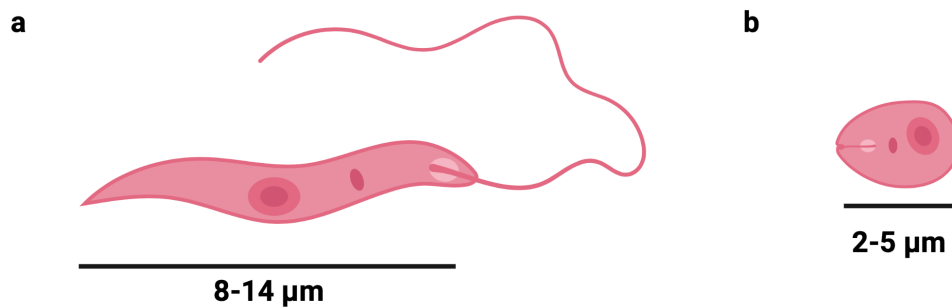


Figura 2. Estadios de *Leishmania*. a) Promastigote, b) Amastigote. Tomado de Rogers *et al.*, 2002.

Creado con Biorender.



2.5 Biogénesis de los exosomas en el parásito

Los mecanismos por los que se selecciona el contenido proteico y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) en las vesículas extracelulares secretadas por el parásito han sido poco estudiados. Gabriel y cols. proponen un esquema del proceso de biogénesis de exosomas dentro del promastigote. Las vesículas extracelulares pueden liberarse de los compartimentos de los organelos del parásito, **figura 3**, o bien a través de células hospederas infectadas con *Leishmania* (Gabriel *et al.*, 2021).

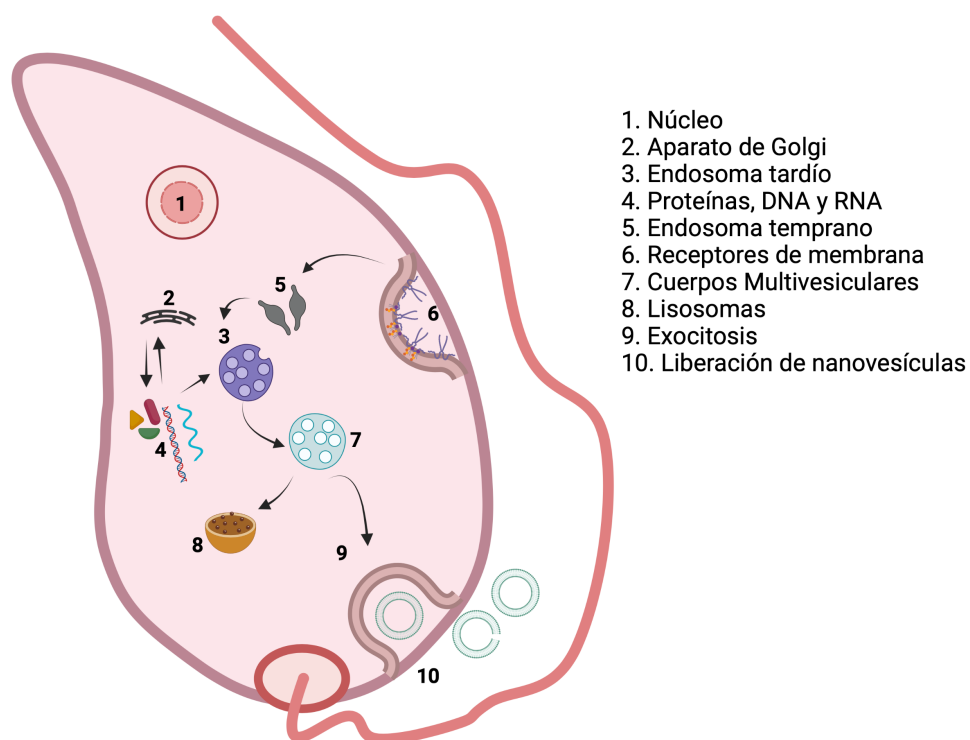


Figura 3. Biogénesis y secreción de vesículas / exosomas de *Leishmania*. Creado con Biorender. Tomado y modificado de Gabriel *et al.*, 2021.

Silverman y cols. utilizando microscopia electrónica de barrido descubrieron microvesículas localizadas en la superficie del parásito y otras en la bolsa flagelar del promastigote de *Leishmania* (Silverman *et al.*, 2010a). Al ser analizadas observaron que tienen tamaños nanométricos, por lo que las colocaron en del rango de los exosomas (Hassani *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2010b), **figura 4**. Estos exosomas se acumulan en la bolsa flagelar del promastigote y salen del parásito al medio extracelular a través de dicha estructura (Atayde *et al.*, 2015). El saco flagelar ha sido descrito como el único sitio de endocitosis y exocitosis en el parásito (Gabriel *et al.*, 2021).

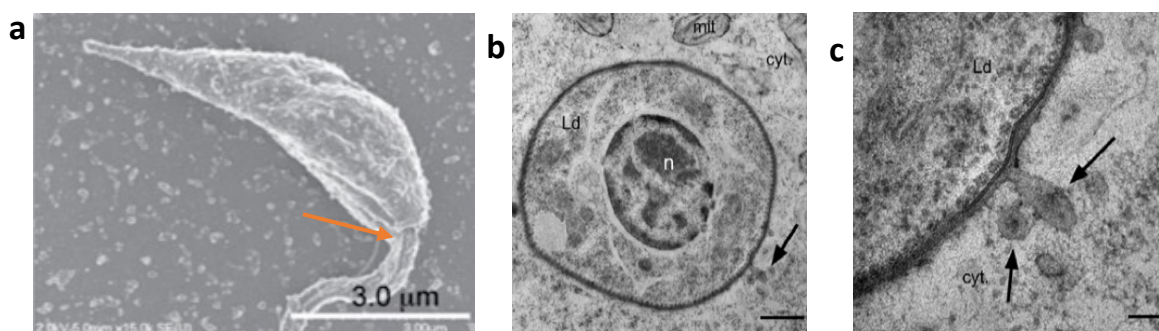


Figura 4. Microfotografías de exosomas de *Leishmania*. a) Los promastigotes de *Leishmania* muestran vesículas en el saco flagelar (flecha naranja) y sobre su membrana celular; estos aumentan a una temperatura de 37 °C por 4 h. b) Microvesículas asociadas con la membrana fagolisosomal (flecha), escala 500 nm. c) Magnificación a 10 000 (flechas), escala 100 nm. Tomado y modificado de Silverman *et al.*, 2010 y Hassani *et al.*, 2011.

Se ha demostrado que diferentes especies del parásito tienen la capacidad de secretar microvesículas y exosomas en las células infectadas para regular sus propiedades microbicidas (Atayde *et al.*, 2016; Pant *et al.*, 2012). Estas vesículas extracelulares son capaces de inhibir las vías de señalización celular y la respuesta inflamatoria innata durante la infección (Hassani *et al.*, 2013; Silverman *et al.*, 2010; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019). La vía de secreción exosomal de *Leishmania* es una vía “no convencional”, ha sido descrita como uno de los mecanismos principales de manipulación de la respuesta inmune por parte del parásito sobre el microambiente celular del macrófago infectado (Atayde *et al.*, 2016).

2.6 Ciclo biológico

Leishmania es un parásito intracelular obligado, tiene un ciclo de vida complejo que consiste en cambios de estadios del parásito desde que se encuentra en el tubo gástrico del vector (Bates-Rogers, 2004; Rogers *et al.*, 2002). Recientemente se demostró que *L. infantum* y *L. longipalpis* tienen la capacidad de secretar exosomas desde que se encuentran en el intestino del vector (Atayde *et al.* 2015).

En el vector, los **amastigotes** luego de ser ingeridos se transforman en *promastigotes procíclicos* en el estómago, al llegar al intestino se desarrollan tres diferentes estadios de promastigotes: *nectomona*, ubicado en la parte torácica del intestino, *haptomona*, que posee un flagelo y *leptomona*, que produce un gel secretor (PSG, del inglés) importante para la transmisión hasta llegar a su forma infectiva que es el **promastigote metacíclico**, este último se acumula en la valva estomodeal y se posiciona para la

transmisión al hospedero mamífero durante la alimentación del vector ([Bates-Rogers, 2004](#)), por lo que probablemente durante el proceso de desarrollo en el intestino de este los exosomas también tengan una importante participación ([Atayde et al. 2015](#)), **figura 5**. Se ha observado que los exosomas influyen en el proceso de infección desde que el protozooario es inoculado en el hospedero, colaborando en la exacerbación de la lesión, la carga parasitaria y contribuyendo al establecimiento de la leishmaniasis ([Atayde et al. 2015](#)). En el momento que otro vector se alimenta de un hospedero infectado se reinicia el ciclo.

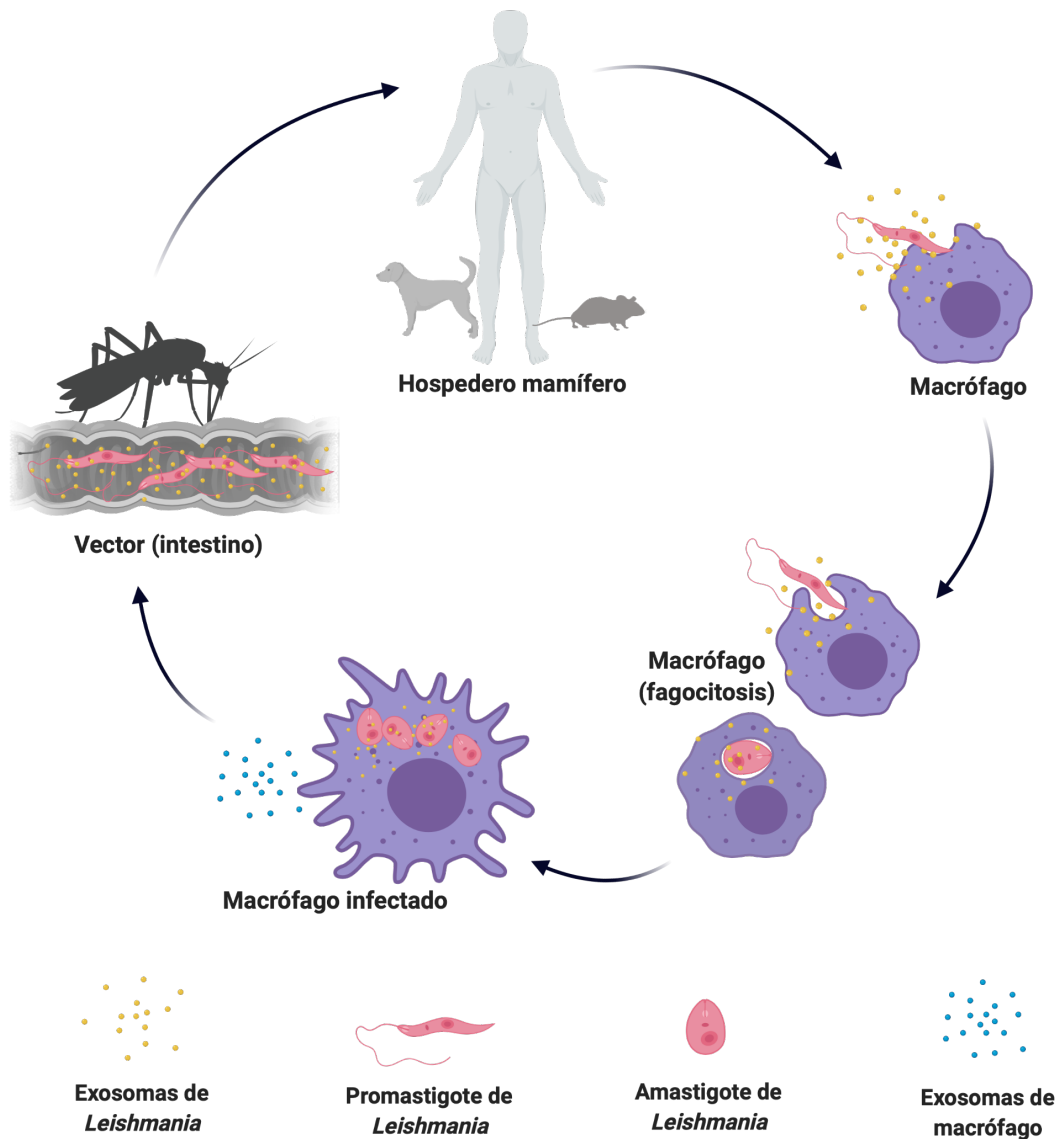


Figura 5. Ciclo biológico de *Leishmania* y sus exosomas. Los exosomas de *Leishmania* son secretados desde que se encuentran en el intestino de la mosca (Silverman *et al.*, 2010 y Atayde *et al.*, 2015). Creado con Biorender.

2.7 Biogénesis de los exosomas en la célula hospedera

El parásito luego de ser inyectado por el vector en la piel del hospedero, comienza a secretar exosomas al medio extracelular, estos son internalizados dentro de una célula hospedera por medio de tres mecanismos: 1) por la invaginación hacia dentro de la membrana plasmática celular por endocitosis mediada por receptores, 2) por fusión de membranas y 3) por la interacción ligando receptor. Posteriormente los exosomas se incorporan dentro de un endosoma temprano y se forman las vesículas intraluminales (ILVs). Ocurre el cambio de estadio y el amastigote dentro de la vacuola parasitófora (un endosoma tardío) secreta exosomas al citosol, estos pueden seguir el mismo camino hacia los cuerpos multivesiculares (MVB) o bien dirigirse mediante el tráfico retrogrado a retículo endoplásmico. Se requiere de la maquinaria del complejo de sorteo endosomal requerido para el transporte (ESCRT, del inglés) para la clasificación o selección endosomal de las proteínas contenidas en los exosomas. Finalmente, los exosomas contienen proteínas tanto del parásito como de la célula, son liberados al medio extracelular por exocitosis y llegarán a una célula blanco por alguno de los tres mecanismos anteriormente descritos, **figura 6** ([Atayde et al., 2015](#); [Babst et al., 2011](#); [Rapos-Stoorvogel, 2013](#); [Silverman et al., 2008](#)).

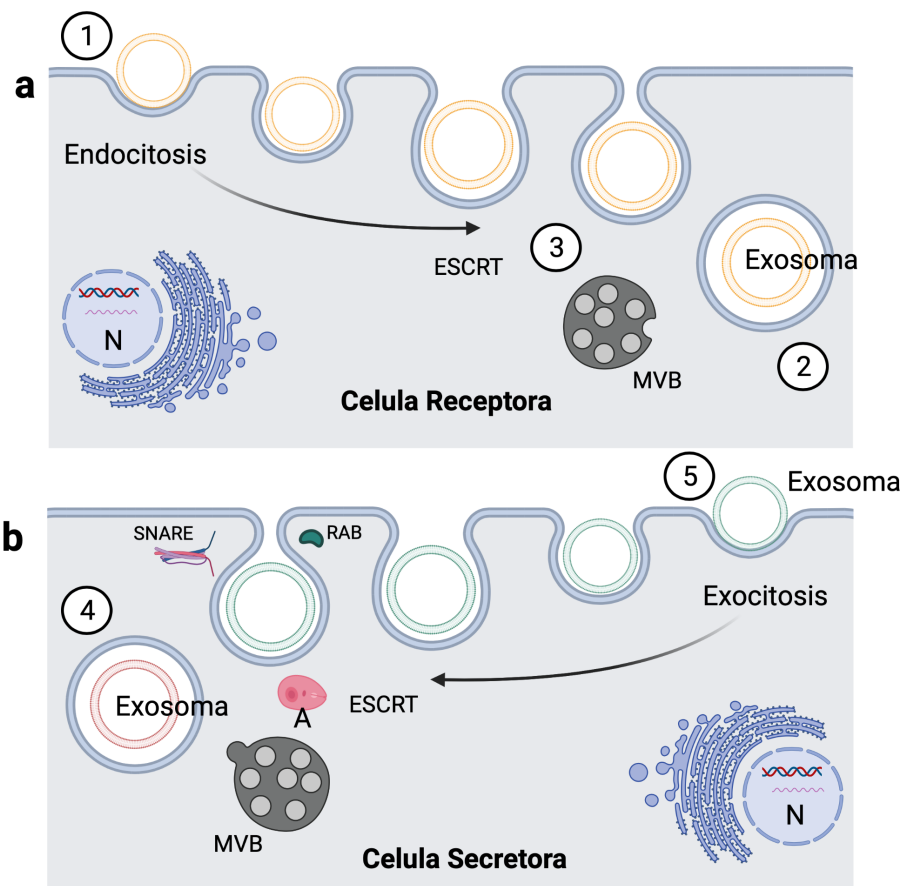


Figura 6. Formación de vesículas intraluminales (ILV) y cuerpos multivesiculares (MVB) dentro de una célula infectada con *Leishmania* y/o estimulada sus exosomas. A. La formación intracelular de exosomas al parecer ocurre mediante los siguientes pasos: 1. Los exosomas son internalizados en la célula. 2. Se forman los cuerpos multivesiculares. 3. Se activa la maquinaria del complejo de sorteo endosomal (ESCRT). B. 4. El amastigote dentro de la vacuola parásitofora secreta exosomas al citosol. 5. Los exosomas nuevos que son secretados contienen proteínas del parásito y de la células hospedera. Exo: exosoma extracelular, MP: membrana plasmática, N: núcleo, Rab11: GTPasa de transporte vesicular, Rab5a: GTPasa de fusión de membranas y endosomas; SNARE: receptor de unión soluble NSF y RE: retículo endoplásmico. Esquema creado con Biorender.

2.8 Los exosomas de *Leishmania*

Los exosomas son vesículas extracelulares que miden alrededor de 30-150 nm de diámetro, son secretados por casi todos los tipos celulares en los que se han estudiado (Coakley *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2019; Shorey *et al.*, 2015; Silverman *et al.*, 2010a; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019). Están formados por una membrana de fosfolípidos, contienen cantidades variadas de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Los exosomas son liberados a los espacios extracelulares por casi todas las células y están implicados en sistemas de comunicación intercelular de células eucariotas y procariotas (Shorey *et al.*, 2015; Coakley *et al.*, 2015; Skotland *et al.*, 2017), regulando procesos biológicos centrales, como las respuestas inmunitarias (De Toro *et al.*, 2015; Pant *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2015).

En los exosomas de *Leishmania* se han encontrado algunas proteínas comúnmente llamadas “factores de virulencia” como la metaloproteasa gp63, implicada en el bloqueo de la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Hassani *et al.*, 2014). Otro es el factor de elongación 1 alfa (EF-1 α), implicado en la regulación del estallido oxidativo en las células fagocíticas (Sabur *et al.*, 2018), así como las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés) de entre 70-100 kDa (Silverman *et al.*, 2010ab). Adicionalmente, se ha identificado la proteína fosfatasa LmPRL contenida en los exosomas de *L. major* (Leithener *et al.*, 2017) y recientemente, se identificó mediante western blot a la proteína fosfatasa PP2C contenida en los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* (Soto-Serna *et al.*, 2020), **figura 7**. Esta última proteína, la PP2C podría favorecer el incremento de la carga parasitaria intracelular ayudando así a la

supervivencia del parásito dentro del ambiente hostil de la célula (Escalona-Montaño *et al.*, 2016; Soto-Serna *et al.*, 2020).

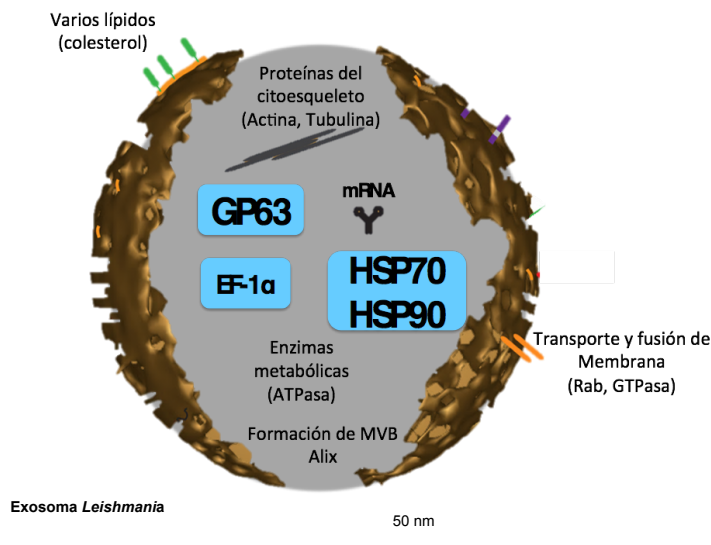


Figura 7. Esquema de un exosoma de *Leishmania* (50-100 μ m). Esquema creado con Biorender.

Por lo anterior se han propuesto a los exosomas secretados por *Leishmania* o macrófagos infectados por el parásito como una de las estrategias de evasión de las funciones microbicidas de la célula hospedera (Coakley *et al.*, 2015; Shorey *et al.*, 2015).

2.9 Modulación de la respuesta inmune por exosomas de *Leishmania*

Estas vesículas contribuyen a determinar una multitud de factores en cuanto a la forma y severidad de la infección puesto que tienen la capacidad de viajar a largas distancias hasta su célula blanco (Atayde *et al.*, 2016), están suspendidas en diversos fluidos corporales como la orina, la saliva y el sangre a través de los cuales pueden distribuirse

por todo el cuerpo (Patel *et al.*, 2019) y modificar así la respuesta de la célula receptora (Atayde *et al.*, 2016). Son capaces de modular los mecanismos efectores y la expresión de moléculas de superficie implicadas en la presentación de antígenos y coestimulación (Coakley *et al.*, 2015; Shorey *et al.*, 2015).

Al momento de la inoculación, los promastigotes de *Leishmania* son fagocitados por células presentadoras de antígenos (APC), como macrófagos y células dendríticas, donde se diferencian en amastigotes y comienzan su replicación (Liu y Uzonna, 2012). Los macrófagos desempeñan múltiples funciones durante la infección, incluida la eliminación del parásito, la presentación de antígenos para la activación de las células T y la producción de citocinas (Podinovskaia y Descoteaux, 2015). Estos mecanismos de respuesta coordinados son necesarios para limitar la progresión de la enfermedad (Podinovskaia y Descoteaux, 2015). El parásito ha desarrollado diversas estrategias de evasión para su supervivencia dentro del huésped mamífero, incluida la inhibición del estallido respiratorio, reduciendo así los intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) tóxicos y la producción de óxido nítrico (ON), ambos importantes mecanismos leishmanicidas (Podinovskaia y Descoteaux, 2015; Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010). La producción de Oxido Nítrico está regulada por la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, del inglés) a través de la activación de factores nucleares inducibles, incluido el factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF-κB) (Li *et al.*, 2002). Los mecanismos de evasión parasitaria están mediados por factores de virulencia y estos se encuentran contenidos en los exosomas de *Leishmania* (Atayde *et al.*, 2016).

La glicoproteína de 63 kDa (gp63) una metaloproteasa de superficie y el factor de elongación 1- α (EF-1 α), que activa SHP-1 (PTP) en macrófagos evitando la señalización a través de STAT-1 e inhibiendo los factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Atayde *et al.*, 2016; Gomez *et al.*, 2009; Isnard *et al.*, 2012; Nandan *et al.*, 2002). Además, la proteína fosfatasa 2C (PP2C), que se encuentra en el secretoma de varias especies de *Leishmania*, y se ha demostrado que regula la producción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos (Escalona-Montaña *et al.*, 2016). Esta proteína se ha implicado en los mecanismos patogénicos que favorecen la infectividad de varios parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* (Gilbert *et al.*, 2007; Mamoun *et al.*, 2001) y *Leishmania* (Escalona-Montaña *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se ha descrito que los exosomas de *L. infantum* pueden interferir con la activación de las CPAs (células dendríticas y macrófagos), observándose una tendencia a disminuir de las moléculas coestímuladoras CD86 y CD40, mientras que MHC-II permanece similar a los niveles basales, mostrando que los exosomas pueden modificar la respuesta inmune en células dendríticas y macrófagos naive receptoras (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019).

Se demostró que los parásitos intracelulares de *L. donovani* reducen la presentación de Ag restringida por MHC-II como resultado de una capacidad defectuosa de intercambio de péptidos. El parásito ha desarrollado un mecanismo único para modificar la respuesta de linfocitos T CD4 + del hospedero, por lo que se sugiere se podría superar

una presentación deficiente por MHC-II utilizando una concentración alta de antígenos (Ag)(Koushik *et al.*, 2014).

3. Análisis de Exosomas

Los métodos de aislación se clasifican en tres: basados en densidad (gradiente de densidad), en el tamaño (ultracentrifugación e ultrafiltración) y técnicas inmunomagnéticas (perlas con marcadores exosomales: CD63, CD81, CD9) (Lane *et al.*, 2015; Lobb *et al.*, 2015; Sunkara *et al.*, 2016).

Comúnmente para la caracterización del tamaño de las vesículas se utiliza la Microscopia electrónica de transmisión (MET), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) o Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). Además, existen otros métodos que miden concentración y tamaño como el análisis del tráfico de nanopartículas (NTA), Dispersión Dinámica de Luz (DLS) este método se utiliza para medir la distribución de tamaño y el potencial Z de las vesículas extracelulares, el potencial Z indica relativa estabilidad de las partículas en solución. Para analizar los marcadores superficie y la cantidad de proteínas en las vesículas se utiliza la citometría de flujo o western blot (Lane *et al.*, 2015; Sunkara *et al.*, 2016). Finalmente, para la caracterización del contenido proteico en exosomas se ha empleado el análisis proteómico el cual puede ser cualitativo o cuantitativo que al final arroja una lista de proteínas identificadas (Schey *et al.*, 2015).

Sin embargo, aun hay mucho por explorar en el contexto de exosomas de los parásitos de *L. mexicana*, tanto en la enfermedad localizada como en las enfermedades cutáneas progresivas graves. En este estudio, nosotros solo analizamos el efecto inmunomodulador ejercido por los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos infectados derivados de la médula ósea infectados.

4. Justificación

- La vía de secreción exosomal es una vía “no convencional”, descrita como uno de los mecanismos de manipulación de la respuesta inmune por parte del parásito sobre el microambiente celular del macrófago infectado.
- Los exosomas que secretan los amastigotes actúan como factores de virulencia durante el desarrollo de la Leishmaniasis, pues están enriquecidos con gp63, proteínas de choque térmico (HSP), el EF-1 α , RNAs que participan en el mantenimiento y modulación de la respuesta efectora de la célula infectada por el parásito.
- La modulación de las proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs) y factores de virulencia es dependiente de proteínas contenidas en los exosomas del parásito que modulan los mecanismos microbicidas y favorecen la sobrevivencia del parásito al ambiente hostil de la célula.
- Se desconocen los efectos moduladores que ejercen exosomas de *Leishmania mexicana* sobre macrófagos infectados.

5. Hipótesis

Los exosomas de *L. mexicana* modulan al macrófago infectado inhibiendo los mecanismos leishmanicidas y la presentación antigénica, favoreciendo así el desarrollo de la infección.

6. Objetivo

Analizar el papel de los exosomas de promastigotes y amastigotes en la modulación de la respuesta inmune de macrófagos infectados para identificar si estos favorecen el desarrollo de la infección por *L. mexicana*.

6.1. Objetivos particulares

1. Obtención de exosomas de promastigotes (pExo) y amastigotes (aExo) de *Leishmania mexicana*.
2. Caracterización de exosomas de pExo y aExo de *L. mexicana* por microscopía electrónica de transmisión y western blot.
3. Analizar la capacidad de los exosomas pExo y aExo de internalizarse al citosol del macrófago.
4. Analizar la producción de nitritos en macrófagos infectados co-incubados con exosomas aExo.
5. Analizar la supervivencia de los parásitos al ambiente hostil del macrófago infectado co-incubado con exosomas aExo.
6. Medir la expresión de moléculas presentadoras de antígeno (MHC-I, MHC-II y CD1d) así como moléculas co-estimuladoras (CD86 y PD-L1) en macrófagos infectados co-incubados con exosomas aExo.
7. Análisis proteómico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS) acoplada a espectrometría de masas de los pExo y aExo de *L. mexicana*.

Para desarrollar los objetivos se realizó la siguiente estrategia experimental, **figura 8**.

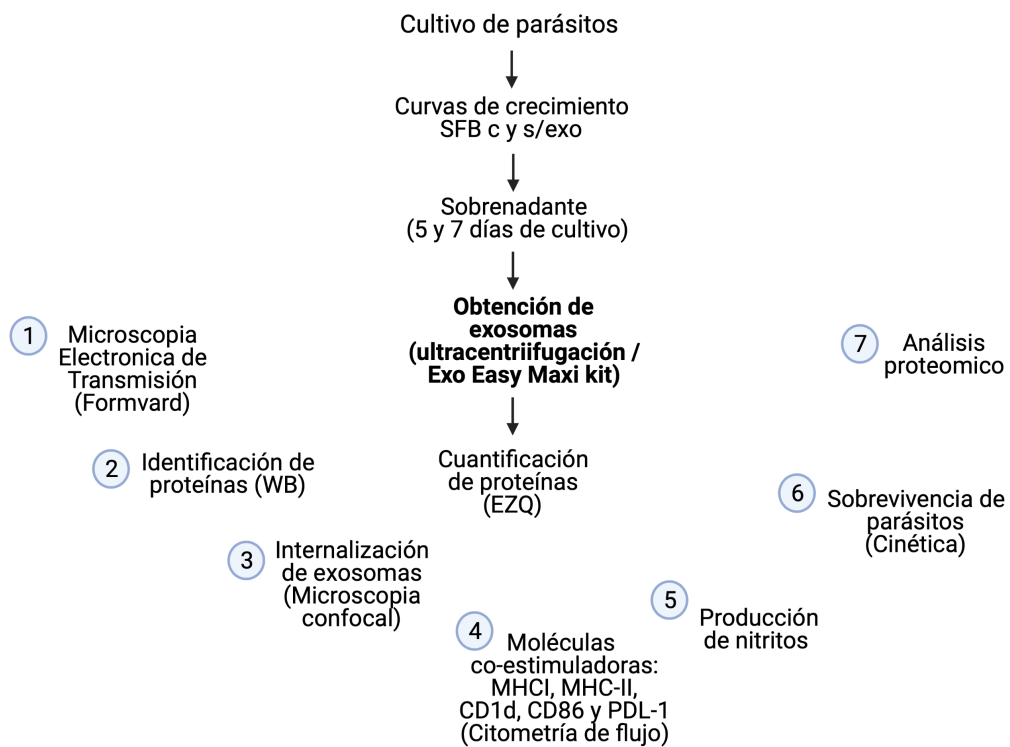


Figura 8. Estrategia experimental.

7. Metodología

7.1. Animales para el estudio

Los ratones BALB/c fueron criados y alojados en el bioterio en las instalaciones para animales de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, siguiendo las Directrices Éticas Nacionales de Sanidad Animal de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, así como las recomendadas para el cuidado animal por el comité de ética de la Facultad de Medicina, UNAM. El proyecto fue aprobado por las Comisiones de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina con el número: FM/DI/088/2017.

7.2 Eliminación de exosomas del SFB

Se le eliminaron los exosomas al suero fetal bovino de forma casera (Biowest, RS1650), previamente inactivado por choque de calor a 56 °C por 30 min (SFB s/exo) mediante de una serie de centrifugaciones (300 x *g* / 10 min, 1000 x *g* / 20 min, 3000 x *g* / 30 min), se hizo una modificación al procedimiento descrito por Thery y cols ([Thery et al., 2009](#)), sustituyendo una ultracentrifugación a 10,000 *g* por una filtración en un sistema de filtración de poro de 0.22 µm (Millex GV, SLGV033RS) y finalmente una ultracentrifugación a 100,000 x *g* durante 1 hora (rotor de ángulo fijo Ti70, ultracentrífuga Sorvall WX100, Thermo Scientific) según protocolos descritos ([Eitan et al., 2015](#); [Shelky et al., 2014](#)). Se corroboró la eliminación de microvesículas y exosomas por citometría de flujo (citómetro de flujo, FACS ARIA BD), utilizando perlas de referencia de diferentes tamaños entre 0.1 – 2 µm (Flow cytometry sub-micron, size

7.3 Cultivo de parásitos

Amastigotes

Se aspiraron amastigotes de *Leishmania mexicana* (MHOM/MX/2011 / Lacandona) de las lesiones del cojinete plantar de ratones BALB / c infectados y se cultivaron durante 10 días a 33 °C en medio de Grace's, pH 5,5 (Gibco, Invitrogen Corporation, Gran Island, NY, EE. UU.), suplementado con 20% de suero bovino fetal inactivado por calor a 56 °C (SFB) (Biowest, Riverside MO, EE. UU.), L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 0,35 g / L y Pen / Strep al 1% (100 UI / ml-100 µg / mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente ([Pérez-Cabezas et al., 2019](#)). La viabilidad de los amastigotes se verificó con eritrosina B al 0,2% (Sigma-Aldrich). Los amastigotes resultantes fueron separados y lavados con PBS en el pase 2, se realizó una expansión en 200 mL de medio de Grace's con L-glutamina, bicarbonato de sodio y Pen / Strep con las mismas características que el cultivo anterior, con 20% de SFB sin exosomas (SFB s/exo) (Biowest, Riverside MO, USA). Del sobrenadante de este último cultivo se obtuvieron los exosomas de amastigotes.

Promastigotes

Se realizó el cultivo de promastigotes *Leishmania mexicana* (MHOM/MX/2011 / Lacandona) de las lesiones del cojinete plantar de ratones BALB / c infectados y se cultivaron durante 5 días en medio 199 (Thermo Fisher Scientific) a 26 °C, suplementado con 20% de SFB inactivado por calor (Biowest, Riverside MO, USA), L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 0, 35 g / L y Pen / Strep al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Los promastigotes resultantes fueron separados y lavados con PBS

en el pase 2, se realizó una expansión en 200 mL de medio 199 con L-glutamina, bicarbonato de sodio y Pen / Strep, con 20% de SFB sin exosomas (SFB s/exo) (Biowest, Riverside MO, USA). Los promastigotes del día 5 de cultivo fueron lavados con PBS en tres ocasiones y posteriormente colocados en 100 mL de medio 199 suplementado, sin SFB durante 4 hrs a una temperatura de 37 °C (Silverman *et al.*, 2010). Del sobrenadante de este último cultivo se obtuvieron los exosomas de promastigotes.

7.4 Aislamiento de exosomas de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* (pExo y aExo)

Del cultivo axénico final de $\sim 2.6 \times 10^9$ promastigotes (100 mL) y $\sim 2.9 \times 10^9$ amastigotes (200 mL) de *Leishmania mexicana*, se separaron los parásitos por centrifugación 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue sometido a una serie de centrifugaciones de 300 x g / 10 minutos, 1000 x g / 20 minutos, 3000 x g / 30 minutos, una modificación al método de They y cols. sustituyendo una ultrafiltración a 10,000 x g por una filtración utilizando sistema de filtrado con microporo de 0.22 μm (Filter systems, bottles and bottle top filters, Corning^R, R431097). El sobrenadante fue transferido a tubos de policarbonato de 26.3 mL (Beckman Coulter, USA, R355618), el pellet obtenido se re-suspendió en 100 – 200 μL de PBS (Dulbecco), siguiendo los protocolos descritos (Lässer *et al.*, 2012; Silverman *et al.*, 2010a; Raposo *et al.*, 1996; They *et al.*, 2009). Los exosomas suspendidos en 400 μL de PBS fueron purificados con el Kit ExoEasy Maxi kit según el protocolo descrito y guardados en suspensión buffer de elución a -70 °C hasta su uso (Li *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017).

Para lograr la obtención de los exosomas se utilizó la metodología siguiente, **figura 9**.

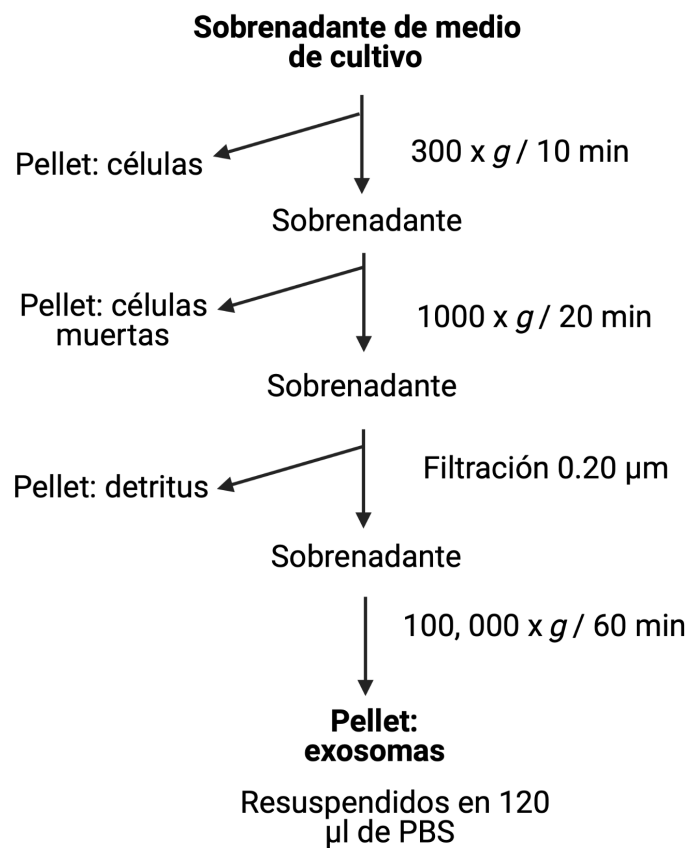


Figura 9. Metodología utilizada para la obtención de exosomas de *L. mexicana*.

7.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la visualización de los exosomas por microscopía electrónica de transmisión, se fijaron las vesículas con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato de Sodio 0.1 M. Las preparaciones con exosomas de *L. mexicana* en suspensión fueron montadas en rejillas de formvard cubiertas con carbón-níquel y teñidas con solución de acetato de uranilo al 2% como reactivo para tinción negativa, **figura 10**. Las muestras fueron observadas en microscopio electrónico Jeol 1010, AMT Camera System.

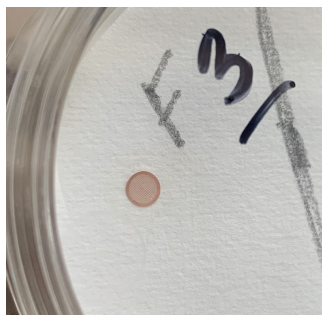


Figura 10. Montaje de exosomas en rejilla de formvard para su observación al microscopio electrónico.

7.6 Extracción de proteínas

Los exosomas aislados de pExo y aExo así como de los parásitos de fase estacionaria se lisaron en tampón RIPA (TrisHCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%) con un cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma-Aldrich) y se sonicaron tres veces (pulsos de 0,5 s / 32% de amplitud) a 22 ° C (celda SONICS-Vibra, Newtown, CT, EE. UU.). Las proteínas se cuantificaron utilizando un kit de fluorescencia EZQ (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). De acuerdo con las instrucciones

del fabricante. La integridad de las bandas de proteínas se verificó mediante kit de tinción con plata (Biorad, Hercules, CA, EE. UU.).

7.7 SDS-PAGE y Western Blot

El perfil de proteínas de gp63, HSP70, PP2C, CD63 y CD9 de amastigotes o lisados de exosomas (5 µg) se analizó mediante SDS-PAGE al 10% en Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, SDS al 0,1%). Para la inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a membranas de immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Posteriormente, las membranas se lavaron y bloquearon con leche descremada al 5% (Biorad) en TBS-T 1x (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%) durante 1 h. Como controles positivos, se utilizaron para gp63 (la proteína purificada de *L. mexicana*), HSP70 (un lisado de proteína de la línea celular 563), PP2C (PP2C recombinante de *L. major*), CD63 (lisado de proteína de la línea celular THP-1) y CD9 (lisado de proteínas de la línea celular de ovario) (1 µg de cada proteína). Los blots se incubaron en TBS-T / leche 1x durante la noche a 4 °C con los anticuerpos policlonales de conejo: anti-gp63 y anti-PP2C (generados en el laboratorio, contra gp63 nativa de promastigotes de *L. mexicana* y PP2C recombinante de *L. major*), ambos con una dilución 1:1000; los anticuerpos monoclonales de ratón: anti-HSP70 (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.), anti-CD63 y anti-CD9 (Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.) fueron utilizados a una dilución de 1:5000). Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T durante 1 hora y se incubaron con los anticuerpos secundarios IgG anti-conejo cabra conjugado con HRP o IgG anti-ratón cabra conjugado con HRP, respectivamente, a una dilución de 1:5000 (Biomeda,

Foster City, CA, EE. UU.) en TBS-T 1x con leche descremada al 1%. Las bandas fueron detectadas utilizando quimioluminiscencia (Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA), de acuerdo a las instrucciones de los proveedores.

Debido a la poca cantidad de proteína obtenida de los exosomas de promastigotes (pExo), los experimentos de infección y modulación de la respuesta solo se realizaron con los exosomas de amastigotes aExo, y se volvió a incluir a los pExo hasta el análisis proteómico.

7.8 Obtención de macrófagos derivados de la médula ósea

Los macrófagos de medula ósea, se diferenciaron de las células madre de la médula ósea obtenidas de los fémures y tibias de ratones BALB / c. Se extrajeron asépticamente los huesos largos de ratones BALB / c y se lavaron las células con PBS frío. Las células (2×10^6) se transfirieron en placas de Petri (Falcon, Corning, Nueva York, NY, EE. UU.) en medio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 20% de SFB y 20% de sobrenadantes de cultivo de fibroblastos L929, como factor estimulante de macrófagos (M-SCF, del inglés) (Théry *et al.*, 2006). Se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5% durante 7 días, **figura 11**. Luego se colectaron los macrófagos adheridos y se analizó la pureza del cultivo mediante citometría de flujo. La tinción con el anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) anti-F4 / 80 (FITC+) (Biolegend) mostró que el 98% de las células del cultivo eran macrófagos.

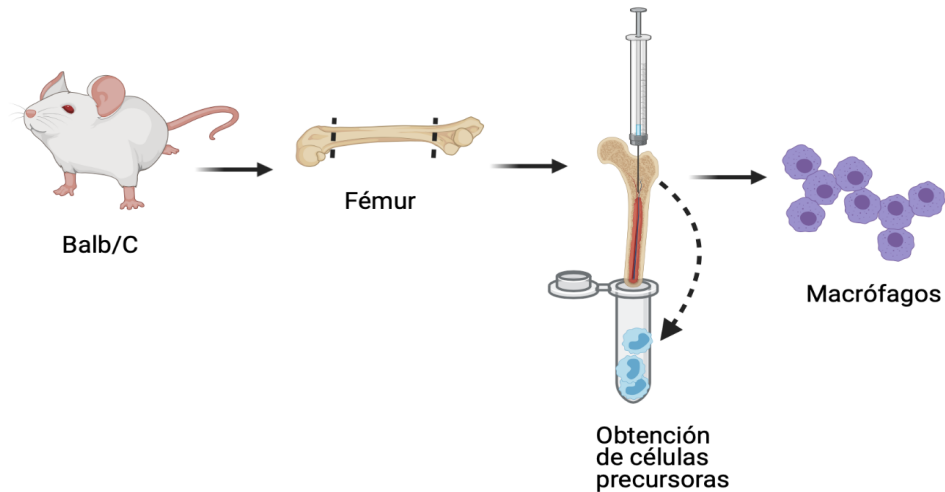


Figura 11. Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones Balb/C. Las células precursoras son cultivadas para que se diferencien en macrófagos utilizando sobrenadante L929. Creado con Biorender.

7.9 Microscopia confocal

En el laboratorio contamos con el mismo aislado de *L. mexicana* transfectado con la proteína reportera verde fluorescente (GFP), la transfección de dicha proteína fue realizada empleando un método previamente reportado (Eaglen *et al.*, 1995) utilizando la variante superfolder de la proteína verde fluorescente (sfGFP) (Diupotex *et al.*, 2018). Se aislaron exosomas de *L. mexicana* sfGFP de amastigotes y promastigotes, se analizó comparativamente su intensidad de fluorescencia intracelular, se utilizaron exosomas de promastigotes de *L. mexicana* sfGFP, ya que estos mostraron una señal fluorescente intracelular más fuerte. Los macrófagos (2.5×10^5) se incubaron con exosomas ($10 \mu\text{g} / \text{mL}$) en placas de cultivo de 24 pozos que contenían cubreobjetos de vidrio en RPMI-1640 suplementado con 10% SFB / -exo durante 2 y 6 h a 37°C y 5% CO_2 . Como control, se utilizaron células no estimuladas. Los macrófagos unidos a los cubreobjetos se

lavaron con PBS y la tinción intracelular se realizó con anti-CD63 (PE) de ratón (Biolegend). Los macrófagos se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% durante 20 min a 4 °C y se lavaron con tampón Perm / Wash 1x (Biolegend). La tinción se realizó con anti-CD63 diluido 1:100 en solución durante 30 minutos a 4 °C. Después de eso, las células se lavaron nuevamente con PBS 1x y los núcleos se tiñeron con DAPI en medio de montaje de fluoroshield (Sigma-Aldrich). Los macrófagos estimulados se visualizaron mediante microscopía confocal (Leica, TCS SP5, Leica Microsystems, EE.UU.), utilizando el software LAS X v. 3 para el análisis de imágenes.

8. Infección de macrófagos provenientes de medula ósea con amastigotes de *L.*

mexicana

Los macrófagos (3×10^5) se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos (Falcon-Corning) en medio RPMI-1640 complementado con 10% de SFB / -exo y se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min para permitir la adherencia. Las células se incubaron con amastigotes de *L. mexicana* en relación 1 : 5 (células / amastigotes) y para sincronizar la infección, las placas se centrifugaron a $2500 \times g$ durante 5 min. Posteriormente, las placas se incubaron durante 2 h a 33 °C, condición ideal para la infección por amastigotes en macrófagos (Diupotex *et al.*, 2019), finalmente, se cultivaron a 37 °C con 5% de CO₂ por 24 h favoreciendo las condiciones de cultivo para macrófagos.

8.1 Producción de óxido nítrico (NO)

La producción de ON por macrófagos infectados estimulados con aExo se determinó midiendo los niveles acumulados de nitritos en el medio de cultivo celular (Scott, 1985). Los macrófagos infectados se estimularon con LPS (100 ng / mL) y diferentes concentraciones de aExo en suspensión (2,5, 5, 10, 25 y 50 µg / mL) durante 24 h en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB / -exo a 37 °C con 5% de CO₂. Como controles, se utilizaron macrófagos infectados no estimulados y macrófagos infectados estimulados solo con LPS (100 ng / ml). Se colectaron los sobrenadantes y se cuantificaron los niveles de nitritos mediante la reacción de Griess (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 10 min, utilizando nitrito de sodio como curva estándar (0 - 100 µM). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (BioTek Instruments, Winooski) a 540 nm.

8.2 Ensayo de supervivencia de amastigotes intracelulares

Para analizar la supervivencia intracelular de amastigotes dentro de macrófagos en presencia de exosomas, se estimularon macrófagos infectados con aExo en suspensión (2.5, 5, 10, 25 y 50 µg / mL) durante 24 h en RPMI-1640, suplementado con 10% SFB / -exo a 37 °C en 5% de CO₂. Como controles, se utilizaron macrófagos infectados no estimulados y macrófagos infectados estimulados con LPS (100 ng / mL), ambos en ausencia de exosomas. Después de 24 h, los macrófagos infectados estimulados se lavaron con PBS y se incubaron adicionalmente en medio RPMI-1640 complementado con SFB al 10% / -exo a 26 °C durante 72 h, lo que llevó a la liberación gradual de

amastigotes viables, que se transformaron en promastigotes. Los promastigotes diferenciados se fijaron en glutaraldehído al 2% y se contaron en una cámara de Neubauer.

8.3 Citometría de flujo

El análisis de la expresión de las moléculas presentadoras de antígenos y las moléculas de coestimulación de los macrófagos infectados y estimulados, se realizó mediante citometría de flujo. Los macrófagos se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* y se estimularon con aExo, como se describió anteriormente. Para separar las células adheridas después de la estimulación, se añadió PBS frío a cada pozo y se liberaron los macrófagos mediante presión mecánica. Las células se incubaron con anti-CD16 / CD32 (Biolegend) durante 20 min a 4 °C para evitar la unión inespecífica. Las moléculas presentadoras de antígeno se analizaron teñiendo las células con mAbs de ratón (Biolegend) anti-MHC-I (PE), anti-MHC-II (APC-Cy7) y anti-CD1d (FITC). Las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras se tiñeron con anti-CD86 de ratón (PerCP-Cy5.5) y anti-PD-L1 (PE-Cy7), respectivamente. Todos los anticuerpos se diluyeron 1: 100 y se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 4 °C. A continuación, las células se lavaron con PBS, se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 20 min a 4°C y se resuspendieron en PBS para el análisis. Los eventos se registraron para muestras individuales utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II. Los datos se analizaron con el software FlowJo v.10 (Treestar, Ashland, OR, EE. UU.).

8.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, Inc., CA, EE. UU.). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney U. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

8.5 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

Se obtuvo el lisado de proteínas de exosomas de amastigotes *L. mexicana* (aExo) del aislado MHOM/MX/2011/Lacandona para ser procesado por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS del inglés) con la finalidad de identificar las proteínas contenidas en los aExo, estas fueron comparadas con las de los exosomas de promastigotes (pExo) del mismo aislado y con lo reportado en Uniprot.

Las muestras fueron purificadas con Exo Easy Maxi kit Qiagen (Qiagen, Germany), se lisaron con buffer de Urea 6M, Tris HCl 150 mM/pH 8.0 e inhibidores de proteasas. Los lisados se sonicaron por 3 ciclos (pulso de 0,5 s / 32% amplitud) a 22 °C en celda (SONICS-Vibra, Newtown, CT, EE. UU), se mezclaron con vórtex por 3 ciclos 30 s. Posteriormente, de los lisados se obtuvieron aproximadamente 500 µl y fueron preservados a -70 °C hasta su uso. Las muestras fueron cuantificadas por el método de EZQ, la intensidad de fluorescencia en cámara UV 485/590 nm y la intensidad de fluorescencia se analizó por Image Quant. Se corroboró la cuantificación por el método

de BCA Pierce, Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA) obteniendo 80 - 150 μg / 500 mL.

8. 6 Preparación de las muestras para análisis proteómico

Se procesaron dos muestras para identificación de proteínas por HPLC-MC. Una del lisado de los exosomas amastigotes de *L. mexicana* y la otra de lisado de exosomas de promastigotes. Los 500 μl de los lisados fueron tratados con ditioneitol 10 mM para reducir los puentes disulfuro y sometidas a alquilación con iodoacetamida 25 mM BioRad (Hercules, CA, USA). Posteriormente fueron digeridas con Lys-C + Tripsina grado secuenciación (Promega, Walldorf, Germany) y los péptidos obtenidos se purificaron con una microcolumna de fase reversa para finalmente secarlos con un evaporador (SpeedVac).

8. 7 Análisis proteómico por HPLC-MS

Se empleó un cromatógrafo de líquidos (Eksigent nanoLC 425), una precolumna ChromXP C18, 350 μm x 0.5 mm x 3 μm y una columna analítica nano ChromXP C18, 75 μm x 15cm x 3 μm . Los péptidos se resuspendieron en disolución de acetonitrilo 2% v/v, ácido fórmico 0.1% v/v en H₂O milliQ (disolvente A), se cargaron en la precolumna con el disolvente A y se separaron en la columna analítica aumentando gradualmente la proporción de un disolvente B consistente en acetonitrilo 99.9% v/v, ácido fórmico 0.1% v/v. El porcentaje de B se incrementó de 3% a 30% en los primeros 60 min y luego

a 40% en los siguientes 10 min; después se lavó la columna con 80% de B por 6 min y se regresó a las condiciones iniciales.

La columna cromatográfica se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución (AB Sciex 5600+). La adquisición de datos consistió en la lectura de las relaciones m/z de los iones en el intervalo 350-1250 durante 250 ms, seguida de fragmentación de los 20 iones más intensos y lectura de su espectro de masas en el intervalo m/z 100-1800 con tiempo de acumulación de 50 ms. Se empleó modo positivo, voltaje de 2400 y temperatura de interfaz de 100 °C. Los resultados se analizaron con el software ProteinPilot 5.0 empleando la base de datos de *Leishmania mexicana* (strain MHOM/GT/2001/U1103).

9. Resultados

9.1. Los exosomas derivados de SFB no afectan el crecimiento de los parásitos de *L. mexicana* en cultivo

Para determinar si se requieren exosomas contenidos naturalmente en el SFB para el crecimiento de parásitos, se realizaron curvas de crecimiento de los parásitos, las curvas se mantuvieron durante 6 y 10 días para evaluar el crecimiento de promastigotes y amastigotes, en medio 199 y medio de Grace's, respectivamente y suplementados con SFB normal o SFB s/ -exo. Las curvas mostraron que los parásitos crecieron igual en los cultivos suplementados con SFB s/ -exo, en comparación con los de SFB normal. Se observó que los cultivos llegaron a la fase estacionaria en el día 5 y en el día 7, respectivamente, luego los cultivos disminuyeron su crecimiento, **figura 12**. Los resultados muestran que los exosomas naturalmente presentes en el SFB no interfieren en el crecimiento de los parásitos en los cultivos.

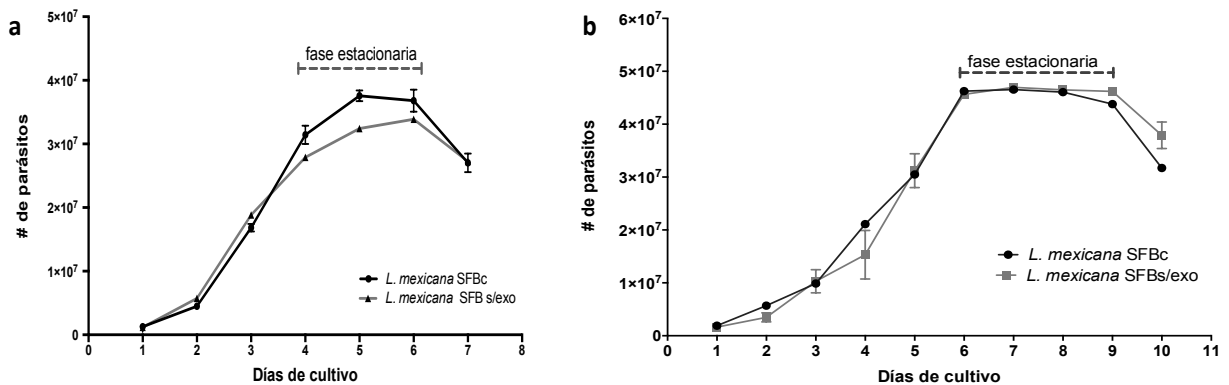


Figura 12. a) Cultivo de promastigotes en medio 199 durante 7 días. b) Cultivo de amastigotes en medio de grace's durante 10 días. n=3.

9.2. La eliminación de exosomas del SFB no fue completa

Siguiendo las metodologías descritas para eliminar los exosomas del suero fetal bovino (Eitan *et al.*, 2015; Hassani *et al.*, 2013; Lässer *et al.*, 2012; They *et al.*, 2009 Shelky *et al.*, 2014). Utilizamos perlas de referencia de diferentes tamaños entre 0.1 – 2 μm , **figura 13 - a**. Observamos que al filtrar y ultracentrifugar el suero también eliminamos las microvesículas de mayor tamaño $\sim 500 \mu\text{m}$ que se encontraban presentes, **figura 13 - b**. La finalidad del proceso fue evitar contaminación con exosomas del suero fetal bovino obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de parásitos y que estos infirieran con el análisis proteómico e influyeran en el crecimiento de los cultivos. Sin embargo, no se logró eliminar el 100% de los exosomas contenidos en el SFB quedando exosomas residuales en baja cantidad, **figura 13 - c**.

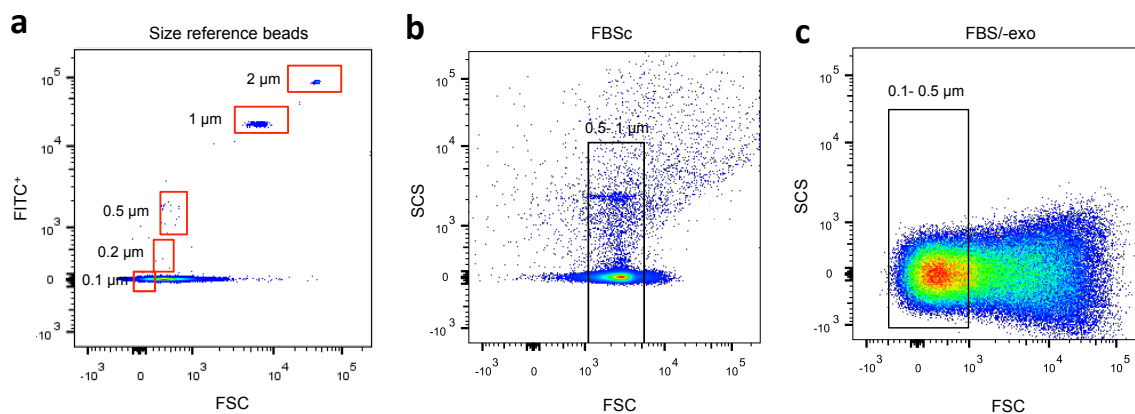


Figura 13. Análisis de citometría de flujo de la eliminación de exosomas del SFB mediante ultracentrifugación (SFBs / exo). a) El citómetro de flujo se calibró con perlas de referencia FITC + (0,1-2 μm). b) Citometría de flujo completa (SFBc). c) Citometría de flujo de FBS desprovisto de exosomas (SFB / -exo).

9.3. Los exosomas secretados por amastigotes de *L. mexicana* contienen gp63 y PP2C, el parásito CD9

Para verificar que las vesículas aisladas de los cultivos de amastigotes fueran exosomas se consideraron las siguientes características: su tamaño y la expresión de proteínas del parásito (gp63 y PP2C), así como los marcadores exosomales de mamífero (CD63 y CD9). La microscopia electrónica de transmisión (MET) reveló que las vesículas aislados del sobrenadante midieron entre ~80 - 100 nm de diámetro, **figura 14 - a**. Mediante fraccionamiento proteico en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% teñido con plata, se observó que el perfil proteico del lisado de amastigotes de *L. mexicana* tiene un patrón de bandeo diferente comparado con el de sus exosomas (aExo), **figura 15 - c**. No se encontró evidencia de la expresión de CD63, CD9 (63 kDa y 25 kDa respectivamente) y de HSP70 (70 kDa) en los exosomas de amastigotes. Se detectó la presencia de gp63 y PP2C en los exosomas de amastigotes (63kDa y 70kDa respectivamente). Como control positivo se utilizó el extracto proteico de amastigotes donde pudimos observar la presencia de gp63, PP2C y CD9, **figura 15 - d**. Se observó que la proteína PP2C en el extracto proteico de los exosomas tuvo un peso molecular de ~70 kDa, mientras que el extracto proteico de amastigotes tuvo un peso molecular de ~45 kDa, en ambos extractos se observó la expresión de gp63 y PP2C, mientras que CD9 solamente se observó en el extracto de amastigotes. Adicional a estos resultados, en el Anexo I se puede observar la inmunodetección por WB de gp63 como a PP2C en los exosomas de promastigotes LCL (pExo) y los exosomas de promastigotes sfGFP (exoGFP), **figura complementaria 2**.

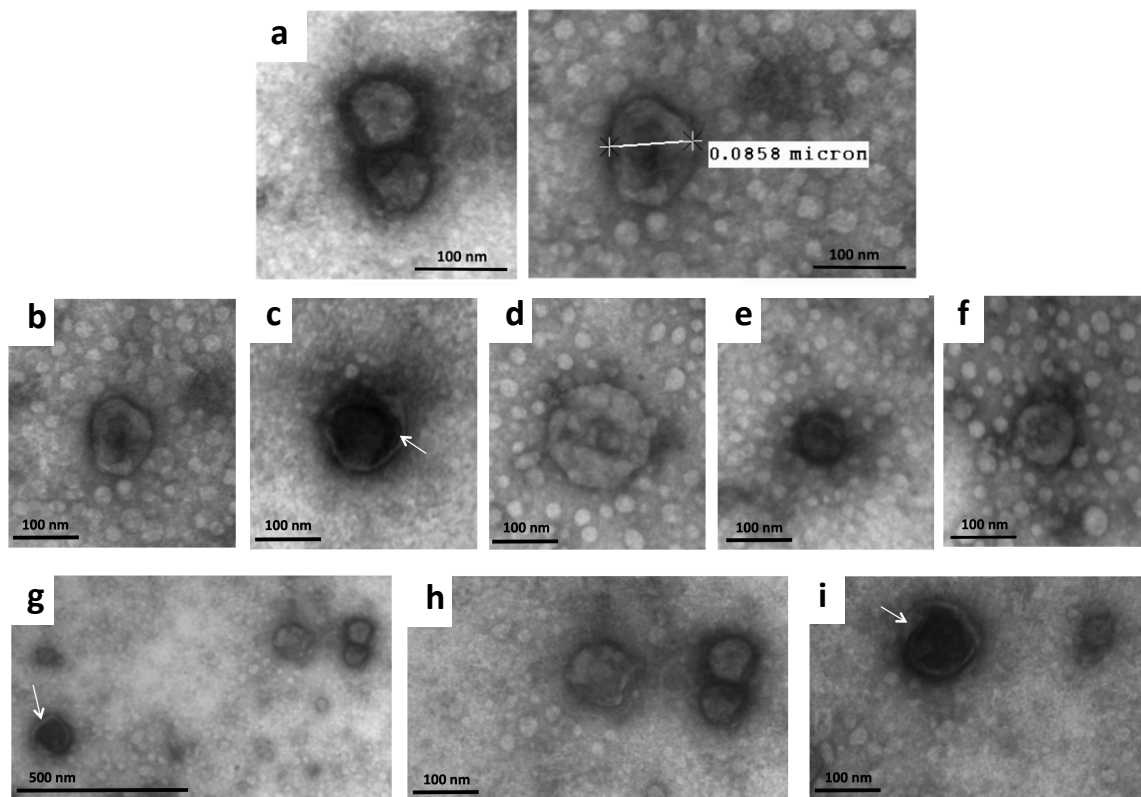


Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de exomas de *L. mexicana*. a) Microscopía electrónica de transmisión de exomas con tinción negativa. Imagen de la izquierda: exomas contenidos en membranas, aumento de 120.000x. Imagen de la derecha: exoma con un diámetro de ~ 85 nm, aumento de 160.000x. Se observó un número moderado de vesículas con una técnica de tinción negativa, en contraste con acetato de uranilo al 2%. b-f, microfotografías de vesículas cuyos diámetros oscilan entre 30-150 nm de diámetro correspondientes a exomas, Bar: 100 nm. c, g - i, en estos exomas se puede apreciar la membrana bicapa lipídica de los exomas (flechas blancas). F, se observan varios exomas en el campo. Bar: 500 nm. Algunos exomas que mostraban tinciones más oscuras incorporaron una mayor cantidad de agente de contraste.

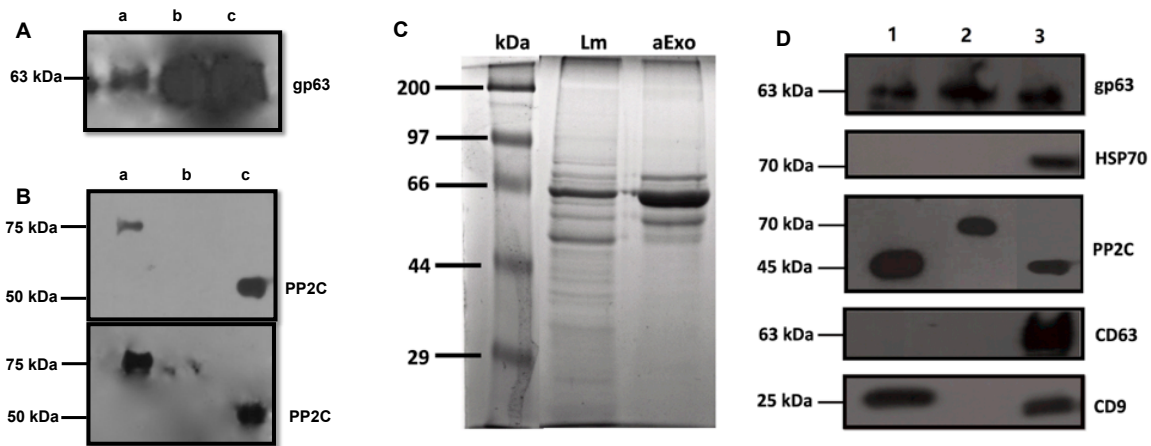


Figura 15. Caracterización de exosomas de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*. A) Inmunodetección de gp63, B) Inmunodetección de PP2C en los lisados de exosomas de promastigotes de *L. mexicana*. Carril a: lisado de exosomas pExo, Carril b: lisado de exosomas aExo, Carril c: controles positivos. C) Perfil proteico del extracto de amastigotes de *L. mexicana* (Lm) y de sus exosomas (aExo) en SDS-PAGE al 10% con tinción de plata. D) Inmunodetección de gp63, HSP70, PP2C, CD63 y CD9 en lisados de amastigotes de *L. mexicana* y sus exosomas. Carril 1: lisado de amastigote; Carril 2: lisado de exosoma; Carril 3: controles positivos gp63 purificada de *L. mexicana* (Lm), HSP70, fPP2C (PP2C recombinante de *L. major*), CD63 y CD9.

9.4 Los exosomas de *L. mexicana* son internalizados por macrófagos de médula ósea y colocalizados con la tetraspanina CD63

Para demostrar que los macrófagos internalizan exosomas de *L. mexicana*, se purificaron exosomas de parásitos de *L. mexicana* transfectados con sfGFP, Anexo I, **figura complementaria 1**. Los macrófagos se estimularon con exosomas verdes fluorescentes (10 µg / mL) durante 2 y 6 h, se analizaron mediante microscopía confocal. Las microfotografías revelaron que los macrófagos no estimulados no exhibían fluorescencia verde en su citoplasma, aunque estas células mostraban el

marcador de tetraspanina CD63 en su membrana celular, **figura 16 - a**. A las 2 h de incubación se comienzan a evidenciar exosomas verdes en el citoplasma de los macrófagos, **figura 16 - b**, y a las 6 h se incrementa la internalización de exosomas y se observan algunos exosomas en la región perinuclear, formando agregados que colocalizan con la tetraspanina CD63 (marcador exosomal de células mamíferas), posiblemente en endosomas tardíos, **figura 16 - c**. Esto no se evidenció después de 2 h de incubación. Estas observaciones demuestran que los exosomas de *L. mexicana* se internalizaron eficazmente en los macrófagos.

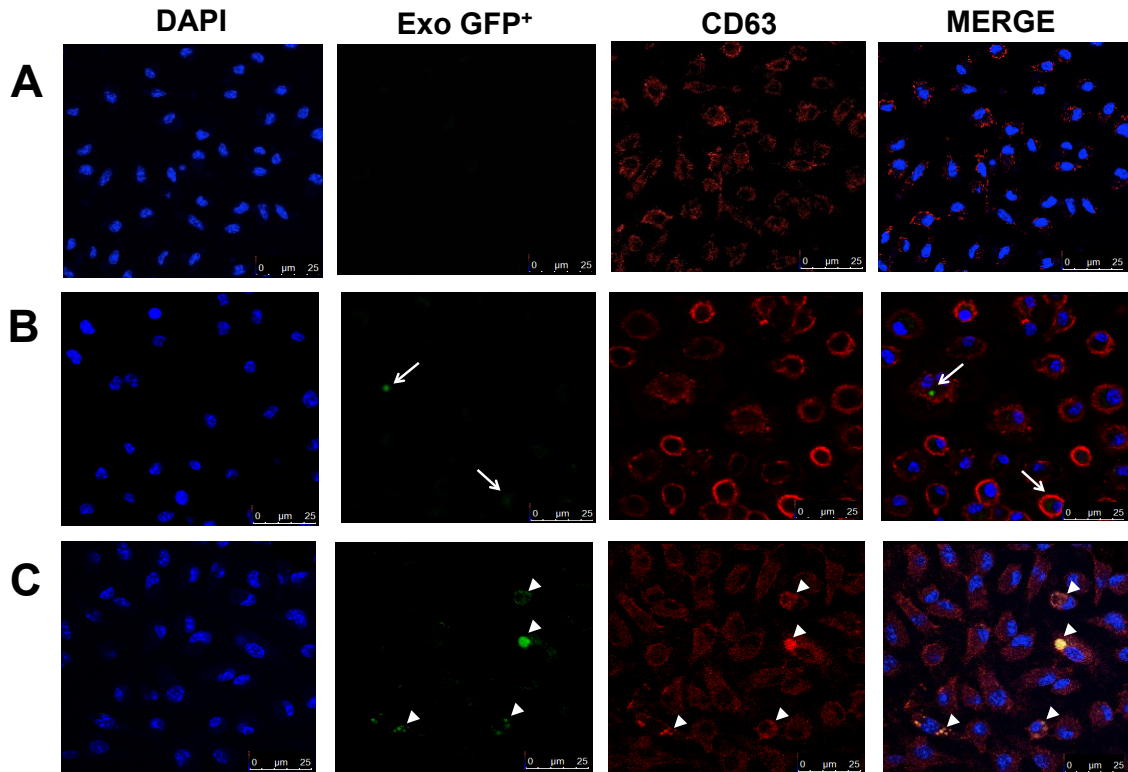


Figura 16. Los exosomas de *L. mexicana* internalizados por macrófagos de médula ósea se colocalizan con CD63. Microscopía confocal de macrófagos incubados con exosomas de *L. mexicana* GFP + (exoGFP +) durante 2 y 6 horas. Panel A: macrófagos en condición basal. Panel B: Después de 2 horas de incubación con exosomas sfGFP, se encuentran en el citoplasma de macrófagos con puntillero verde (flechas). Se evidencia la tinción roja del marcador de tetraspanina BMM CD63. Panel C: macrófagos incubados durante 6 horas con exoGFP. La tinción DAPI (DAPI +) muestra los núcleos en azul, mientras que la tetraspanina celular CD63 se tiñe en rojo (PE) y los exosomas de *L. mexicana* GFP + muestran tinción verde (exoGFP). La imagen combinada muestra tinción amarilla (puntas de flecha) como resultado de la co-localización de tetraspaninas rojas (CD63-PE +) de macrófagos de médula ósea y exosomas de parásitos verdes (GFP +). Las imágenes son representativas de dos 2 experimentos independientes.

Adicionalmente se realizó este mismo experimento pero incluyendo la molécula MHC-II. Se observó que los exosomas se internalizan al citosol de la célula desde las 2 h, curiosamente los macrófagos que tienen más exosomas sfGFP en su citosol expresan menos MHC-II, lo que se relaciona con el resultado de citometría donde los exosomas reducen la fluorescencia de esta molécula presentadora de antígenos. Anexo I, figura complementaria 3.

9.5 Los aExo de *L. mexicana* disminuyen la producción de ON y mejoran la supervivencia de los parásitos dentro de los macrófagos infectados

Debido a la poca cantidad (mg) de proteína obtenida de los exosomas de promastigotes los experimentos de estimulación con exosomas en macrófagos infectados solo se realizaron de los exosomas de amastigotes.

Se evaluó la producción de nitritos en los macrófagos infectados incubados con diferentes concentraciones de exosomas de amastigotes. Se observó que la producción de nitritos tiene una tendencia a disminuir de manera dosis dependiente a mayor concentración de exosomas de amastigotes, observándose en la concentración más alta 50 µg/mL una disminución del 50%, **figura 17 - a**. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los exosomas para favorecer la supervivencia del parásito dentro del macrófago. Se cuantificaron los parásitos sobrevivientes a las 96 h luego de parasitar al macrófago y ser incubado con diferentes concentraciones de exosomas durante 24 h, demostrándose que hay un aumento de la supervivencia de los parásitos de manera dosis dependiente, mostrándose en la concentración más alta 50 µg/mL un incremento del 61.5% en la supervivencia del parásito ($p < 0.05$), **figura 17 - b**. El control positivo

de macrófagos infectados estimulados con LPS disminuyó la cantidad de parásitos ($p < 0.05$).

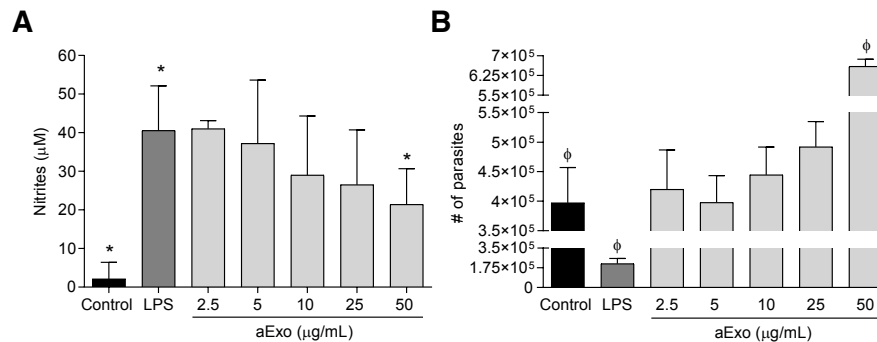


Figura 17. Los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* favorecen la supervivencia del parásito dentro de los macrófagos infectados. Los macrófagos infectados, estimulados con LPS, se incubaron con diferentes concentraciones de exosomas en suspensión (2.5, 5, 10, 25 y 50 µg / mL) durante 24 horas. Como controles, se utilizaron células infectadas no estimuladas con LPS y células infectadas estimuladas con LPS, ambos en ausencia de exosomas. Se eliminaron los sobrenadantes y las células se cultivaron durante 72 horas más en medio de cultivo a 26 °C. A) Se cuantificó la producción de nitrato en los sobrenadantes de macrófagos infectados estimulados con exosomas. B) Se analizó la supervivencia de parásitos intracelulares (amastigotes) contando la aparición de promastigotes en los cultivos. Los datos se presentan como media +/- DE de n = 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, $p < 0,05$ se consideró significativa.

9.6 Los aExo de *L. mexicana* modulan la expresión de MHC-I y CD1d en macrófagos infectados

Se analizó la expresión de moléculas coestimuladoras de la activación en macrófagos infectados incubados con exosomas: una molécula activadora CD86 y una molécula inhibidora PD-L1, figura 18. Se observó que hay disminución a manera dosis dependiente de la expresión de ambas moléculas CD86 y PD-L1, **figura 18 - A y 18 - B,**

respectivamente, siendo significativa para ambas moléculas las concentraciones más altas 25 y 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($p < 0.05$), en donde se observó una disminución de la expresión del $\sim 60\%$ y $\sim 16\%$ respectivamente. El control positivo de macrófagos infectados estimulados con LPS incrementó la expresión de todas las moléculas ($p < 0.05$). Estos datos sugieren que los aExo modulan moléculas presentadoras de antígeno en macrófagos infectados.

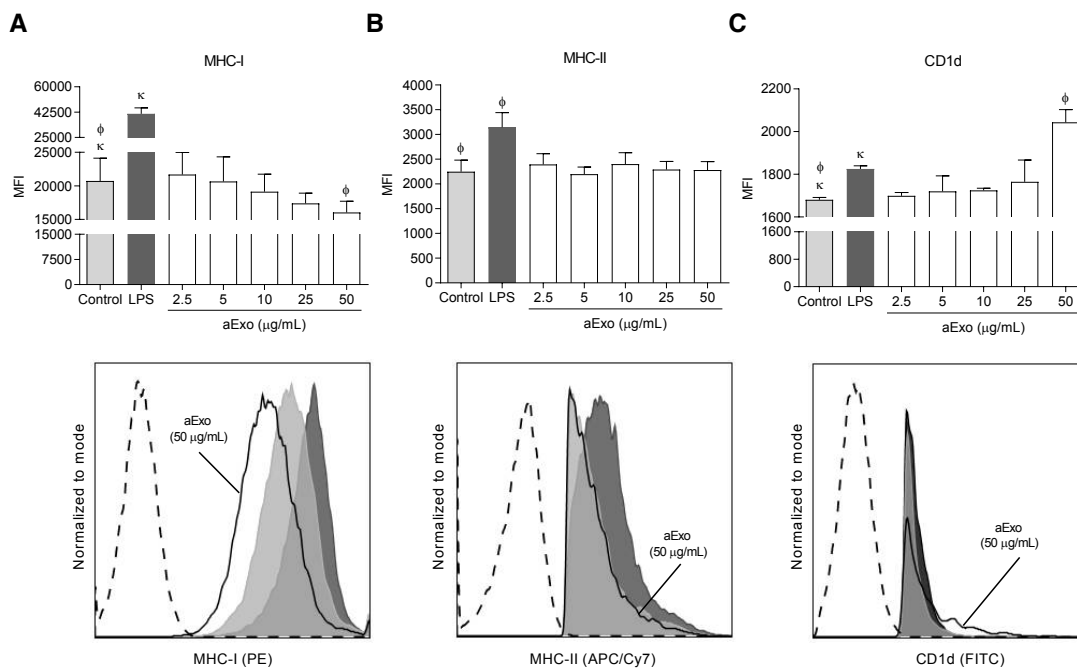


Figura 18. Los exosomas de *L. mexicana* modulan la expresión de MHC-I y CD1d. Los macrófagos infectados se incubaron con diferentes concentraciones de exosomas en suspensión (2.5, 5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) durante 24 horas. A) Expresión de MHC-I, B) Expresión de MCH-II, C) Expresión de CD1d. Se incubó un control positivo con LPS. Los datos se presentan como media \pm DE de $n = 5$ experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, $p < 0,05$ se consideró significativa.

9.7 Los aExo de *L. mexicana* regulan a la baja las moléculas coestimuladoras en macrófagos infectados

Considerando que los aExo de *L. mexicana* alteran la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno en macrófagos infectados, también se analizaron las expresiones de moléculas coestimuladoras en macrófagos infectados estimulados con exosomas de amastigotes. Estos incluyeron la molécula de activación CD86 y la molécula coestimuladora inhibidora PD-L1. Se observó una reducción significativa dosis dependiente de la expresión de ambas moléculas en macrófagos infectados después de la incubación de concentraciones de aExo superiores a 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($p < 0.05$), **figura 19**. La disminución de la expresión de CD86 fue aproximadamente del 60% (el control 4,694 \pm 1,473 vs. aExo 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 2,996 \pm 157.9), **figura 19 - A**, mientras que la reducción de PD-L1 fue de alrededor del 20% en células estimuladas con 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de aExo (el control 25,192 \pm 1,793 vs. aExo 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 20,917 \pm 1,707), **figura 19 - B**, en comparación con los macrófagos infectados no estimulados. El control positivo de macrófagos infectados estimulados con LPS condujo a una mayor expresión de PD-L1, en comparación con el control ($p < 0.05$), pero no se observó ningún cambio significativo en la expresión de CD86. En conjunto, estas observaciones sugieren que los aExo de *L. mexicana* regulan negativamente las moléculas coestimuladoras, como CD86 y PD-L1.

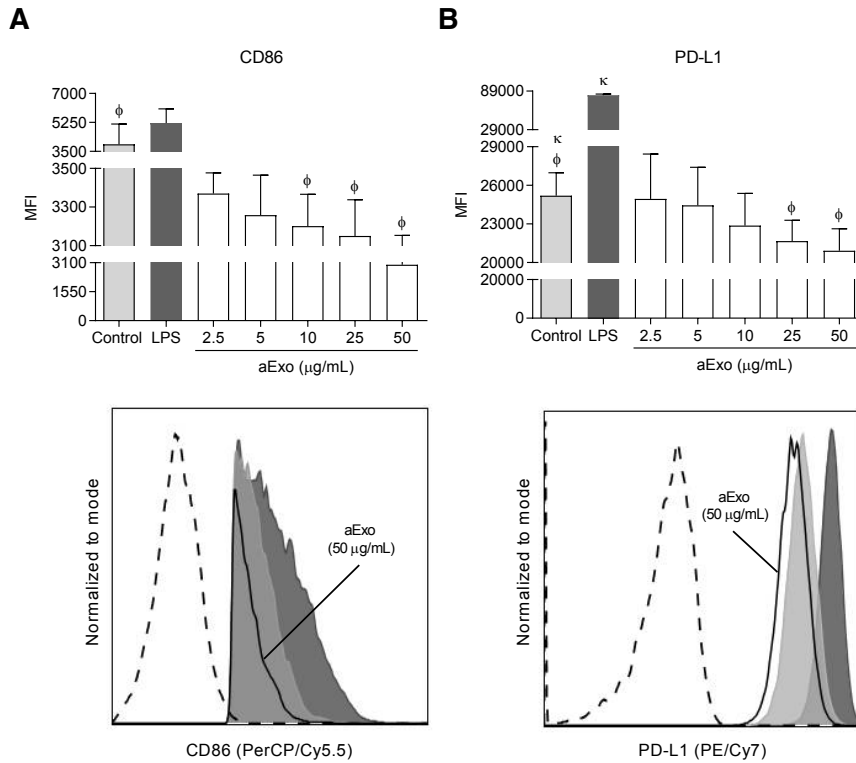


Figura 19. Los exosomas de *L. mexicana* modulan la expresión de moléculas coestimuladoras de macrófagos infectados estimulados con LPS. Los macrófagos infectados, estimulados con LPS, se incubaron con diferentes concentraciones de exosomas en suspensión (~ 2.5, 5, 10, 25 y 50 µg / mL) durante 24 horas. Se analizaron las expresiones de CD86 y PDL-1. A) Expresión de CD86; B) Expresión de PD-L1. Los datos se presentan como media +/- DE de n = 5 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, p <0,05 se consideró significativa.

9.8 Se identifico a gp63 y PP2C en el análisis proteómico

Se identificaron más de 256 proteínas en los pExo, utilizando para la comparación la base de datos de *Leishmania mexicana* (strain MHOM/GT/2001/U1103) en Uniprot <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=mhom+gt+2001+u1103&sort=score>. Entre

las proteínas identificadas se observaron la proteasa de superficie la leishmanolisina de 63 kDa (gp63), los factores de elongación EF-1 α y EF-1 β y el EF-2, algunas proteínas de choque térmico (HSP) de 70, 83 kDa y algunas proteínas fosfatasa como la proteína fosfatasa de serina / treonina y la PP2C, entre otras proteínas, **tabla 2**.

Tabla 2. Proteínas identificadas mediante HPLC-MS de los exosomas de promastigotes (pExo) y exosomas de los amastigotes (aExo) de *Leishmania mexicana*.

Proteína	pExo	aExo	Accession (Uniprot)	Función
Leishmanolisina, gp63	+	-	tr E9AN57 E9AN57_LEIMU	<i>Proteasa de superficie</i>
	+	-	tr E9AN54 E9AN54_LEIMU	
Factor de Elongación 1 alfa, EF-1	+	-	tr E9ASD6 E9ASD6_LEIMU	<i>Factores de Elongación</i>
Factor de Elongación 1 beta, EF-1	+	-	tr E9B4Q5 E9B4Q5_LEIMU	
Factor de Elongación 2	+	-	tr E9ASD6 E9ASD6_LEIMU	
70 kDa putativa	+	+	tr E9B099 E9B099_LEIMU	<i>Proteínas de choque térmico</i>
83-1 kDa	+	+	tr E9B3L2 E9B3L2_LEIMU	
PP2C	+	-	tr E9B0G2 E9B0G2_LEIMU	<i>Proteína fosfatasa 2 dependiente de metal</i>
Fosfatasa ácida secretora de histidina putativa	+	-	tr E9AU82 E9AU82_LEIMU	<i>Proteínas Fosfatasas</i>
Proteína fosfatasa serina/treonina	+	-	tr E9B387 E9B387_LEIMU	
Nitrofenilfosfatasa putativa	+	-	tr E9B234 E9B234_LEIMU	
Tubulina de cadena alfa	-	+	tr E9AP62 E9AP62_LEIMU	<i>Proteína de citoesqueleto</i>
Tubulina de cadena beta	+	-	tr E9AMJ8 E9AMJ8_LEIMU	
Proteína quinasa A subunidad catalítica isoforma 1	-	+	tr E9B6S9 E9B6S9_LEIMU	<i>Proteína quinasas</i>
Tirosina aminotransferasa putativa (LiTAT)	-	+	tr E9AT13 E9AT13_LEIMU	<i>Proteína metabólica</i>

En los aExo solo se identificaron entre 5 a 15 proteínas utilizando la base anteriormente mencionada. Entre las proteínas identificadas se encuentran la proteína de choque térmico (HSP) de 70 kDa y la proteína de 83 kDa, la tubulina de cadena α , una proteína del citoesqueleto, una proteína quinasa A (isoforma 1) y una enzima que participa en el metabolismo del parásito la proteína tirosina aminotransferasa (LiTAT) (Moreno-Izquierdo *et al.*, 2014) las cuales se muestran en el **tabla 2**.

A continuación, se muestra una secuencia de la proteína gp63 y hsp83, **figura 20 y figura 22**, de los exosomas pExo, donde se identificaron algunos péptidos con buena intensidad de señal, en color verde se observan los péptidos identificados con un nivel de confianza de 95%. En las imágenes siguientes, **figura 21 a – d** y **figura 23 a – d**, se observan los espectros cromatográficos de la proteína gp63 y hsp83, respectivamente, de algunos péptidos identificados dentro de la secuencia.

Leishmanolysin
 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103)

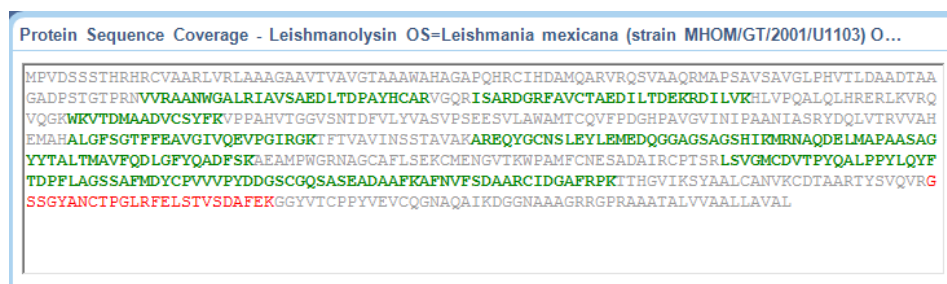
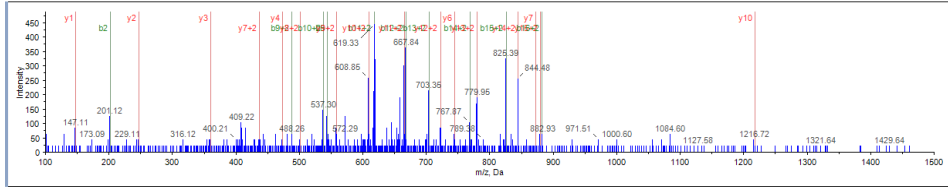


Figura 20. Secuencia de la proteína gp63 (leishmanolisina).

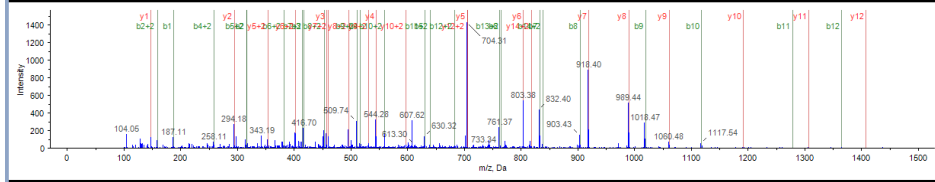
CAM: Cysteine Carbamidomethylation

a **ISARDGRFAVQ****CAM****JTAEDILTDEKRDILVK**

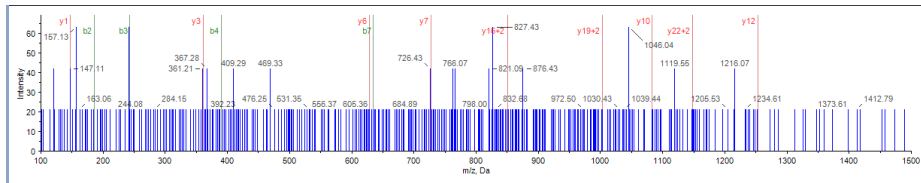


CAM: Cysteine Carbamidomethylation

b **WKV/TDMAADVQ****CAM****JSYFK**



c **ALGFSGTFFEAVGIVQ****EVPGIRGK**



Dea: Deamidated

d **MRNAQDELMAPAASAGYYTALTM****AVFQ****Dea****DLGFYQADFSK**

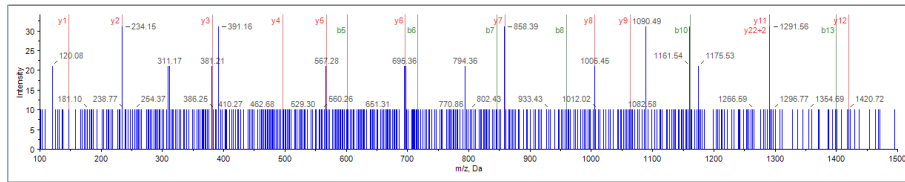


Figura 21. Espectros cromatográficos de algunos péptidos de la proteína gp63.

Heat shock protein 83-1

OS=*Leishmania mexicana* (strain MHOM/GT/2001/U1103)

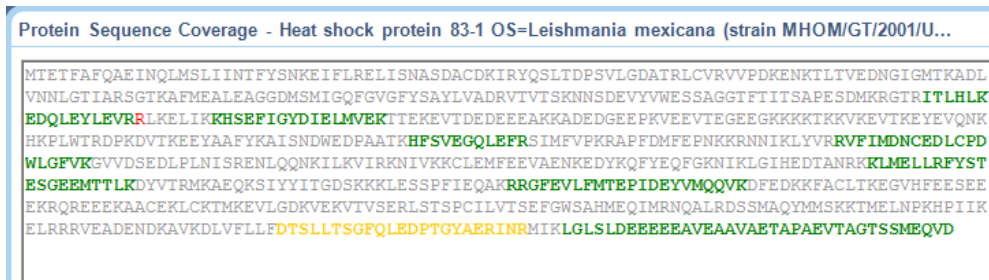
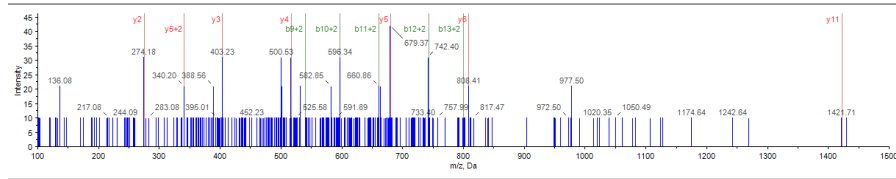
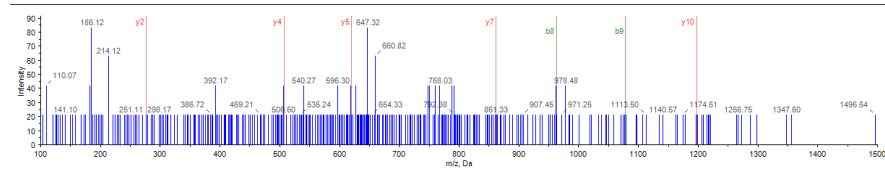


Figura 22. Secuencia de la proteína de choque térmico de 83 kDa.

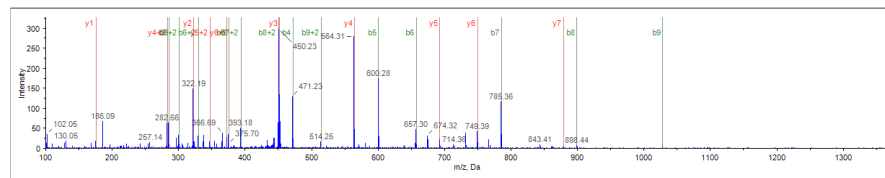
a **ITLHLKEDQLEYLVR**



b **KHSEFIGYDIELMVEK**



c **HFSVEGQLEFR**



CAM: Cysteine Carbamidomethylation

d **RVFIMDNQCAMJEDLQCAMJPDWLGFVK**

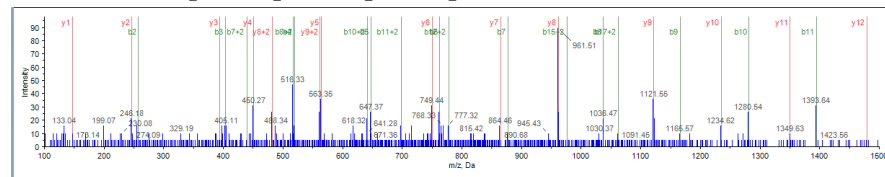


Figura 23. Espectros cromatográficos de algunos péptidos de la proteína de choque térmico de 83 kDa.

10. Discusión

Los exosomas son nanovesículas derivadas de la membrana endocítica que contienen biomoléculas funcionales que incluyen ADN, ARN, ARNm, miARN, lípidos y proteínas. Estas vesículas tienen la capacidad de viajar en los fluidos corporales y son capaces de modificar las respuestas celulares como la respuesta inmune (Bryan y Grisham *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2019). Son internalizadas por endocitosis o fusiones de membrana, y una vez dentro de las células, como los macrófagos, son transportadas en endosomas y pueden colocalizar con la tetraspanina CD63 en endosomas tardíos (Shelke *et al.*, 2014). Además del marcador CD63, las membranas exosómicas están enriquecidas con otras tetraspaninas específicas como CD9, CD81, CD82 y CD37 (Subra *et al.*, 2010), de ellas se han descrito varias actividades en las que participan, como la diferenciación, la adhesión, motilidad, agregación y señalización celular (Hu *et al.*, 2015).

Este estudio mostró que los exosomas de amastigotes no solo inhiben la producción de óxido nítrico, sino que también favorecen la supervivencia del parásito dentro de los macrófagos infectados, modulando las moléculas presentadoras de antígenos en las células infectadas.

Se ha descrito que los exosomas contenidos en el SFB pueden inducir cambios fenotípicos, afectar la proliferación y migración celular (Bates, 1994; Silverman *et al.*, 2010; Shelke *et al.*, 2014; Angelini *et al.*, 2016) por lo que nosotros eliminamos de forma casera los exosomas contenidos en el SFB. Curiosamente, la eliminación de los

exosomas de SFB no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de los amastigotes de *Leishmania* en los cultivos.

Los exosomas identificados en los amastigotes de *L. mexicana* tienen un diámetro promedio de aproximadamente 85 nm, que se encuentra dentro de los límites (30-150 nm) descritos para exosomas de células eucariotas (Skotland *et al.*, 2017). El patrón de bandeado del lisado de proteínas de los exosomas de amastigotes mostró que su contenido difería de los lisados del amastigote, lo que concuerda con la literatura, donde se han reportado más proteínas en lisados de parásitos en comparación con sus exosomas (Silverman *et al.*, 2010).

La ausencia de la expresión de CD63 y CD9 en los exosomas de amastigotes, sugiere que no había contaminación por exosomas del SFB, ya que en otros trabajos se ha observado presencia de estas tetraspaninas en los exosomas del suero bovino (Abramowicz *et al.*, 2018; Aswad *et al.*, 2016), no obstante, en la citometría de flujo si se observaron exosomas residuales aún presentes luego de la eliminación de exosomas del SFB, **figura 13**. Adicional a los resultados de proteómica obtenidos en el caso de exosomas de amastigotes, que sugieren presencia de exosomas del SFB, Anexo II, **tabla 5**.

Se identificó la tetraspanina CD9 solamente en el lisado de amastigotes pero no en el de sus exosomas, **figura 15**, que era lo esperado pues se ha identificado la proteína solo en células y exosomas provenientes de células. Este resultado es interesante ya que se ha descrito que esta proteína integral de membrana está asociada a integrinas que

regulan procesos como la agregación y adhesión celular. En macrófagos se sabe que se asocia con CD81 e integrinas $1-\beta$ y $1-\gamma$ ([Genecards, genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD9](http://Genecards.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD9).) en parásitos se ha visto envuelta en la evasión inmunológica ([Hu et al., 2015](#)).

Por otro lado, la HSP70 había sido descrita previamente en exosomas de promastigotes de *Leishmania*, sometidos a choque de calor a 37 °C ([Andreu y Yáñez-Mó, 2014](#); [Silverman et al., 2010](#)) y en nuestros resultados de WB no se observó, sin embargo en el análisis proteómico si se alcanza a detectar la proteína en ambos exosomas, tanto pExo como aExo, **tablas 3 y 4**. Esto pudiera explicarse por las diferencias realizadas en los cultivos para secreción ya que se ha reportado que el pH y temperatura influyen tanto en la cantidad como en la composición proteica de los exosomas ([Hassani et al., 2011](#); [Gabriel et al., 2021](#)). El medio de cultivo donde crecieron los promastigotes hasta su fase estacionaria (día 5) fue de un pH más alcalino, posteriormente se realizaron lavados con PBS de los parásitos y se colocaron en medio nuevo sin presencia de SFB, los promastigotes fueron sometidos a un choque de calor a 37 °C durante 4 h para estimular la secreción de vesículas de acuerdo con los reportes descritos ([Silverman et al., 2010](#); [Hassani et al., 2011](#)) y posteriormente se obtuvieron los exosomas del sobrenadante sin SFB.

En el caso de los amastigotes fueron crecidos hasta su fase estacionaria (día 7) en un medio de cultivo con un pH más ácido 5.5, estos parásitos no fueron sometidos a choque térmico y los exosomas fueron obtenidos del sobrenadante producto de ese cultivo. Se

segunda porque se tenía evidencia que en fase estacionaria los amastigotes axénicos tiene un aumento en el número de megasomas, esto a un pH de 5.5 y una temperatura de 33 °C, donde se observó que hay mayor actividad lítica por azocaseína que a temperatura de 34 °C (n= 10). Dado que los megasomas son los organelos secretores de proteínas se sugiere que la disminución en la actividad lítica de la azocaseína se ve afectada por la temperatura lo que concuerda con lo observado por Silverman años más tarde en los cultivos de promastigotes para la obtención de sus exosomas, donde la temperatura y el pH modificaron la expresión de las proteínas en exosomas (Prat *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2010). Se ha descrito que la expresión de los genes para la tetraspanina hsp 83 en *L. infantum* interviene en la diferenciación y regula la estabilidad del mRNA en la traducción (Larreta *et al.*, 2004). Además regula el desarrollo y función de varias células inmunes capaces de modular la respuesta durante infecciones (Castelli *et al.*, 2019).

Los factores de virulencia contenidos en los exosomas de *Leishmania* son capaces de interactuar con las fosfatasa del huésped, incluidos la gp63 y el EF-1 α . En macrófagos infectados con *L. donovani* se ha descrito que las vesículas secretadas por el parásito se liberan dentro de las vacuolas parasitóforas y luego en el citosol (Andreu y Yáñez-Mó, 2014; Hassani *et al.*, 2014). Nuestros resultados demuestran que tanto los exosomas de los promastigotes y de los amastigotes de *L. mexicana* contienen la metaloproteína gp63 y la proteína fosfatasa PP2C, anteriormente descritas en las secreciones de *Leishmania* (Escalona-Montaña *et al.*, 2017; Ochieng *et al.*, 2009). La metaloproteasa de zinc, gp63, es de gran importancia en establecimiento de los promastigotes y su

Leishmania (Escalona-Montaña *et al.*, 2017; Ochieng *et al.*, 2009). La metaloproteasa de zinc, gp63, es de gran importancia en establecimiento de los promastigotes y su diferenciación en amastigotes dentro de la célula hospedera. Esta proteína se expresa con mayor intensidad en promastigotes y se modula negativamente en la etapa amastigote en *L. major*. Sin embargo, se ha reportado como la proteína más abundante en amastigotes de *L. mexicana* y es modulada a la baja en la etapa de diferenciación de promastigotes (Arango *et al.*, 2019; Silverman *et al.*, 2008), lo que sugiere que hay diferencias en la expresión de la proteína entre los estadios de las diferentes especies de *Leishmania*.

Por otro lado, esta metaloproteasa de superficie secretada por el parásito interfiere con muchos mecanismos de defensa del huésped, incluida la escisión de componentes de las cascadas de señalización de moléculas de fusión fagolisosómica (Isnard *et al.*, 2012). Se ha demostrado que se localiza en la envoltura nuclear y el área perinuclear de las células huésped (Medina-Acosta *et al.*, 1989). La escisión de gp63 de los sustratos de la célula huésped puede afectar a los factores de transcripción c-Jun y NF- κ B (fragmento p65 / RelA), así como a las fosfatasas del huésped, incluida la SHP-1 (Contreras *et al.*, 2010; Gomez *et al.*, 2009; Medina-Acosta *et al.*, 1989). La activación proteolítica de las fosfatasas del huésped, como SHP-1, puede conducir a la inhibición de las vías de señalización en las células del huésped necesarias para el control de los parásitos (Gomez *et al.*, 2009). Esta proteína tiene la capacidad de subvertir múltiples funciones microbidas e inmunes de la célula, por lo que ayuda a crear un nicho seguro para la replicación del parásito (Gioseffi *et al.*, 2020).

metales que desfosforila los sustratos de serina / treonina, regulando negativamente las cascadas de proteína quinasa (Gregory *et al.*, 2008), lo que afecta al estallido oxidativo y la producción de iNOS dentro de la célula (Jakkula *et al.*, 2018; Stern *et al.*, 2007). En la leishmaniasis, es considerada un factor de virulencia y se ha descrito en vesículas que emanan de la bolsa flagelar de amastigotes y promastigotes de *Leishmania*, donde ocurre la secreción de exosomas (Escalona-Montaña *et al.*, 2016; Gómez-Sandoval *et al.*, 2021; Ochieng *et al.*, 2009). El anticuerpo anti-PP2C reconoció una proteína de ~70 kDa en los exosomas de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, aunque interesantemente esta proteína no correspondió al peso de PP2C ~45 kDa reportado en la literatura (GenBank ID 5652485, Evens *et al.*, 2005). Esto podría explicarse con lo reportado en la literatura, sobre el reconocimiento de una proteína de peso molecular de ~70 kDa (en una fracción del secretoma) (Escalona-Montaña *et al.*, 2016), que posiblemente reconoce una PP2C homóloga presente en los exosomas de *L. mexicana*, ya que un análisis filogenético realizado en *L. major* mostró 15 diferentes proteínas PP2C que se agruparon en cuatro clados con secuencias similares (Brencheley *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2019).

Otra fosfatasa encontrada en exosomas de diferentes especies de *Leishmania* es la LmPRL-1 de *L. major*, identificada en el citoplasma de la célula hospedera al igual que en promastigotes y amastigotes, por lo que se especula puede modular las vías de señalización, interfiriendo con las funciones celulares y favoreciendo la supervivencia del parásito (Hassani *et al.*, 2014). Nuestros resultados de proteómica arrojan otro dato

en promastigotes y amastigotes, por lo que se especula puede modular las vías de señalización, interfiriendo con las funciones celulares y favoreciendo la supervivencia del parásito ([Hassani et al., 2014](#)). Aunado a esto, nuestros resultados de proteómica arrojan otro dato interesante, se identificó otra proteína tirosina aminotransferasa (LiTAT), que podría estar implicada en el metabolismo del amastigote.

El uso de exosomas verdes obtenidos de parásitos de *L. mexicana* transfectados con sfGFP mostró que aparecen en el citosol de los macrófagos derivados de médula ósea después de 2 h de incubación y aumentan a lo largo de las 6 h siguientes. Los exosomas pueden entrar en las células a través de diversas vías, como la fagocitosis, la endocitosis mediada por receptores o por fusión de membranas ([Brencheley et al., 2007](#); [Shorey et al., 2015](#)). En los exosomas de mamíferos, se ha descrito un motivo de internalización basado en la tirosina en el C-terminal de la tetraspanina CD63, que conduce a su rápida endocitosis ([Feng et al., 2010](#)). Sin embargo, dado que los exosomas de *L. mexicana* no expresan CD63, parece estar presente otra vía de entrada desconocida. Un análisis proteómico ha demostrado que los exosomas de *L. major* contienen proteínas ortólogas para la cadena pesada de clatrina y proteínas SNARE-t que se encuentran en el proteoma del exosoma de mamíferos, componentes centrales de la endocitosis y los mecanismos de fusión eucariotas ([Andreu y Yáñez-Mó, 2014](#); [Charrin et al., 2014](#)). Esto posiblemente sugiere que los exosomas de *Leishmania* ingresan a las células a través de endocitosis mediada por clatrina o fusión de membrana mediada por proteínas SNARE ([Charrin et al., 2014](#)). Una vez dentro de los macrófagos, se encontró que los exosomas de *L. mexicana* colocalizaban con la tetraspanina CD63 (presente en endosomas tardíos

y lisosomas) después de 6 h de incubación. Esto sugiere una posible fusión entre los exosomas del parásito y los de macrófagos; y que posiblemente los exosomas del parásito se reciclan en los endosomas de los macrófagos (Schubert *et al.*, 2012). Después de su captación por las células fagocíticas, los amastigotes de *Leishmania* liberan proteínas y exosomas en vacuolas parasitóforas, una estructura similar a una fagolisosoma que alberga a los amastigotes intracelulares (Coakley *et al.*, 2015; Gassart *et al.*, 2004). Estos últimos, se fusionan con múltiples estructuras, incluidos los endosomas tardíos, también conocidos como cuerpos multivesiculares (MVB del inglés) (Coakley *et al.*, 2015; Gassart *et al.*, 2004). Por tanto, es posible que los macrófagos eliminen las proteínas del parásito a través de sus exosomas que se derivan de los endosomas tardíos (Shorey *et al.*, 2015). Al enviar mensajes sistemáticamente a través de exosomas, los amastigotes del parásito son capaces de modular la respuesta de sus células hospederas además de recircular a otras células, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Shorey *et al.*, 2015).

Nuestros datos ahora muestran que los exosomas de los amastigotes de *L. mexicana*, además de inhibir la producción de ON de los macrófagos, también ejercen un impacto sobre los mecanismos inmunes del huésped al modificar las moléculas presentadoras de antígenos y coestimuladoras (activadoras e inhibidoras), las cuales tienen un papel crucial en la defensa inmunológica contra el parásito (Bhatnagar *et al.*, 2007). El bloqueo de los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos mediante la reducción de la producción de ON, en combinación con la reducción de los mecanismos de presentación de antígenos, podría estar limitando la capacidad funcional de estas

células para activar la respuesta inmune adaptativa (Bhatnagar *et al.*, 2007). Nuestro estudio está de acuerdo con informes anteriores que han demostrado que los promastigotes de *L. mexicana*, así como sus exosomas, inhiben la producción de ON en la línea celular de macrófagos B10R (Olivier *et al.*, 2005). Además, se demostró que los exosomas de *L. major* regulan negativamente el gen NOS2 y degradan las subunidades NF- κ B y AP-1, posiblemente mediante gp63 (Silverman *et al.*, 2010). Con base en estas observaciones, ahora especulamos que la inhibición de ON y la regulación a la baja de las expresiones de MHC-I, CD86 y PDL-1 en macrófagos infectados coincubadas con exosomas de amastigotes de *L. mexicana* posiblemente estén relacionadas con la degradación de NF- κ B por gp63 contenida en exosomas. Es de destacar que la expresión del MHC-II se mantuvo sin cambios, posiblemente porque esta molécula forma parte de un complejo proteico relacionado con múltiples factores de transcripción, el más importante de los cuales es el transactivador de clase II (CIITA), el regulador maestro de la activación de genes de clase II y la expresión de proteínas está regulada por los factores de transcripción STAT-1 α , IRF-1 y USF-1 (Hassani *et al.*, 2011). Este resultado también se ha observado para los parásitos de *L. infantum* y sus exosomas, que no afectaron la expresión de MHC-II en macrófagos y células dendríticas derivadas de medula (Leitherer *et al.*, 2017). Aún queda por esclarecer si la disminución de la expresión de MHC-I y las moléculas coestimuladoras inducidas por exosomas de amastigotes afectan la activación de las células T CD8 + en las infecciones por *Leishmania*.

Es de destacar que nuestros datos sobre el aumento de la expresión de CD1d causada por aExo de *L. mexicana* en macrófagos infectados contrasta con los informes de la literatura, donde se ha informado que los exosomas de promastigotes de *L. major* reducen el ARNm de CD1d en la línea celular B10R (Silverman *et al.*, 2010). Dado que la expresión de CD1d está controlada por el factor de transcripción C / EBP- β (Lee *et al.*, 2008), queda por estudiar si este efecto opuesto puede estar relacionado con diferencias entre las especies de parásitos y/o con el hecho de que se utilizaron exosomas obtenidos de diferentes etapas de desarrollo del parásito en cultivo. La expresión aumentada de CD1d posiblemente sugiere que los exosomas de amastigote podrían facilitar las presentaciones de antígenos de glicolípidos, como ceramidas y esfingolípidos de superficies de exosomas o glicolípidos de parásitos, como lipofosfoglicano (LPG), glicoinositol fosfolípidos (GIPL), glicosfolingofosfolípidos (GS) (Sikder *et al.*, 2009; Théry *et al.*, 2009). Estos podrían ser presentados a las células NKT por CD1d, induciendo así la producción de citocinas (Théry *et al.*, 2009). Sin embargo, dado que esta expresión de CD1d ocurre de forma concomitante con una reducción de la molécula coestimuladora CD86, esto posiblemente sugiere que la activación celular es limitada.

Cabe señalar que se encontró que la expresión de PD-L1 se redujo en macrófagos infectadas con *L. mexicana* estimuladas con aExo. Se esperaba el efecto contrario, ya que en la leishmaniasis se ha informado una inhibición de los linfocitos T (Théry *et al.*, 2009). Además, la reducción de PD-L1 se hizo más pronunciada después de incubar los macrófagos infectados con niveles más altos de exosomas. Dado que la transcripción de PD-L1 también está regulada por NF- κ B (Habib *et al.*, 2018), una posible explicación de

su reducción podría ser la degradación antes mencionada de NF- κ B por gp63 contenida en exosomas.

Nuestros datos enriquecen el conocimiento sobre los mecanismos patogénicos que ejercen los exosomas de amastigotes en la célula infectada, lo que ayuda a la supervivencia del parásito intracelular. Así, los amastigotes de *Leishmania* secretan exosomas dentro de las vacuolas parasitóforas (Gassart *et al.*, 2004), lo que lleva a una reducción de Oxido Nitríco, evitando el microambiente hostil dentro de la célula.

Sugerimos que los exosomas luego se fusionen con proteínas de la membrana del endosoma de los macrófagos infectados y se liberen en el citosol de las células huésped. Mientras se encuentran en el espacio perinuclear (Medina-Acosta *et al.*, 1989), los exosomas del parásito pueden modular los mecanismos microbicidas de los macrófagos infectados mediante las fosfatasa s contenidas en sus exosomas (PP2C) y mediante la modulación de las proteínas tirosina fosfatasa s de las células huésped (SHP-1) a través de la gp63, inhibiendo así la translocación nuclear de factores de transcripción, como NF- κ B, JAK / STAT-1 y AP-1 (Atayde *et al.*, 2016). La inactivación de NF- κ B y otros factores de transcripción puede conducir a una expresión reducida de MHC-I y moléculas coestimuladoras CD86 y PD-L1, lo que dificulta la presentación de antígenos por las células infectadas. Sin embargo, a pesar de potenciar la expresión de CD1d cuando está presente en grandes cantidades, los exosomas todavía perjudican una respuesta inmunitaria eficaz, ya que la falta de moléculas coestimuladoras podría estar

favoreciendo la tolerancia al parásito por la célula y esto a su vez llevarla a anergia celular (Appleman y Boussiotis, 2003; Gowrishankar *et al.*, 2015), **figura 24**.

La liberación de exosomas al medio extracelular a través de la exocitosis parece ser una vía importante que permite al parásito exportar sus factores de virulencia fuera de las células huésped. La interacción de estos mecanismos genera condiciones que conducen a una mayor supervivencia del parásito dentro de la célula, además de permitir la liberación y propagación de abundantes parásitos a las células vecinas.

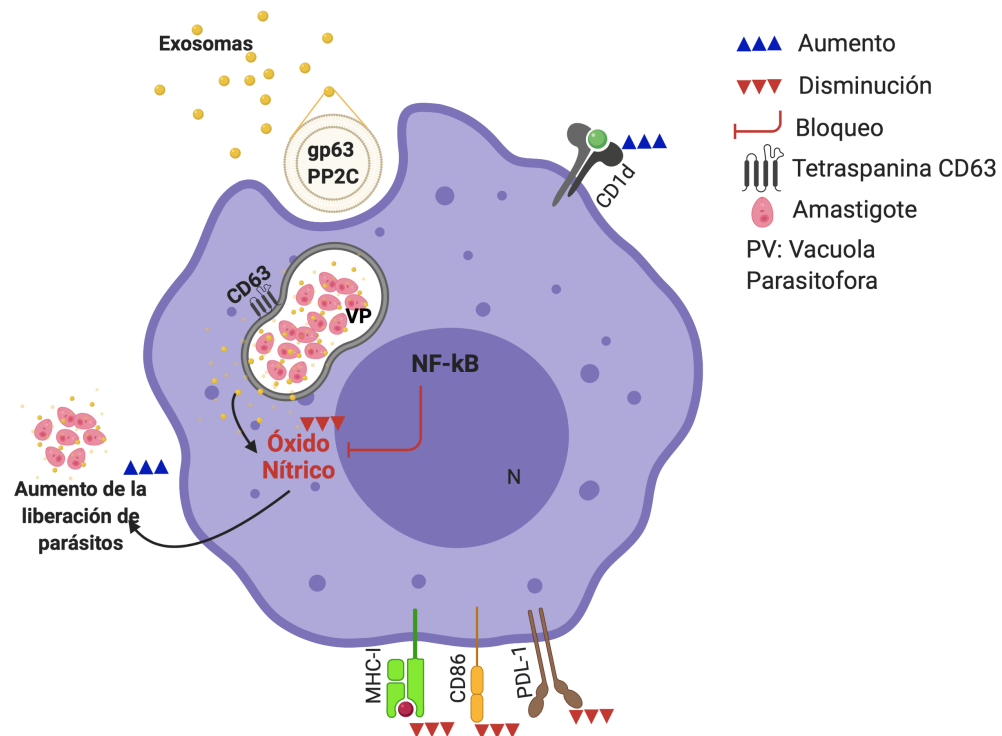


Figura 24. Los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* modulan los mecanismos microbicidas en macrófagos infectados. La reducción del óxido nítrico (ON) ayuda a la supervivencia intracelular de los parásitos al reducir el ambiente tóxico en los fagolisosomas. Los parásitos supervivientes se liberan y pueden infectar las células de los transeúntes. Los exosomas también modulan la interferencia con la

presentación de antígenos al disminuir las moléculas de MHC-I. Afectan los mecanismos efectores de las células T al reducir CD86 y PDL-1. Aunque los exosomas mejoran la expresión de CD1d, la regulación negativa concomitante de CD86 posiblemente obstaculice su efecto sobre las células que responden. A: amastigotes, CD63: tetraspanina, CD63, ER: retículo endoplásmico, Exo: exosomas, GA: Golgi, gp63: glicoproteína 63 kDa, LE: endosoma tardío, PP2C: proteína fosfatasa 2C. Imagen creada con el programa Biorender.

Finalmente, en los resultados de proteómica se identificaron en los pExo 265 proteínas, en los aExo solo identificaron 15 proteínas. El resumen de los datos obtenidos del análisis proteómico de los exosomas de promastigotes y amastigotes se encuentran en el Anexo II, **tablas 3 y 4**.

Las proteínas identificadas en pExo fueron la leishmanolisina de 63 kDa (gp63), los factores de elongación EF-1 α y EF-1 β y el EF-2, proteínas de choque térmico (HSP) de 70, 83 kDa y la proteína fosfatasa de serina / treonina así como la PP2C entre otras, Anexo II. Las mencionadas, han sido consideradas factores de virulencia del parásito y descritas en reportes previos de estudios proteómicos de exosomas de promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (Silverman *et al.*, 2010, Atayde *et al.*, 2015, Perez-Cabezas *et al.*, 2019).

En el caso de los exosomas de amastigotes, al momento del desarrollo de los experimentos no se encontraron reportes de estudios proteómicos. Nuestro análisis identifico a la proteína Tirosina aminotransferasa (LiTAT), una proteína implicada en el metabolismo de los aminoácidos en *Leishmania* de importancia en su diferenciación

de promastigotes hacia amastigotes, ([Moreno-Izquierdo et al., 2014](#)), la cual se ha descrito se expresa en promastigotes y se sobre expresa en amastigotes durante la fase logarítmica, desapareciendo en la fase estacionaria, por lo que se sugiere tiene importancia en el proceso de adaptación al nuevo hospedero, es una enzima de gran importancia ya que se describió una cepa de *L. chagasi* resistente al óxido nítrico el cual es uno de los principales mecanismos leishmanicidas del macrófago ([Moreno-Izquierdo et al., 2014](#)).

Adicional a esto, tenemos evidencia de que los sobrenadantes luego de la ultracentrifugación mostraron presencia de exosomas residuales, **figura 13**, por lo que especulamos contaminación del sobrenadante obtenido de los amastigotes con exosomas bovinos contenidos naturalmente en el SFB s/exo que fue tratado de forma casera para eliminar dichos exosomas. Este supuesto se refuerza con los resultados de proteómica, pues al realizar la búsqueda de identidad con proteínas de mamífero, Anexo II, **tabla 5**, (*Bos Taurus*) encontramos proteínas de suero bovino con alta abundancia (80 %) como albumina, macroglobulina y complemento C3 con respecto a las proteínas de *Leishmania*. En ese sentido, Pietrowska y cols describieron mediante un análisis proteómico basado en espectrometría de masas de suero y plasma, que la presencia de albumina, es el contaminante frecuente en exosomas aislados de suero/plasma humano al igual que en los medios de cultivo suplementados con suero, ya que este contiene además factores de crecimiento y hormonas. Lo mismo ocurre con cultivos donde se emplea SFB ya que estos contienen proteínas que se deben remover previo al análisis proteómico ([Pietrowska et al., 2019](#)). Se han descrito dos métodos

comunes para la eliminación de los exosomas del suero, el primero es la ultracentrifugación hasta 18 h y el segundo es empleando un kit de precipitación. En la actualidad los sueros comerciales describen el uso de estos métodos para la eliminación de los exosomas, sin embargo, este estudio mostro que después de la eliminación con ambos métodos aun hay presencia de exosomas residuales y otras poblaciones de vesículas extracelulares ([Lehrich *et al.*, 2018](#)) lo que concuerda con nuestros resultados.

11. Conclusiones

- Se demostró que los exosomas de amastigotes de *L. mexicana* miden ~ 85 nm.
- Contienen la proteína-fosfatasa PP2C (no descrita previamente en exosomas) y la proteasa gp63.
- Los exosomas de parásitos son internalizados por macrófagos de médula ósea y colocalizan con la tetraspanina CD63 de las membranas endosomales.
- En los macrófagos infectados, los exosomas reducen la producción de ON, lo que favorece la supervivencia del parásito.
- Modulan negativamente la respuesta inmune de la célula huésped al reducir MHC-I y CD86, los cuales dificultan la activación efectiva de las células T.
- Mediante el análisis proteómico de los exosomas de aExo se identificó una proteína, la fosfatasa LiTAT, implicada en la supervivencia del parásito y resistencia al óxido nítrico.

12. Perspectivas

- Realizar un análisis semejante con un aislado de *L. mexicana* que ocasiona un cuadro de Leishmaniasis cutánea difusa, pues durante este estudio se observó que el aislado LCD secreta una mayor cantidad de vesículas extracelulares (microvesículas y exosomas), **figura 25**, comparado con el de leishmaniasis cutánea localizada (LCL) empleado para los experimentos de esta tesis.

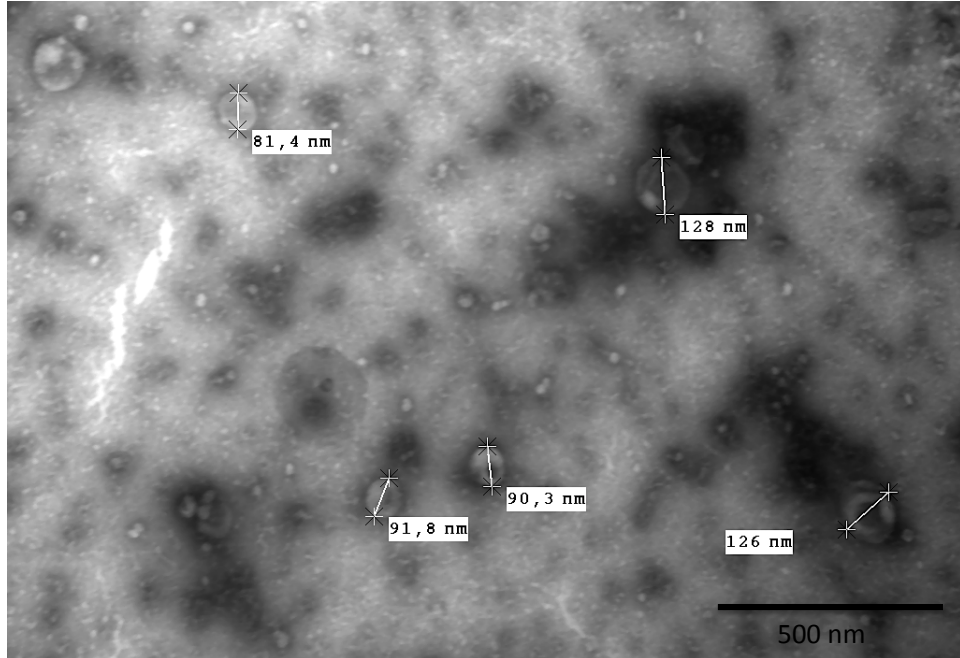


Figura 25. Microscopía electrónica de transmisión de las vesículas extracelulares secretadas por *L. mexicana* del aislado LCD. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas de *L. mexicana* del aislado LCD con tinción negativa. Imagen de la izquierda: exosomas contenidos en membranas, aumento de 60.000x. Barra 500 nm.

13. Referencias

- **Andreu Z**, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* 2014; 5:442.
- **Angelini F**, Ionta V, Rossi F, Pagano F, Chimenti I, Messina E, Giacomello A. Exosomes isolation protocols: facts and artifacts for cardiac regeneration. *Front. Biosci. (Schol Ed).* 2016; 8:303-311.
- **Appleman LJ**, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.* 2003; 192:161-80.
- **Arango DG**, Jardim A, Gagnon É, Fukuda M, Descoteaux A. The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog.* 2019; 15(7):e1007982.
- **Atayde VD**, Aslan H, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Rep.* 2015; 13(5):957-67.
- **Atayde VD**, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, Olivier M. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol.* 2016; 309:7-18.
- **Bates A** and Rogers ME, New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*, *Current Molecular Medicine* (2004) 4: 601.
- **Bates PA**, Depaquit J, Galati EA, et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasit Vectors.* 2015;8:131.
- **Bates PA**. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology.* 1994; 108 (Pt 1):1-9.
- **Bhatnagar S**, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood.* 2007; 110(9):3234-44.
- **Brenchley R**, Tariq H, McElhinney H, Szöör B, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews K, Taberner L. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics.* 2007; 8:434.
- **Bryan NS**, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43(5):645-57.
- **Charrin S**, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 17):3641-8.
- **Coakley G**, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol.* 2015; 31(10):477-489.

- **Contreras I**, Gomez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* 2010; 6(10):e1001148.
- **De Gassart A**, Géminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins?. *Traffic.* 2004; 5(11):896-903.
- **Diupotex M**, Martínez-Salazar MB, Escalona-Montaña AR, Zamora-Chimal J, Salaiza-Suazo N, Ruiz-Remigio A, Roldán-Salgado A, Aguirre-García MM, Martínez-Calvillo S, Gaytán P, Becker I. The mKate fluorescent protein expressed by *Leishmania mexicana* modifies the parasite immunopathogenicity in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2019; 41(2):e12608.
- **Eitan E**, Zhang S, Witwer KW, Mattson MP. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J. Extracell. Vesicles.* 2015; 4:26373.
- **Englen MD**, Valdez YE, Lehnert NM, Lehnert BE. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *J. Immunol. Methods.* 1995; 184(2):281-3.
- **Escalona-Montaña AR**, Ortiz-Lozano DM, Rojas-Bernabé A, Wilkins-Rodriguez AA, Torres-Guerrero H, Mondragón-Flores R, Mondragón-Gonzalez R, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L, Aguirre-García MM. *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology.* 2016; 143(11):1409-20.
- **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. Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *Leishmania major*: cloning and characterization. *Parasitology Open.* 2017; 3:e15, 1-9.
- **Feng D**, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q, Sui SF. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic.* 2010; 11(5):675-87.
- **Gabriel ÁM**, Galué-Parra A, Pereira WLA, Pedersen KW, da Silva EO. *Leishmania* 360°: Guidelines for Exosomal Research. *Microorganisms* 2021, 9, 2081. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102081>
- **Gilbert LA**, Ravindran S, Turetzky JM, Boothroyd JC, Bradley PJ. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot. Cell.* 2007; 6(1):73-83.
- **Gioseffi A**, Hamerly T, Van K, Zhang N, Dinglasan RR, Yates PA, Kima PE. *Leishmania*-infected macrophages release extracellular vesicles that can

promote lesion development. Life Science Alliance, 2020(3)12:1-16. DOI 10.26508/lisa.202000742.

- **Gomez** MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. Sci. Signal. 2009; 29;2(90):ra58.
- **González-Salazar** C, Stephens C. Constructing ecological networks: a tool to infer risk of transmission and dispersal of leishmaniasis. Zoonoses Public Health. 2012;59(2):179-93.
- **Gowrishankar** K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos H, Hersey P. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- κ B. PLoS One. 2015; 10(4):e0123410.
- **Gregory** DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. Eur. J. Immunol. 2008; 38:1071–81.
- **Habib** S, El Andaloussi A, Elmasry K, Handoussa A, Azab M, Elsayey A, Al-Hendy A, Ismail N. PD-L1 blockade prevents T cell exhaustion, inhibits autophagy, and promotes clearance of *Leishmania donovani*. Infect. Immun. 2018; 86(6):e00019-18.
- **Hassani** K, Antoniak E, Jardim A, Olivier M. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. PLoS One. 2011; 6(5):e18724.
- **Hassani** K, Olivier M. Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7(5):e2185.
- **Hassani** K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. PLoS One. 2014; 9(4):e95007.
- http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.
- **Hu**, D., Song, X., Xie, Y. et al. Molecular insights into a tetraspanin in the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* . Parasites Vectors 8, 311 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0926-y>
- **Isnard** A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Front. Cell Infect. Microbiol. 2012; 2:72.
- **Jakkula** P, Qureshi R, Iqbal A, Sagurthi SR, Qureshi IA. *Leishmania donovani* PP2C: Kinetics, structural attributes and in vitro immune response. Mol. Biochem. Parasitol. 2018; 223:37-49.
- **Koushik** R, Kshudiram N, Moumita G and Syamal R. Class II MHC/Peptide Interaction in *Leishmania donovani* Infection: Implications in Vaccine Design. J Immunol June 15, 2014, 192 (12) 5873-5880.

- **Lee SJ**, Qin H, Benveniste EN. The IFN-gamma-induced transcriptional program of the CIITA gene is inhibited by statins. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38(8):2325-36.
- **Lehrich BM**, Liang Y, Khosravi P, Federoff HJ and Fiandaca MS. Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 3538; doi:10.3390/ijms19113538
- **Leitherer S**, Clos J, Liebler-Tenorio EM, Schleicher U, Bogdan C, Soulat D. Characterization of the protein tyrosine phosphatase LmPRL-1 secreted by *Leishmania major* via the exosome pathway. *Infect. Immun.* 2017; 85(8):e00084-17.
- **Li YH**, Yan ZQ, Brauner A & Tullus K. Activation of macrophage nuclear factor-kappa B and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS. *Respir. Res.* 2002; 3(1):23.
- **Liu D & Uzonna J. E.** The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2012; 2: 83.
- **Mamoun CB**, Goldberg DE. *Plasmodium* protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 2001; 39(4):973-81.
- **Medina-Acosta E**, Karess RE, Schwartz H, Russell DG. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 37(2):263-73.
- **Medina-Acosta E**, Karess RE, Schwartz H, Russell DG. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol.* 1989 Dec;37(2):263-73. doi: 10.1016/0166-6851(89)90158-8. PMID: 2691889.
- **Moreno-izquierdo MA**, Alcolea PJ, Alonso A. Caracterización estructural y funcional de la tirosina aminotransferasa de *Leishmania infantum*. Centro de investigaciones biológicas Margarita Salas (CIB), Madrid España, 2016, 151 p.
- **Nandan D**, Yi T, Lopez M, Lai C, Reiner NE. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(51):50190-50197.
- **Ochieng J**, Pratap S, Khatua AK, Sakwe AM. Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes. *Exp. Cell Res.* 2009; 315(11):1875-88.
- **Olivier M**, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):293-305.

- **Pérez-Cabezas** B, Santarém N, Cecílio P, Silva C, Silvestre R, A M Catita J, Cordeiro da Silva A. More than just exosomes: distinct *Leishmania infantum* extracellular products potentiate the establishment of infection. *J. Extracell. Vesicles*. 2018; 8(1):1541708.
- **Pietrowska** M, Wlosowicz A, Gawin M, Widlak. MS-Based proteomic analysis of serum and plasma: problema of high abundant components and light and shadows of albumin removal. *Advances in experimental medicine and biology* 1073, https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0_3
- **Podinovskaia** M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*. 2015; 10(1):111-29.
- **Ratajczak-Wrona** W, Jablonska E, Marcinczyk M, Grabowska Z, Piotrowski L. Role of p38 MAPK pathway in induction of iNOS expression in neutrophils and peripheral blood mononuclear cells in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J. Oral Maxillofac. Surg*. 2009; 67(11):2354-63.
- **Real** F, Mortara RA. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2012; 6(2):e1518.
- **Sarah** P. Georgiadou, Konstantinos P. Makaritsis, and George N. Dalekos, Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med*. 2015 Apr-Jun; 3(2): 43–50.
- **Schey** KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods*. 2015;87:75-82. doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.018
- **Schorey** JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep*. 2015; 16(1):24-43.
- **Schubert** KO, Föcking M, Prehn JH, Cotter DR. Hypothesis review: are clathrin-mediated endocytosis and clathrin-dependent membrane and protein trafficking core pathophysiological processes in schizophrenia and bipolar disorder?. *Mol. Psychiatry*. 2012; 17(7):669-81.
- **Scott** P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol*. 1985; 7(3):277-88.
- **Shelke** GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. Vesicles*. 2014; 30:3.
- **Shelke** GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. Vesicles*. 2014; 3.
- **Sikder** H, Zhao Y, Balato A, Chapoval A, Fischelevich R, Gade P, Singh IS, Kalvakolanu DV, Johnson PF, Gaspari AA. A central role for transcription factor

- C/EBP-beta in regulating CD1d gene expression in human keratinocytes. *J. Immunol.* 2009; 183(3):1657-66.
- **Silverman** JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner NE. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* 2008; 9(2):R35.
 - **Silverman** JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 2010; 123(Pt 6):842-52.
 - **Silverman** JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, Lynn MA, McMaster WR, Foster LJ, Levings MK, Reiner NE. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 2010; 185(9):5011-22.
 - **Silverman** JM, Reiner NE. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2012; 1:26.
 - **Skotland** T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* 2017; 66:30-41.
 - **Stern** A, Privman E, Rasis M, Lavi S, Pupko T. Evolution of the metazoan protein phosphatase 2C superfamily. *J. Mol. Evol.* 2007; 64(1):61-70.
 - **Subra** C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M, Record M. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 2010; 51(8):2105-20.
 - **Sunter** J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding [published correction appears in *Open Biol.* 2018 Aug;8(8)]. *Open Biol.* 2017; 7(9):170165.
 - **Théry** C, Amigorena S, Raposo G & Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2006; 30(1):3.22.1-3.22.29.
 - **Théry** C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(8):581-93.
 - **Waldmann** H. Mechanisms of immunological tolerance. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5):324-8.
 - **Wilkins-Rodríguez** AA, Escalona-Montaño AR, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp. Parasitol.* 2010; 126(3):426-434.

- **World Health Organization** (WHO). Global Health Observatory (GHO). Leishmaniasis: Situation and trends. 2018 Disponible en:
- **Zamora-Chimal J**, Hernández-Ruiz J, Becker I. NKT cells in leishmaniasis. *Immunobiology*. 2017; 222(4):641-646.

14. ANEXO I: Figuras complementarias

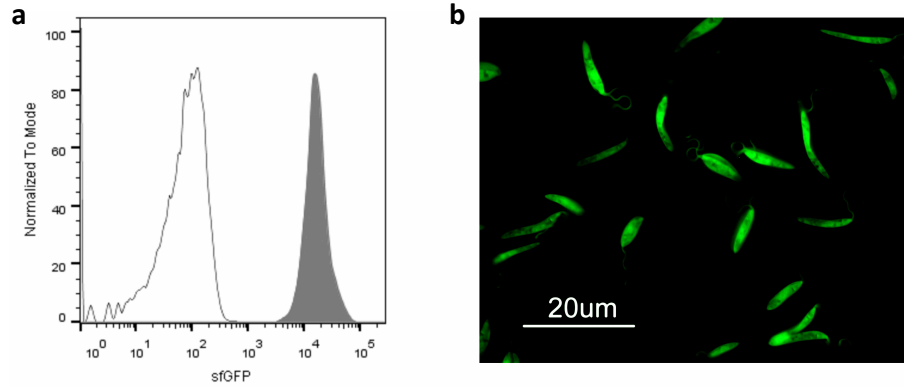


Figura complementaria 1. Fluorescencia de *L. mexicana* transfectada con el gen sfGFP. Los parásitos se transfectaron con el gen sfGFP a través del plásmido de expresión pLEXSY como se describe en [Diupotex et al., 2019](#). a) Histograma que muestra *L. mexicana*^{wt} de tipo salvaje en blanco y parásitos transfectados con proteína verde fluorescente *L. mexicana*^{sfGFP} en gris. b) Fotografía de *L. mexicana*^{sfGFP}.

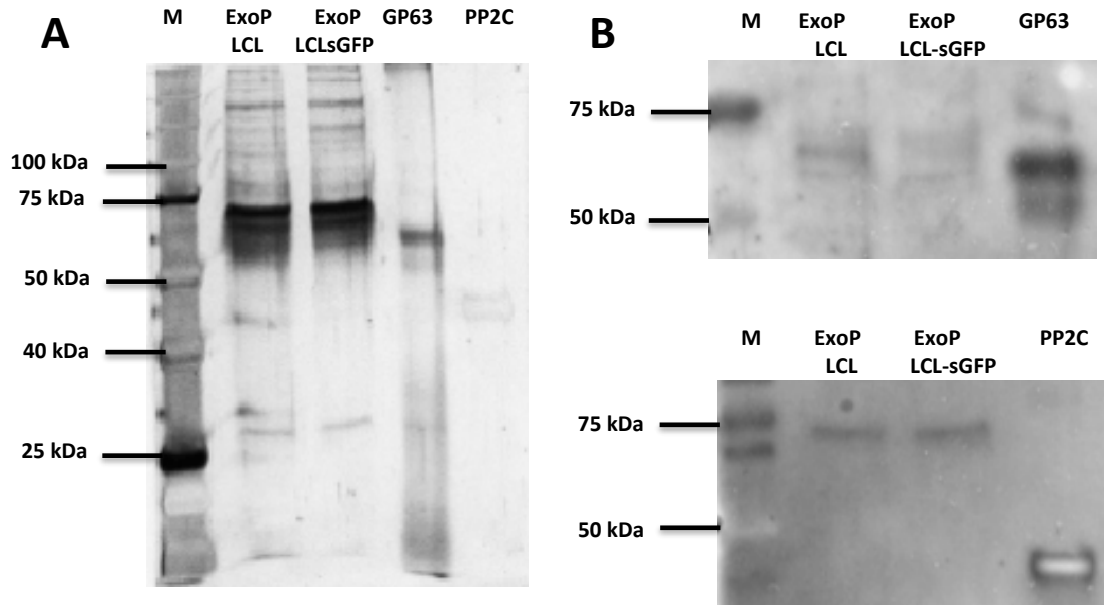


Figura complementaria 2. Caracterización de exomas de promastigotes *L. mexicana* tranfectada con la proteína verde fluorescente (sfGFP). A) Perfil proteico del extracto del lisado de exomas de promastigotes de *L. mexicana* (ExoP LCL) y de (ExoP LCL-sfGFP) en SDS-PAGE al 10% con tinción de plata. B) Inmunodetección de gp63 y PP2C en lisados de exomas promastigotes de *L. mexicana*. Carril 1: lisado de exomas de promastigotes LCL; Carril 2: lisado de exomas de promastigotes LCL-sfGFP; Carril 3: controles positivos (gp63 purificada de *L. mexicana* y PP2C recombinante de *L. major*).

Se co-incubaron macrófagos derivados de médula ósea con 10 μg exosomas aislados de cultivos de parásitos de *L. mexicana* que expresan la proteína reportera verde fluorescente sfGFP por 2 h, posteriormente se tiñeron las membranas celulares con anti-CD63 en PE, anti-MHC-II en APC-Cy7 (gris) y núcleos en DAPI. (azul). Se observaron por microscopia confocal, se muestra el control sin estímulo **figura complementaria 3 - a y 3 - b**. Se observó que los exosomas se internalizan en el citosol de la célula y también se pudo observar que las células que más tienen exosomas menos expresan MHC-II lo que se relacionaría con el resultado anterior donde los exosomas reducen la fluorescencia de esta molécula presentadora de antígenos.

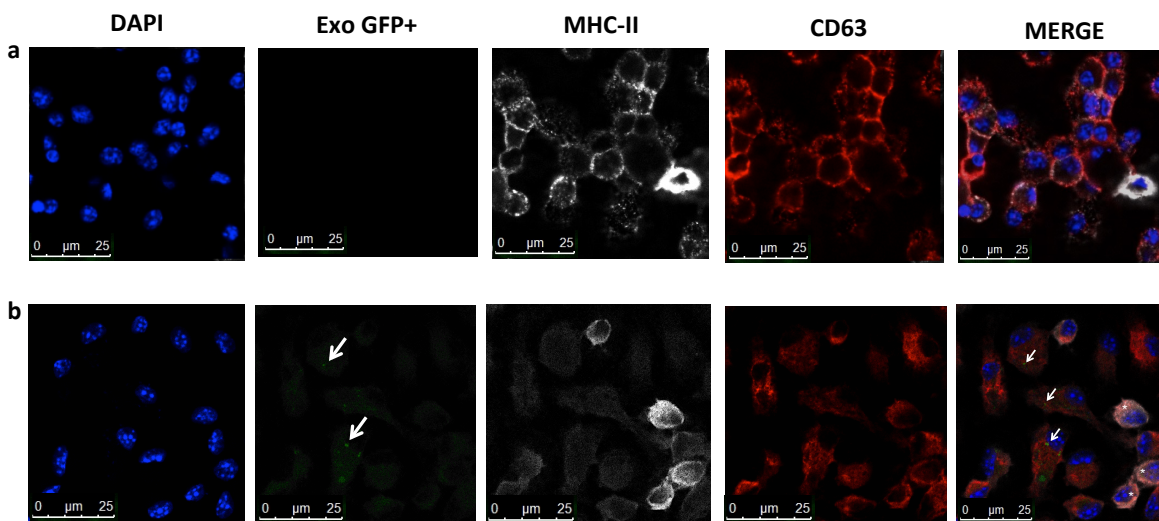


Figura complementaria 3. a) Microscopia confocal de macrófagos sin estímulo de exosomas; b) Microscopía confocal de macrófagos co-incubados con exosomas de *Leishmania* de sfGFP después de 2 horas de estimulación. Se observan agrupados verdes en el citosol de la célula (verde, flecha). No se observan estos agrupados en células donde se expresa MHC-II (gris, asterisco).

15. ANEXO II: Resumen de la identificación de proteínas analizadas por espectrometría de masas.

Tabla 3. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN LOS EXOSOMAS DE PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana* pExo (LCL)

N	Unused	% Cov (95)	Accession	Name	Species	Peptides (95%)
1	28.09	27.2100002	tr E9ART6 E9ART6_LEIMU	Plasma membrane ATPase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_1520 PE=3 SV=1	LEIMU	15
2	26.93	39.7000015	tr E9AN57 E9AN57_LEIMU	Leishmanolysin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_10_0470 PE=3 SV=1	LEIMU	18
3	25.28	31.7999989	tr E9B099 E9B099_LEIMU	Putative heat-shock protein hsp70 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_2770 PE=3 SV=1	LEIMU	16
4	23.34	47.0899999	tr E9APW3 E9APW3_LEIMU	Phosphopyruvate hydratase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_1160 PE=3 SV=1	LEIMU	13
5	22	20.5899999	tr E9ASD6 E9ASD6_LEIMU	Elongation factor 2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_0180 PE=3 SV=1	LEIMU	13
6	19.03	20.2600002	tr E9B3L2 E9B3L2_LEIMU	Heat shock protein 83-1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_0312 PE=3 SV=1	LEIMU	11
7	18.36	49.4399995	tr E9ARD0 E9ARD0_LEIMU	Elongation factor 1-alpha OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0080 PE=3 SV=1	LEIMU	13
7	0	48.6600012	tr E9ARD5 E9ARD5_LEIMU	Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0085 PE=3 SV=1	LEIMU	12
8	16.55	23.1800005	tr E9ASQ6 E9ASQ6_LEIMU	Transitional endoplasmic reticulum ATPase, putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_1370 PE=4 SV=1	LEIMU	8
9	15.73	24.3100002	tr E8NHG6 E8NHG6_LEIMU	Uncharacterized protein LmxM_30_0440_1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_30_0440_1 PE=4 SV=1	LEIMU	9
10	13.62	67.7999973	tr E9AXG9 E9AXG9_LEIMU	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_25_0910 PE=3 SV=1	LEIMU	9
11	11.85	11.6899997	tr E9B1E9 E9B1E9_LEIMU	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine S-methyltransferase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0010 PE=3 SV=1	LEIMU	6
12	10.93	24.1500005	tr E9B6K2 E9B6K2_LEIMU	Putative cystathione gamma lyase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_3230 PE=3 SV=1	LEIMU	6
13	10.88	19.7099999	tr E9AP62 E9AP62_LEIMU	Tubulin alpha chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_0280 PE=3 SV=1	LEIMU	7
14	10.34	11.7799997	tr E9AZ67 E9AZ67_LEIMU	BRO1 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_1640 PE=4 SV=1	LEIMU	8
15	10.21	19.1799998	tr E9AK01 E9AK01_LEIMU	Surface antigen-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_0190 PE=4 SV=1	LEIMU	12

16	10.16	20.5500007	tr[E9AJZ9]E9AJZ9_LEIMU	Cell surface protease OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_0130 PE=3 SV=1	LEIMU	6
17	10.07	22.4299997	tr[E9AN54]E9AN54_LEIMU	Leishmanolysin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_10_0390 PE=3 SV=1	LEIMU	13
18	10.03	75.2099991	tr[E9AWB4]E9AWB4_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_23_1020 PE=4 SV=1	LEIMU	8
19	9.76	18.1999996	tr[E9AZL8]E9AZL8_LEIMU	Leishmanolysin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_0570 PE=3 SV=1	LEIMU	6
20	9.68	12.2100003	tr[E9AUQ7]E9AUQ7_LEIMU	Calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1180 PE=4 SV=1	LEIMU	5
21	9.54	21.39	tr[E9AKA4]E9AKA4_LEIMU	Actin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_1230 PE=3 SV=1	LEIMU	4
22	8.88	51.3000011	tr[E9APT0]E9APT0_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase (Putative cysteine peptidase, clan ca, family c2) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_0850 PE=4 SV=1	LEIMU	8
23	8.87	21.1799994	tr[E9AKE1]E9AKE1_LEIMU	N(1),N(8)-bis(glutathionyl)spermidine reductase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_05_0350 PE=3 SV=1	LEIMU	5
24	8.86	24.3200004	tr[E9AR60]E9AR60_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0870 PE=4 SV=1	LEIMU	4
25	8.84	14.3800005	tr[E9ALK7]E9ALK7_LEIMU	Rab GDP dissociation inhibitor OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_2160 PE=3 SV=1	LEIMU	4
26	8.62	14.35	tr[E9ANF6]E9ANF6_LEIMU	Seryl-tRNA synthetase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_11_0100 PE=4 SV=1	LEIMU	3
27	8.59	51.2399971	tr[E9AS34]E9AS34_LEIMU	Autophagy-related protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0820 PE=3 SV=1	LEIMU	4
27	0	42.9800004	tr[E9AS38]E9AS38_LEIMU	Autophagy-related protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0860 PE=3 SV=1	LEIMU	3
27	0	41.6000009	tr[E9AS37]E9AS37_LEIMU	Autophagy-related protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0850 PE=3 SV=1	LEIMU	3
28	8.54	52.3199975	tr[E9B376]E9B376_LEIMU	Nucleoside diphosphate kinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_2950 PE=3 SV=1	LEIMU	4
29	8.39	34.0200007	tr[E9AVH9]E9AVH9_LEIMU	Proteasome subunit alpha type OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_1830 PE=3 SV=1	LEIMU	4
30	8.2	66.4099991	tr[E9AUS1]E9AUS1_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1310 PE=4 SV=1	LEIMU	11
31	8.2	46.4300007	tr[E9B5T9]E9B5T9_LEIMU	Conserved SNF-7-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_0580 PE=4 SV=1	LEIMU	4
32	8	8.74999985	tr[E9AU82]E9AU82_LEIMU	Putative histidine secretory acid phosphatase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_6480 PE=4 SV=1	LEIMU	9



33	7.74	41.0100013	tr[E9AM28]E9AM28_LEIMU	Cofilin-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_0510 PE=3 SV=1	LEIMU	4
34	7.68	20.4600006	tr[E9AKX0]E9AKX0_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_06_0920 PE=4 SV=1	LEIMU	4
35	7.2	15.5499995	tr[E9ALW5]E9ALW5_LEIMU	Putative ribosomal protein L1a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1070 PE=3 SV=1	LEIMU	6
35	0	13.3599997	tr[E9ALW4]E9ALW4_LEIMU	Putative ribosomal protein L1a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1090 PE=3 SV=1	LEIMU	6
36	7.13	6.44899979	tr[E9B686]E9B686_LEIMU	Putative calcium motive P-type ATPase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_2080 PE=4 SV=1	LEIMU	3
37	7.06	23.6200005	tr[E9AQA6]E9AQA6_LEIMU	Tryparedoxin peroxidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_15_1160 PE=3 SV=1	LEIMU	3
38	7.04	33.0000013	tr[E9APZ8]E9APZ8_LEIMU	Histone H4 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_15_0010 PE=3 SV=1	LEIMU	4
38	0	33.0000013	tr[E9AKM9]E9AKM9_LEIMU	Histone H4 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_06_0010 PE=3 SV=1	LEIMU	4
39	6.95	9.65000018	tr[E9AJD9]E9AJD9_LEIMU	Putative long-chain-fatty-acid-CoA ligase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_01_0520 PE=4 SV=1	LEIMU	3
40	6.72	24.8099998	tr[E9AT99]E9AT99_LEIMU	14-3-3 protein-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_3210 PE=3 SV=1	LEIMU	3
41	6.67	17.4199998	tr[E9ATD8]E9ATD8_LEIMU	Putative cysteine synthase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_3590 PE=4 SV=1	LEIMU	3
42	6.49	20.4500005	tr[E9AVA9]E9AVA9_LEIMU	Putative adenylate kinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_1250 PE=3 SV=1	LEIMU	5
43	6.46	69.8000014	tr[E9AMU3]E9AMU3_LEIMU	Calmodulin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_09_0910 PE=3 SV=1	LEIMU	4
44	6.36	27.9700011	tr[E9AZL7]E9AZL7_LEIMU	VPS37 C-terminal domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_0560 PE=4 SV=1	LEIMU	3
45	6.21	20.0000003	tr[E9AZ74]E9AZ74_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_1730 PE=4 SV=1	LEIMU	6
46	6.19	15.2199998	tr[E9B0M2]E9B0M2_LEIMU	DUF4139 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_0930 PE=4 SV=1	LEIMU	3
47	6.06	14.2299995	tr[E9AW99]E9AW99_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_23_0840 PE=4 SV=1	LEIMU	5
48	6.04	21.4699998	tr[E9ATK1]E9ATK1_LEIMU	Putative oxidoreductase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_4170 PE=3 SV=1	LEIMU	3
49	6	12.5499994	tr[E9ASX1]E9ASX1_LEIMU	Phosphomannomutase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_1960 PE=3 SV=1	LEIMU	3
50	6	8.93099979	tr[E9B0J1]E9B0J1_LEIMU	PDZ domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_0660 PE=4 SV=1	LEIMU	3

51	6	14.2199993	tr[E9ATG7]E9ATG7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_3850 PE=4 SV=1	LEIMU	3
52	6	22.7300003	tr[E9AST1]E9AST1_LEIMU	Proteasome subunit alpha type OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_1600 PE=3 SV=1	LEIMU	6
53	5.93	10.3299998	tr[E9AQV6]E9AQV6_LEIMU	Paraflagellar rod protein 2C OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_16_1430 PE=4 SV=1	LEIMU	3
54	5.8	6.6809997	tr[E9B4D5]E9B4D5_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_2930 PE=4 SV=1	LEIMU	3
55	5.77	9.35600027	tr[E9ARS1]E9ARS1_LEIMU	Putative heat shock protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_1370 PE=4 SV=1	LEIMU	4
56	5.62	10.65	tr[E9APY4]E9APY4_LEIMU	Inositol-3-phosphate synthase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_1360 PE=3 SV=1	LEIMU	3
57	5.59	14.5999998	tr[E9B3R4]E9B3R4_LEIMU	Tubulin beta chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_0794 PE=3 SV=1	LEIMU	4
57	0	16.2499994	tr[E9AMJ9]E9AMJ9_LEIMU	Tubulin beta chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_1171 PE=3 SV=1	LEIMU	4
57	0	17.3899993	tr[E9AMJ8]E9AMJ8_LEIMU	Tubulin beta chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_1230 PE=3 SV=1	LEIMU	4
57	0	16.2499994	tr[E9AVI3]E9AVI3_LEIMU	Tubulin beta chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_1860 PE=3 SV=1	LEIMU	4
58	5.52	49.0799993	tr[E9AW21]E9AW21_LEIMU	Putative endoribonuclease L-PSP (Pb5) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_23_0200 PE=4 SV=1	LEIMU	3
59	5.4	4.62299995	tr[E9B4S1]E9B4S1_LEIMU	p-glycoprotein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_0990 PE=4 SV=1	LEIMU	3
60	5.1	8.99500027	tr[E9B231]E9B231_LEIMU	Putative 3'-nucleotidase/nuclease OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_2310 PE=3 SV=1	LEIMU	3
61	5.06	25.819999	tr[E9AKI9]E9AKI9_LEIMU	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_05_0830 PE=3 SV=1	LEIMU	3
62	5	10.3	tr[E9ATH3]E9ATH3_LEIMU	Adenosylhomocysteinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_3910 PE=3 SV=1	LEIMU	2
63	4.79	12.0200001	tr[E9B4I7]E9B4I7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_0190 PE=4 SV=1	LEIMU	3
64	4.77	15.7199994	tr[E9AS67]E9AS67_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_1160 PE=4 SV=1	LEIMU	3
65	4.74	17.0200005	tr[E9B1L9]E9B1L9_LEIMU	C2 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0680 PE=4 SV=1	LEIMU	2
66	4.72	14.5799994	tr[E9AP13]E9AP13_LEIMU	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase, putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_1130 PE=4 SV=1	LEIMU	3
67	4.68	32.2899997	tr[E9AR33]E9AR33_LEIMU	ACB domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0780 PE=4 SV=1	LEIMU	4

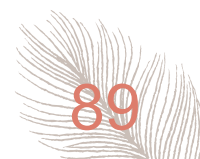
67	0	16.5000007	trj[E9AR31]E9AR31_LEIMU	ACB domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0620 PE=4 SV=1	LEIMU	3
68	4.67	8.23099986	trj[E9AWR7]E9AWR7_LEIMU	Malic enzyme OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_24_0761 PE=3 SV=1	LEIMU	2
69	4.49	8.65700021	trj[E9AK26]E9AK26_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_0450 PE=4 SV=1	LEIMU	3
70	4.48	29.8099995	trj[E9ANW9]E9ANW9_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0410 PE=4 SV=1	LEIMU	2
71	4.27	7.05899969	trj[E9ALP8]E9ALP8_LEIMU	Putative paraflagellar rod protein 1D OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1750 PE=4 SV=1	LEIMU	2
71	0	7.05899969	trj[E9ALP7]E9ALP7_LEIMU	Putative paraflagellar rod protein 1D OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1760 PE=4 SV=1	LEIMU	2
72	4.23	13.8099998	trj[E9AP08]E9AP08_LEIMU	Putative surface antigen protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0990 PE=4 SV=1	LEIMU	4
73	4.21	6.84899986	trj[E9APD3]E9APD3_LEIMU	Putative proteasome regulatory ATPase subunit 2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_1090 PE=3 SV=1	LEIMU	2
74	4.19	7.93299973	trj[E9B6L3]E9B6L3_LEIMU	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_3340 PE=3 SV=1	LEIMU	2
75	4.19	11.27	trj[E9B1D9]E9B1D9_LEIMU	Ribosomal protein L15 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_3650 PE=3 SV=1	LEIMU	2
75	0	5.99999987	trj[E9B668]E9B668_LEIMU	Ribosomal protein L15 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1910 PE=3 SV=1	LEIMU	1
76	4.16	23.4500006	trj[E9ALV7]E9ALV7_LEIMU	Tryparedoxin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1160 PE=4 SV=1	LEIMU	2
77	4.16	16.4900005	trj[E9APM4]E9APM4_LEIMU	Proteasome subunit alpha type OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_0310 PE=3 SV=1	LEIMU	2
78	4.15	3.01699992	trj[E9AQY1]E9AQY1_LEIMU	ATP pyrophosphate-lyase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0191 PE=4 SV=1	LEIMU	2
78	0	3.06100007	trj[E9ARD7]E9ARD7_LEIMU	ATP pyrophosphate-lyase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0200 PE=4 SV=1	LEIMU	2
79	4.1	7.6700002	trj[E9AW40]E9AW40_LEIMU	Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_23_0360 PE=3 SV=1	LEIMU	2
80	4.09	8.67300034	trj[E9B1C6]E9B1C6_LEIMU	S-adenosylmethionine synthase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_3500 PE=3 SV=1	LEIMU	2
81	4.08	7.15999976	trj[E9B578]E9B578_LEIMU	Putative ribosomal protein L3 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_2870 PE=3 SV=1	LEIMU	3
81	0	7.15999976	trj[E9B396]E9B396_LEIMU	Putative ribosomal protein L3 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_3130 PE=3 SV=1	LEIMU	3
82	4.07	21.7399999	trj[E9AWZ6]E9AWZ6_LEIMU	IgE-dependent histamine-releasing factor, putative OS=Leishmania mexicana (strain	LEIMU	2

				MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_24_1500 PE=3 SV=1		
82	0	35.2899998	trj[E8NHJ5]E8NHJ5_LEIMU	WGS CADB00000000 data, contig 43 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_24_1500a_1 PE=3 SV=1	LEIMU	2
83	4.07	13.47	trj[E9AJ87]E9AJ87_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_01_0010 PE=4 SV=1	LEIMU	2
84	4.01	11.4100002	trj[E9ALL3]E9ALL3_LEIMU	DUF4139 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_2100 PE=4 SV=1	LEIMU	5
85	4	0.77140001	trj[E9API9]E9API9_LEIMU	Putative dynein heavy chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_1650 PE=4 SV=1	LEIMU	2
86	4	14.3299997	trj[E9B4Q5]E9B4Q5_LEIMU	Putative translation elongation factor 1-beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_0840 PE=3 SV=1	LEIMU	2
86	0	18.8500002	trj[E9B4Q3]E9B4Q3_LEIMU	Elongation factor 1-beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_0820 PE=3 SV=1	LEIMU	2
87	4	5.79699986	trj[E9B1P3]E9B1P3_LEIMU	Sodium stibogluconate resistance protein, putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0930 PE=4 SV=1	LEIMU	2
87	0	5.79699986	trj[E8NHE8]E8NHE8_LEIMU	Uncharacterized protein LmxM_30_0950_1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_30_0950_1 PE=4 SV=1	LEIMU	2
87	0	5.79699986	trj[E8NHE7]E8NHE7_LEIMU	Uncharacterized protein LmxM_30_0960_1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_30_0960_1 PE=4 SV=1	LEIMU	2
88	4	14.7699997	trj[E8NHIO]E8NHIO_LEIMU	40S ribosomal protein S3a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_34_0400a_1 PE=3 SV=1	LEIMU	2
89	4	17.8900003	trj[E9B654]E9B654_LEIMU	RPN13_C domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1760 PE=4 SV=1	LEIMU	2
90	4	16.7500004	trj[E9B5W2]E9B5W2_LEIMU	Aspartate transaminase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_0820 PE=3 SV=1	LEIMU	3
91	4	12.0899998	trj[E9B1U3]E9B1U3_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_1440 PE=4 SV=1	LEIMU	2
91	0	8.42299983	trj[E8NHQ6]E8NHQ6_LEIMU	WGS CADB00000000 data, contig 85 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_30_1440b_1 PE=4 SV=1	LEIMU	2
91	0	6.70699999	trj[E8NHE9]E8NHE9_LEIMU	WGS CADB00000000 data, contig 12 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LmxM_30_1440a_1 PE=4 SV=1	LEIMU	2
92	4	14.1499996	trj[E9AZH2]E9AZH2_LEIMU	Proteasome subunit beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_0110 PE=3 SV=1	LEIMU	2
93	4	11.9900003	trj[E9AY20]E9AY20_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0380 PE=3 SV=1	LEIMU	2
94	4	9.00899991	trj[E9AVP4]E9AVP4_LEIMU	Putative proteasome regulatory ATPase subunit 5 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_22_0620 PE=3 SV=1	LEIMU	2

95	4	15.1899993	tr[E9AS80]E9AS80_LEIMU	PHB domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_1290 PE=4 SV=1	LEIMU	2
96	4	28.6799997	tr[E9AS40]E9AS40_LEIMU	Autophagy-related protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0870 PE=3 SV=1	LEIMU	2
97	4	11.0799998	tr[E9ARZ6]E9ARZ6_LEIMU	Putative nucleosome assembly protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0440 PE=3 SV=1	LEIMU	2
98	4	16.2799999	tr[E9AM81]E9AM81_LEIMU	Putative Qc-SNARE protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_0030 PE=4 SV=1	LEIMU	2
99	4	19.2200005	tr[E9AKY6]E9AKY6_LEIMU	2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_06_1070 PE=3 SV=1	LEIMU	2
100	3.94	5.1089983	tr[E9AYD6]E9AYD6_LEIMU	Putative thimet oligopeptidase (Metallo-peptidase, clan ma(E), family m3) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_1570 PE=3 SV=1	LEIMU	2
101	3.92	15.1999995	tr[E9B713]E9B713_LEIMU	Proteasome subunit alpha type OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_4850 PE=3 SV=1	LEIMU	2
102	3.9	9.34400037	tr[E9AP50]E9AP50_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_0160 PE=4 SV=1	LEIMU	2
103	3.87	11.1100003	tr[E9B1R0]E9B1R0_LEIMU	Putative N-acyl-L-amino acid amidohydrolase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_1130 PE=4 SV=1	LEIMU	2
104	3.85	7.76500031	tr[E9B494]E9B494_LEIMU	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_2550 PE=3 SV=1	NADP	2
105	3.85	19.0899998	tr[E9B5M9]E9B5M9_LEIMU	Proteasome subunit beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_4340 PE=3 SV=1	LEIMU	2
106	3.82	15.6100005	tr[E9ANM0]E9ANM0_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_11_0750 PE=4 SV=1	LEIMU	2
107	3.74	18.5900003	tr[E9APL2]E9APL2_LEIMU	Thioredoxin-like fold domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_0190 PE=4 SV=1	LEIMU	2
108	3.73	3.55300009	tr[E9B615]E9B615_LEIMU	Putative ubiquitin-activating enzyme e1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_3060 PE=3 SV=1	LEIMU	2
109	3.69	18.6199993	tr[E9ANH0]E9ANH0_LEIMU	Proteasome subunit alpha type OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_11_0240 PE=3 SV=1	LEIMU	2
110	3.69	9.09100026	tr[E9AP80]E9AP80_LEIMU	Putative 60S ribosomal protein L18 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_0560 PE=3 SV=1	LEIMU	2
110	0	8.0810003	tr[E9ATN5]E9ATN5_LEIMU	Putative 60S ribosomal protein L18 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_4510 PE=3 SV=1	LEIMU	1
111	3.68	35.5699986	tr[E9AVX3]E9AVX3_LEIMU	Putative centrin (Ca2+-binding ef-hand protein) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_22_1410 PE=4 SV=1	LEIMU	2
112	3.66	11.4100002	tr[E9AYP9]E9AYP9_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_2680 PE=4 SV=1	LEIMU	2



113	3.65	20.9999993	tr[E9AYX8]E9AYX8_LEIMU	Putative small GTP-binding protein Rab1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_0760 PE=4 SV=1	LEIMU	4
114	3.62	17.7499995	tr[E9AVG6]E9AVG6_LEIMU	Proteasome subunit alpha type OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_1700 PE=3 SV=1	LEIMU	2
115	3.61	10.3100002	tr[E9AUF1]E9AUF1_LEIMU	Phosphoglycerate kinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_0110 PE=3 SV=1	LEIMU	2
116	3.45	12.1200003	tr[E9AUA1]E9AUA1_LEIMU	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_6650 PE=3 SV=1	LEIMU	2
117	3.41	16.5999994	tr[E9AKP2]E9AKP2_LEIMU	Proteasome subunit beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_06_0140 PE=3 SV=1	LEIMU	2
118	3.37	7.59899989	tr[E9AZT9]E9AZT9_LEIMU	Putative glucose-regulated protein 78 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_1200 PE=3 SV=1	LEIMU	2
119	3.32	1.91799998	tr[E9B4D3]E9B4D3_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_2910 PE=4 SV=1	LEIMU	2
120	3.28	25.1599997	tr[E9AWJ0]E9AWJ0_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_23_1580 PE=1 SV=1	LEIMU	2
121	3.28	5.88200018	tr[E9AYS1]E9AYS1_LEIMU	Proteasome endopeptidase complex OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_0190 PE=3 SV=1	LEIMU	2
122	3.21	11.7600001	tr[E9APJ2]E9APJ2_LEIMU	Pyrroline-5-carboxylate reductase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_1680 PE=3 SV=1	LEIMU	2
123	3.17	4.38599996	tr[E9AJG4]E9AJG4_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_01_0770 PE=3 SV=1	LEIMU	1
124	3.12	13.8799995	tr[E9AXW8]E9AXW8_LEIMU	Putative serine/threonine-protein kinase (Putative protein kinase) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_25_2340 PE=3 SV=1	LEIMU	3
125	3.1	2.83899996	tr[E9AM16]E9AM16_LEIMU	Putative ABC transporter OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_0620 PE=4 SV=1	LEIMU	2
126	3.09	22.8300005	tr[E9B6R2]E9B6R2_LEIMU	Proteasome subunit beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_3840 PE=3 SV=1	LEIMU	2
127	3.08	41.1000013	tr[E9AUR2]E9AUR2_LEIMU	DUF1935 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1220 PE=4 SV=1	LEIMU	2
128	2.94	7.39400014	tr[E9B215]E9B215_LEIMU	Prostaglandin f2-alpha synthase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_2150 PE=4 SV=1	LEIMU	2
129	2.83	14.5500004	tr[E9ANP7]E9ANP7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_11_1030 PE=4 SV=1	LEIMU	2
130	2.82	3.41399983	tr[E9B5P1]E9B5P1_LEIMU	Pyruvate kinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_0030 PE=3 SV=1	LEIMU	3
131	2.77	3.14299986	tr[E9B3G5]E9B3G5_LEIMU	Putative myosin heavy chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_3870 PE=3 SV=1	LEIMU	2



132	2.75	7.93099999	tr[E9AXZ9]E9AXZ9_LEIMU	Putative 60S ribosomal protein L7 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0180 PE=3 SV=1	LEIMU	1
132	0	9.12699997	tr[E9AXZ8]E9AXZ8_LEIMU	Putative 60S ribosomal protein L7 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0170 PE=3 SV=1	LEIMU	1
133	2.61	11.9999997	tr[E9AQI0]E9AQI0_LEIMU	Protein tyrosine phosphatase-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_16_0230 PE=4 SV=1	LEIMU	2
134	2.58	14.3399999	tr[E9AKJ6]E9AKJ6_LEIMU	Surface antigen-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_05_0900 PE=4 SV=1	LEIMU	3
135	2.53	7.93699995	tr[E9AUR7]E9AUR7_LEIMU	DUF1935 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1270 PE=4 SV=1	LEIMU	1
136	2.5	7.64300004	tr[E9B201]E9B201_LEIMU	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_2020 PE=4 SV=1	LEIMU	2
137	2.47	4.14300002	tr[E9B4D9]E9B4D9_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_2980 PE=4 SV=1	LEIMU	2
138	2.4	2.66200006	tr[E9AM00]E9AM00_LEIMU	Putative U-box domain protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_0780 PE=4 SV=1	LEIMU	1
139	2.39	8.36500004	tr[E9B1Q4]E9B1Q4_LEIMU	Biotin/lipoate protein ligase-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_1070 PE=4 SV=1	LEIMU	2
140	2.38	4.94900011	tr[E9AUQ9]E9AUQ9_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1190 PE=4 SV=1	LEIMU	1
141	2.25	6.05099984	tr[E9ARU2]E9ARU2_LEIMU	Nonspecific nucleoside hydrolase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_1580 PE=3 SV=1	LEIMU	1
142	2.25	7.48300031	tr[E9AR59]E9AR59_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_17_0860 PE=4 SV=1	LEIMU	1
143	2.19	10.1599999	tr[E9AQ29]E9AQ29_LEIMU	Ribonucleoprotein p18, mitochondrial, putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_15_0275 PE=4 SV=1	LEIMU	1
144	2.19	15.6200007	tr[E9ALE4]E9ALE4_LEIMU	IU_nuc_hydro domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_2800 PE=3 SV=1	LEIMU	5
145	2.17	10.7699998	tr[E9AT63]E9AT63_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_2850 PE=4 SV=1	LEIMU	2
146	2.16	1.76999997	tr[E9ALA1]E9ALA1_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0840 PE=4 SV=1	LEIMU	1
146	0	0.91779996	tr[E9AL99]E9AL99_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0830 PE=4 SV=1	LEIMU	1
146	0	1.107	tr[E9ALA0]E9ALA0_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0831 PE=4 SV=1	LEIMU	1
147	2.16	15.2899995	tr[E9AL54]E9AL54_LEIMU	Maoc family dehydratase-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0430 PE=4 SV=1	LEIMU	1

148	2.13	1.33300005	tr[E9AV82]E9AV82_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_0980 PE=4 SV=1	LEIMU	1
149	2.13	1.91500001	tr[E9AT96]E9AT96_LEIMU	ATP pyrophosphate-lyase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_3180 PE=4 SV=1	LEIMU	1
150	2.11	4.61999997	tr[E9AWB0]E9AWB0_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_23_0980 PE=4 SV=1	LEIMU	1
151	2.09	3.24099995	tr[E9ASA6]E9ASA6_LEIMU	Peptidylprolyl isomerase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_1530 PE=4 SV=1	LEIMU	1
152	2.07	6.21999986	tr[E9ATV1]E9ATV1_LEIMU	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_5170 PE=3 SV=1	LEIMU	1
153	2.06	7.57599995	tr[E9AQN5]E9AQN5_LEIMU	Transaldolase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_16_0760 PE=3 SV=1	LEIMU	1
154	2.04	6.13700002	tr[E9B1N1]E9B1N1_LEIMU	Putative c2 domain protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0790 PE=4 SV=1	LEIMU	1
155	2.04	3.42799984	tr[E9AX52]E9AX52_LEIMU	Transketolase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_24_2060 PE=3 SV=1	LEIMU	1
156	2.04	2.69399993	tr[E9ARP6]E9ARP6_LEIMU	Phosphodiesterase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_1090 PE=3 SV=1	LEIMU	1
157	2.03	3.06100007	tr[E9B1J0]E9B1J0_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0390 PE=4 SV=1	LEIMU	1
158	2.03	4.29299995	tr[E9AZE9]E9AZE9_LEIMU	Putative heat shock protein DNAJ OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_2400 PE=3 SV=1	LEIMU	1
159	2.03	9.80399996	tr[E9AVX8]E9AVX8_LEIMU	I/6 autoantigen-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_22_1460 PE=4 SV=1	LEIMU	1
160	2.03	3.17200013	tr[E9ALU9]E9ALU9_LEIMU	TPR_REGION domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1240 PE=4 SV=1	LEIMU	1
161	2.03	8.24399963	tr[E9AXT3]E9AXT3_LEIMU	HpcH_Hpal domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_25_2010 PE=4 SV=1	LEIMU	1
162	2.02	8.54699984	tr[E9APH0]E9APH0_LEIMU	Programmed cell death 6 protein-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_1460 PE=4 SV=1	LEIMU	1
163	2.01	7.64499977	tr[E9AQL2]E9AQL2_LEIMU	Aspartate carbamoyltransferase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_16_0540 PE=3 SV=1	LEIMU	1
164	2.01	3.61899994	tr[E9AXJ6]E9AXJ6_LEIMU	ATP synthase subunit beta OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_25_1170 PE=3 SV=1	LEIMU	1
165	2.01	7.96800032	tr[E9AWS6]E9AWS6_LEIMU	Triosephosphate isomerase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_24_0850 PE=3 SV=1	LEIMU	1
166	2.01	7.63999969	tr[E9ALH4]E9ALH4_LEIMU	Vesicle-fusing ATPase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_2500 PE=3 SV=1	LEIMU	2

167	2	21.2300003	tr[E9AP03]E9AP03_LEIMU	Putative surface antigen protein 2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0891 PE=4 SV=1	LEIMU	6
167	0	22.6199999	tr[E9AP07]E9AP07_LEIMU	Promastigote surface antigen protein 2 PSA2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0980 PE=4 SV=1	LEIMU	6
167	0	18.2899997	tr[E9AP02]E9AP02_LEIMU	Putative surface antigen protein 2 (Fragment) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0890 PE=4 SV=1	LEIMU	4
167	0	35.3199989	tr[E9AP01]E9AP01_LEIMU	Putative surface antigen protein 2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0870 PE=4 SV=1	LEIMU	6
168	2	6.37700036	tr[E9ALD1]E9ALD1_LEIMU	Proteasome regulatory non-ATP-ase subunit,putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_1120 PE=3 SV=1	LEIMU	1
169	2	6.69300035	tr[E9B602]E9B602_LEIMU	Putative short chain dehydrogenase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1230 PE=4 SV=1	LEIMU	1
170	2	6.70399964	tr[E9B5U1]E9B5U1_LEIMU	60S ribosomal protein L18a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_0600 PE=3 SV=1	LEIMU	1
170	0	6.70399964	tr[E9B2L2]E9B2L2_LEIMU	60S ribosomal protein L18a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_0880 PE=3 SV=1	LEIMU	1
171	2	5.858	tr[E9B2D3]E9B2D3_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_0130 PE=4 SV=1	LEIMU	1
172	2	8.7059997	tr[E9AUX2]E9AUX2_LEIMU	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_0060 PE=3 SV=1	LEIMU	1
173	2	4.86599989	tr[E9ANU8]E9ANU8_LEIMU	Proteasome regulatory ATPase subunitcc118.3,putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0210 PE=3 SV=1	LEIMU	1
174	2	6.45200014	tr[E9AMU2]E9AMU2_LEIMU	Putative ef-hand protein 5 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_09_0900 PE=4 SV=1	LEIMU	1
175	2	8.48499984	tr[E9AK00]E9AK00_LEIMU	Surface antigen-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_0180 PE=4 SV=1	LEIMU	1
176	2	3.39000002	tr[E9B705]E9B705_LEIMU	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Cyclophilin-40) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_4770 PE=4 SV=1	LEIMU	1
177	2	6.43600002	tr[E9B6X6]E9B6X6_LEIMU	CS domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_4470 PE=4 SV=1	LEIMU	1
178	2	11.5599997	tr[E9B6P8]E9B6P8_LEIMU	Putative Gim5A protein (Glycosomal membrane protein) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_3700 PE=4 SV=1	LEIMU	1
179	2	16.2200004	tr[E9B609]E9B609_LEIMU	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1300 PE=3 SV=1	LEIMU	1
180	2	3.95499989	tr[E9B5Y1]E9B5Y1_LEIMU	Putative casein kinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1010 PE=3 SV=1	LEIMU	1
181	2	3.52899991	tr[E9B5E5]E9B5E5_LEIMU	ANK_REP_REGION domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_3560 PE=4 SV=1	LEIMU	1

182	2	6.04199991	tr[E9B515]E9B515_LEIMU	Putative G-actin binding protein (Putative twinfilin) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_2290 PE=3 SV=1	LEIMU	1
183	2	3.02099995	tr[E9B4Y7]E9B4Y7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_2020 PE=4 SV=1	LEIMU	1
184	2	5.41899987	tr[E9B4R9]E9B4R9_LEIMU	Amastin-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_0970 PE=4 SV=1	LEIMU	1
185	2	0.79070004	tr[E9B4L4]E9B4L4_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_33_0460 PE=4 SV=1	LEIMU	1
186	2	1.53599996	tr[E9B4D6]E9B4D6_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_2940 PE=4 SV=1	LEIMU	1
187	2	3.39000002	tr[E9B3Z8]E9B3Z8_LEIMU	Putative peptidase M20/M25/M40 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_1610 PE=4 SV=1	LEIMU	1
188	2	11.3700002	tr[E9B3Z3]E9B3Z3_LEIMU	Ribulose-phosphate 3-epimerase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_1570 PE=3 SV=1	LEIMU	1
189	2	5.55600002	tr[E9B3W9]E9B3W9_LEIMU	Cysteine conjugate beta-lyase,aminotransferase-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_1330 PE=4 SV=1	LEIMU	1
190	2	13.4599999	tr[E9B3G8]E9B3G8_LEIMU	Putative 60S ribosomal protein L2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_3900 PE=4 SV=1	LEIMU	1
191	2	5.84399998	tr[E9B387]E9B387_LEIMU	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_3040 PE=3 SV=1	LEIMU	1
192	2	5.15500009	tr[E9B369]E9B369_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_2890 PE=3 SV=1	LEIMU	1
193	2	2.20400002	tr[E9B340]E9B340_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_2610 PE=4 SV=1	LEIMU	1
194	2	2.29000002	tr[E9B2V8]E9B2V8_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_1810 PE=4 SV=1	LEIMU	1
195	2	6.11199997	tr[E9B2M3]E9B2M3_LEIMU	SB domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_0985 PE=4 SV=1	LEIMU	1
196	2	15.3300002	tr[E9B2H5]E9B2H5_LEIMU	Profilin OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_0520 PE=3 SV=1	LEIMU	1
197	2	5.68200015	tr[E9B2G6]E9B2G6_LEIMU	40S ribosomal protein S2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_0450 PE=3 SV=1	LEIMU	1
197	0	4.96699996	tr[E9ARV7]E9ARV7_LEIMU	40S ribosomal protein S2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0060 PE=3 SV=1	LEIMU	1
198	2	24.1799995	tr[E9B2E4]E9B2E4_LEIMU	Dynein light chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_0230 PE=3 SV=1	LEIMU	1
199	2	18.5399994	tr[E9B278]E9B278_LEIMU	Putative ADP-ribosylation factor OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_2790 PE=3 SV=1	LEIMU	2
200	2	4.67000008	tr[E9B234]E9B234_LEIMU	Putative p-nitrophenylphosphatase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_2340 PE=4 SV=1	LEIMU	1

201	2	7.3710002	tr[E9B1X5]E9B1X5_LEIMU	Nucleosome assembly protein-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_1750 PE=3 SV=1	LEIMU	1
202	2	6.51199967	tr[E9B1M9]E9B1M9_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0771 PE=4 SV=1	LEIMU	1
202	0	4.6670001	tr[E9B1M7]E9B1M7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_0760 PE=4 SV=1	LEIMU	1
203	2	4.14500013	tr[E9B164]E9B164_LEIMU	Putative mitogen-activated protein kinase 5 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_2910 PE=3 SV=1	LEIMU	1
204	2	5.52500002	tr[E9B0U9]E9B0U9_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_1770 PE=3 SV=1	LEIMU	1
205	2	4.96699996	tr[E9B0Q4]E9B0Q4_LEIMU	Pyridoxal kinase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_1250 PE=3 SV=1	LEIMU	1
206	2	3.71100008	tr[E9B0P1]E9B0P1_LEIMU	Importin subunit alpha OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_1120 PE=3 SV=1	LEIMU	1
207	2	20.4099998	tr[E9B0K2]E9B0K2_LEIMU	Putative 4-methyl-5(Beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_0750 PE=4 SV=1	LEIMU	1
208	2	4.16699983	tr[E9B0G2]E9B0G2_LEIMU	Putative phosphatase 2C OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_0380 PE=4 SV=1	LEIMU	1
209	2	2.21999995	tr[E9AZZ2]E9AZZ2_LEIMU	Proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 2,putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_1730 PE=3 SV=1	LEIMU	1
210	2	2.18400005	tr[E9AYA3]E9AYA3_LEIMU	Heat shock protein 70-related protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_1240 PE=3 SV=1	LEIMU	1
211	2	10.4800001	tr[E9AY61]E9AY61_LEIMU	Putative asparagine synthetase a (Putative aspartate--ammonia ligase) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0830 PE=4 SV=1	LEIMU	1
212	2	5.74700013	tr[E9AY60]E9AY60_LEIMU	Glutathione peroxidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0810 PE=3 SV=1	LEIMU	1
212	0	5.46399988	tr[E9AY59]E9AY59_LEIMU	Glutathione peroxidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0800 PE=3 SV=1	LEIMU	1
213	2	9.73199978	tr[E9AY14]E9AY14_LEIMU	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_26_0320 PE=3 SV=1	LEIMU	1
214	2	5.198	tr[E9AXU8]E9AXU8_LEIMU	BRO1 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_25_2150 PE=3 SV=1	LEIMU	1
215	2	18.8800007	tr[E9AV90]E9AV90_LEIMU	Putative 40S ribosomal protein S23 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_1060 PE=3 SV=1	LEIMU	1
216	2	5.26299998	tr[E9AV30]E9AV30_LEIMU	Putative phosphoglucomutase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_21_0640 PE=3 SV=1	LEIMU	1
217	2	3.90099995	tr[E9AUV0]E9AUV0_LEIMU	Soluble n-ethylmaleimide sensitive factor,putative OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1690 PE=3 SV=1	LEIMU	1

218	2	7.82599971	tr[E9AU61]E9AU61_LEIMU	Putative chaperone protein DNAj OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_6270 PE=4 SV=1	LEIMU	1
219	2	2.87599992	tr[E9AU41]E9AU41_LEIMU	MIF4G domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_6060 PE=4 SV=1	LEIMU	1
220	2	5.61500005	tr[E9AU26]E9AU26_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_5910 PE=4 SV=1	LEIMU	1
221	2	2.85	tr[E9ATX8]E9ATX8_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_5430 PE=4 SV=1	LEIMU	1
222	2	10.9499998	tr[E9AT64]E9AT64_LEIMU	40S ribosomal protein S24 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_2860 PE=3 SV=1	LEIMU	1
223	2	11.2899996	tr[E9ASM7]E9ASM7_LEIMU	Putative ribosomal protein L24 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_1070 PE=3 SV=1	LEIMU	1
224	2	2.67999992	tr[E9ASD3]E9ASD3_LEIMU	Fructose-6-phosphate2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_0150 PE=4 SV=1	LEIMU	1
225	2	20.6900001	tr[E9AS15]E9AS15_LEIMU	Putative histone H3 variant OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_19_0630 PE=3 SV=1	LEIMU	1
226	2	3.61099988	tr[E9ARQ2]E9ARQ2_LEIMU	RING-type domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_1150 PE=4 SV=1	LEIMU	1
227	2	4.789	tr[E9ARG4]E9ARG4_LEIMU	Protein kinase domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_0270 PE=3 SV=1	LEIMU	1
228	2	5.39800003	tr[E9ARF8]E9ARF8_LEIMU	Aha1_N domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_18_0210 PE=3 SV=1	LEIMU	1
229	2	7.88199976	tr[E9AQQ1]E9AQQ1_LEIMU	Putative flagellar calcium-binding protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_16_0920 PE=3 SV=1	LEIMU	1
229	0	10.0000001	tr[E9AQQ0]E9AQQ0_LEIMU	Putative flagellar calcium-binding protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_16_0910 PE=4 SV=1	LEIMU	1
230	2	3.09500005	tr[E9AQ59]E9AQ59_LEIMU	CRAL-TRIO domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_15_0610 PE=4 SV=1	LEIMU	1
231	2	4.90799993	tr[E9APQ0]E9APQ0_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_0560 PE=4 SV=1	LEIMU	1
232	2	0.87660002	tr[E9ANY4]E9ANY4_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0560 PE=4 SV=1	LEIMU	1
233	2	3.06100007	tr[E9ANV2]E9ANV2_LEIMU	Cysteinyl-tRNA synthetase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_12_0250 PE=3 SV=1	LEIMU	1
234	2	5.92899993	tr[E9ANI1]E9ANI1_LEIMU	Putative 14-3-3 protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_11_0350 PE=3 SV=1	LEIMU	1
235	2	5.15800007	tr[E9AM47]E9AM47_LEIMU	TPR_REGION domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_0320 PE=4 SV=1	LEIMU	1

236	2	1.96100008	tr[E9ALI0]E9ALI0_LEIMU	Phosphodiesterase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_2440 PE=3 SV=1	LEIMU	2
237	2	4.54499982	tr[E9ALD3]E9ALD3_LEIMU	Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_1140 PE=3 SV=1	LEIMU	1
238	2	7.35799968	tr[E9AL63]E9AL63_LEIMU	60S ribosomal protein L7a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0510 PE=3 SV=1	LEIMU	1
238	0	8.3329998	tr[E9AL62]E9AL62_LEIMU	60S ribosomal protein L7a OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0500 PE=3 SV=1	LEIMU	1
239	2	2.31699999	tr[E9AKX6]E9AKX6_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_06_0980 PE=4 SV=1	LEIMU	2
240	2	3.50599997	tr[E9AJQ8]E9AJQ8_LEIMU	Putative long chain fatty Acyl CoA synthetase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_03_0230 PE=4 SV=1	LEIMU	1
241	2	3.8350001	tr[E9AJN6]E9AJN6_LEIMU	Putative peptidyl dipeptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_02_0740 PE=3 SV=1	LEIMU	1
242	2	19.0200001	tr[E9AJL7]E9AJL7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_02_0550 PE=4 SV=1	LEIMU	1
243	1.96	7.74599984	tr[E9AKM8]E9AKM8_LEIMU	Surface antigen-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_05_1215 PE=4 SV=1	LEIMU	1
244	1.92	10.61	tr[E9B110]E9B110_LEIMU	ADP-ribosylation factor-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_2370 PE=3 SV=1	LEIMU	1
245	1.89	16.7400002	tr[E9AZ49]E9AZ49_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_1440 PE=4 SV=1	LEIMU	1
246	1.84	0.93019996	tr[E9APD4]E9APD4_LEIMU	Leucyl-tRNA synthetase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_1100 PE=3 SV=1	LEIMU	1
247	1.8	23.9299998	tr[E9B3S3]E9B3S3_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_0910 PE=4 SV=1	LEIMU	1
248	1.77	9.74399969	tr[E9B2V9]E9B2V9_LEIMU	Superoxide dismutase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_1820 PE=3 SV=1	LEIMU	2
248	0	9.13499966	tr[E9B2W0]E9B2W0_LEIMU	Superoxide dismutase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_31_1830 PE=3 SV=1	LEIMU	2
249	1.77	7.74599984	tr[E9AX61]E9AX61_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_24_2150 PE=4 SV=1	LEIMU	1
250	1.7	2.39100009	tr[E9ALS6]E9ALS6_LEIMU	ANK_REP_REGION domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_1470 PE=4 SV=1	LEIMU	1
251	1.68	10.1400003	tr[E9API2]E9API2_LEIMU	Ubiquitin-conjugating enzyme-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_1580 PE=4 SV=1	LEIMU	1
252	1.68	0.50679999	tr[E9AYV2]E9AYV2_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_27_0510 PE=4 SV=1	LEIMU	1
253	1.65	4.14399989	tr[E9AVW8]E9AVW8_LEIMU	Putative farnesyl pyrophosphate synthase OS=Leishmania mexicana (strain	LEIMU	1

MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_22_1360 PE=3 SV=1						
254	1.64	1.27100004	tr[E9B620]E9B620_LEIMU	Threonyl-tRNA synthetase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1410 PE=3 SV=1	LEIMU	1
255	1.6	5.5399999	tr[E9B170]E9B170_LEIMU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_2980 PE=3 SV=1	LEIMU	1
256	1.59	2.82300003	tr[E9AKN1]E9AKN1_LEIMU	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_06_0030 PE=3 SV=1	LEIMU	1
257	1.57	6.14299998	tr[E9AQE0]E9AQE0_LEIMU	Proliferating cell nuclear antigen OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_15_1450 PE=3 SV=1	LEIMU	1
258	1.51	8.51100013	tr[E9AK29]E9AK29_LEIMU	60S ribosomal protein L11 (L5, L16) OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_0470 PE=3 SV=1	LEIMU	1
259	1.49	9.54099968	tr[E9AK40]E9AK40_LEIMU	Putative spermidine synthase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_04_0580 PE=3 SV=1	LEIMU	1
260	1.48	11.3700002	tr[E9ASC5]E9ASC5_LEIMU	Stress-inducible protein STI1 homolog OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_0070 PE=4 SV=1	LEIMU	1
261	1.47	5.37800007	tr[E9B483]E9B483_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_2440 PE=4 SV=1	LEIMU	1
262	1.45	3.69299985	tr[E9APK7]E9APK7_LEIMU	Nucleoside hydrolase-like protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_14_0130 PE=4 SV=1	LEIMU	1
263	1.41	21.8500003	tr[E9AUR8]E9AUR8_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_20_1280 PE=4 SV=1	LEIMU	3
264	1.38	7.63600022	tr[E9B0H1]E9B0H1_LEIMU	Aspartyl-tRNA synthetase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_29_0460 PE=3 SV=1	LEIMU	2
265	1.34	1.91500001	tr[E9AKK2]E9AKK2_LEIMU	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_05_0960 PE=3 SV=1	LEIMU	1

Tabla 4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN LOS EXOSOMAS DE AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana* aExo (LCL)

N	Unused	Total	% Cov (95)	Accession	Name	Species	Peptides (95%)
1	6.59	6.59	7.79799968	tr E9B099 E9B099_LEIMU	Putative heat-shock protein hsp70 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_28_2770 PE=3 SV=1	LEIMU	3
2	3.66	3.66	5.6570001	tr E9AP62 E9AP62_LEIMU	Tubulin alpha chain OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_13_0280 PE=3 SV=1	LEIMU	2
3	3.42	3.43	3.56599987	tr E9B3L2 E9B3L2_LEIMU	Heat shock protein 83-1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_32_0312 PE=3 SV=1	LEIMU	2
4	2.01	2.01	3.57099995	tr E9AT13 E9AT13_LEIMU	Putative tyrosine aminotransferase OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_36_2360 PE=3 SV=1	LEIMU	1
5	2.01	2.01	1.58300009	tr E9AKJ8 E9AKJ8_LEIMU	Putative paraflagellar rod protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_05_0920 PE=4 SV=1	LEIMU	1
6	2	2	1.82099994	tr E9B744 E9B744_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_5180 PE=4 SV=1	LEIMU	1
7	2	2	2.68600006	tr E9B696 E9B696_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_2170 PE=4 SV=1	LEIMU	1
8	2	2	1.02500003	tr E9B2A2 E9B2A2_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_30_3030 PE=4 SV=1	LEIMU	1
9	2	2	0.87390002	tr E9ALL4 E9ALL4_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_29_2090 PE=4 SV=1	LEIMU	1
10	2	2	0.2873	tr E9AL60 E9AL60_LEIMU	DHC_N2 domain-containing protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_07_0480 PE=4 SV=1	LEIMU	1
11	2	2	3.50399986	tr E9B6S9 E9B6S9_LEIMU	Protein kinase A catalytic subunit isoform 1 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_4010 PE=3 SV=1	LEIMU	1
12	2	2	3.95100005	tr E9B625 E9B625_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_34_1460 PE=4 SV=1	LEIMU	1
13	2	2	2.513	tr E9APC0 E9APC0_LEIMU	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=KATNAL2 PE=3 SV=1	LEIMU	1
14	2	2	1.22199999	tr E9ANH7 E9ANH7_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_11_0310 PE=4 SV=1	LEIMU	1
15	2	2	4.76199985	tr E9AM97 E9AM97_LEIMU	Uncharacterized protein OS=Leishmania mexicana (strain MHOM/GT/2001/U1103) OX=929439 GN=LMXM_08_0180 PE=4 SV=1	LEIMU	1

Tabla 5. PROTEINAS IDENTIFICADAS EN LOS EXOSOMAS DE AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana* aExo (LCL) COMPARANDO CON LA ESPECIE *Bos Taurus*

N	Unused	% Cov (95)	Accession	Name	Species	Peptides (95%)
1	216.48	70.4999983	sp Q2UVX4 CO3_BOVIN	Complement C3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C3 PE=1 SV=2	BOVIN	192
2	193.89	86.1599982	cont 000035	gj 2190337 emb CAA41735.1 serum albumin [Bos taurus (contaminant)]	Bos taurus (contaminant)	348
3	191.42	71.0600019	sp Q7SIH1 A2MG_BOVIN	Alpha-2-macroglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=A2M PE=1 SV=2	BOVIN	197
4	108.39	72.5399971	sp P06868 PLMN_BOVIN	Plasminogen OS=Bos taurus OX=9913 GN=PLG PE=1 SV=2	BOVIN	74
5	91.18	69.8899984	sp Q29443 TRFE_BOVIN	Serotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=TF PE=2 SV=1	BOVIN	121
6	87.65	58.2499981	sp Q28085 CFAH_BOVIN	Complement factor H OS=Bos taurus OX=9913 GN=CFH PE=1 SV=3	BOVIN	57
7	84.53	75.2499998	sp Q3SZ57 FETA_BOVIN	Alpha-fetoprotein OS=Bos taurus OX=9913 GN=AFP PE=2 SV=1	BOVIN	104
8	79.35	23.5599995	sp Q28107 FA5_BOVIN	Coagulation factor V OS=Bos taurus OX=9913 GN=F5 PE=1 SV=1	BOVIN	42
9	71.53	41.5399998	sp Q28178 TSP1_BOVIN	Thrombospondin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=THBS1 PE=2 SV=2	BOVIN	53
10	70.45	52.3000002	sp P81187 CFAB_BOVIN	Complement factor B OS=Bos taurus OX=9913 GN=CFB PE=1 SV=2	BOVIN	55
11	69.15	87.1900022	sp P12763 FETUA_BOVIN	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Bos taurus OX=9913 GN=AHSG PE=1 SV=2	BOVIN	139
12	65.39	53.6000013	sp P00735 THRB_BOVIN	Prothrombin OS=Bos taurus OX=9913 GN=F2 PE=1 SV=2	BOVIN	48
13	62.38	43.8800007	sp P56652 ITIH3_BOVIN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ITIH3 PE=1 SV=2	BOVIN	53
14	62.18	55.3499997	sp Q3T052 ITIH4_BOVIN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ITIH4 PE=1 SV=1	BOVIN	49
15	56.44	43.7000006	sp P01030 CO4_BOVIN	Complement C4 (Fragments) OS=Bos taurus OX=9913 GN=C4 PE=1 SV=2	BOVIN	33
16	54.3	69.7099984	sp P34955 A1AT_BOVIN	Alpha-1-antitrypsin OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA1 PE=1 SV=1	BOVIN	74
17	54.08	44.5899993	sp Q0VCM5 ITIH1_BOVIN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ITIH1 PE=1 SV=1	BOVIN	40
18	51.66	64.5600021	sp Q3MHN5 VTDB_BOVIN	Vitamin D-binding protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=GC PE=2 SV=1	BOVIN	44
19	46.02	40.5699998	sp Q29RQ1 CO7_BOVIN	Complement component C7 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C7 PE=2 SV=1	BOVIN	28
20	43.21	50.4299998	sp P02676 FIBB_BOVIN	Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FGB PE=1 SV=2	BOVIN	25
21	42.94	44.7499999	sp Q28065 C4BPA_BOVIN	C4b-binding protein alpha chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=C4BPA PE=2 SV=1	BOVIN	25
22	41.02	14.3700004	sp P07589 FINC_BOVIN	Fibronectin OS=Bos taurus OX=9913 GN=FN1 PE=1 SV=4	BOVIN	22
23	40	56.5999985	sp P15497 APOA1_BOVIN	Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOA1 PE=1 SV=3	BOVIN	24
24	38.29	56.4899981	sp Q95121 PEDF_BOVIN	Pigment epithelium-derived factor OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINF1 PE=1 SV=1	BOVIN	29



25	37.89	66.7999983	sp Q2KJF1 A1BG_BOVIN	Alpha-1B-glycoprotein OS=Bos taurus OX=9913 GN=A1BG PE=1 SV=1	BOVIN	23
26	37.13	45.9899992	sp Q3MHN2 CO9_BOVIN	Complement component C9 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C9 PE=2 SV=1	BOVIN	25
27	36.59	40.079999	sp Q3SX14 GELS_BOVIN	Gelsolin OS=Bos taurus OX=9913 GN=GSN PE=2 SV=1	BOVIN	23
28	35.45	9.75100026	sp P01267 THYG_BOVIN	Thyroglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=TG PE=1 SV=1	BOVIN	17
29	35	53.3500016	sp P81948 TBA4A_BOVIN	Tubulin alpha-4A chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=TUBA4A PE=1 SV=2	BOVIN	19
30	33.38	51.8000007	sp P12799 FIBG_BOVIN	Fibrinogen gamma-B chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FGG PE=1 SV=1	BOVIN	26
31	32.28	36.7500007	sp G3MYZ3 AFAM_BOVIN	Afamin OS=Bos taurus OX=9913 GN=AFM PE=1 SV=1	BOVIN	18
32	31.87	48.15	sp Q3SZV7 HEMO_BOVIN	Hemopexin OS=Bos taurus OX=9913 GN=HPX PE=2 SV=1	BOVIN	18
33	31.47	26.820001	sp Q29RU4 CO6_BOVIN	Complement component C6 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C6 PE=2 SV=1	BOVIN	17
34	31.05	61.2600029	sp Q2KJD0 TBB5_BOVIN	Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=TUBB5 PE=2 SV=1	BOVIN	19
35	31.03	35.2699995	sp P01044 KNG1_BOVIN	Kininogen-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KNG1 PE=1 SV=1	BOVIN	20
36	30.87	29.1999996	sp Q76LV2 HS90A_BOVIN	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=3	BOVIN	16
37	30.13	24.2500007	sp Q3SWW8 TSP4_BOVIN	Thrombospondin-4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=THBS4 PE=2 SV=1	BOVIN	17
38	30.11	65.6000018	sp P63258 ACTG_BOVIN	Actin, cytoplasmic 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACTG1 PE=1 SV=1"	BOVIN	19
39	29.97	32.8500003	sp P02672 FIBA_BOVIN	Fibrinogen alpha chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FGA PE=1 SV=5	BOVIN	20
40	28.99	58.4200025	sp Q32PJ2 APOA4_BOVIN	Apolipoprotein A-IV OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOA4 PE=2 SV=1	BOVIN	17
41	28.77	86.9000018	sp P02081 HBBF_BOVIN	Hemoglobin fetal subunit beta OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=1	BOVIN	36
42	28.13	35.1300001	sp Q5E9Z2 HABP2_BOVIN	Hyaluronan-binding protein 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=HABP2 PE=2 SV=1	BOVIN	15
43	25.51	45.0300008	sp Q05443 LUM_BOVIN	Lumican OS=Bos taurus OX=9913 GN=LUM PE=1 SV=1	BOVIN	16
44	25.45	44.9299991	sp P17690 APOH_BOVIN	Beta-2-glycoprotein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOH PE=1 SV=4	BOVIN	21
45	24.71	37.8500015	sp P41361 ANT3_BOVIN	Antithrombin-III OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINC1 PE=1 SV=2	BOVIN	15
46	24.15	28.7099987	sp Q27975 HS71A_BOVIN	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSPA1A PE=1 SV=2	BOVIN	13
47	24	51.3499975	sp P10096 G3P_BOVIN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=GAPDH PE=1 SV=4	BOVIN	13
48	23.66	44.3599999	sp Q3T0P6 PGK1_BOVIN	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PGK1 PE=2 SV=3	BOVIN	12
49	23.47	31.7499995	sp P35445 COMP_BOVIN	Cartilage oligomeric matrix protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=COMP PE=1 SV=2	BOVIN	18
50	23.34	47.1500009	sp Q03247 APOE_BOVIN	Apolipoprotein E OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOE PE=1 SV=1	BOVIN	15
51	23.33	40.6300008	sp Q9TT36 THBG_BOVIN	Thyroxine-binding globulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA7 PE=2 SV=1	BOVIN	12

52	23.15	45.6200004	sp Q9XSJ4 ENOA_BOVIN	Alpha-enolase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ENO1 PE=1 SV=4	BOVIN	15
53	22.82	35.5199993	sp A2I7M9 SPA32_BOVIN	Serp1n A3-2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA3-2 PE=3 SV=1	BOVIN	14
54	22.7	31.6599995	sp P17697 CLUS_BOVIN	Clusterin OS=Bos taurus OX=9913 GN=CLU PE=1 SV=1	BOVIN	15
55	21.24	78.8699985	sp P01966 HBA_BOVIN	Hemoglobin subunit alpha OS=Bos taurus OX=9913 GN=HBA PE=1 SV=2	BOVIN	26
56	20.76	21.0800007	sp P19120 HSP7C_BOVIN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSPA8 PE=1 SV=2	BOVIN	12
57	20.45	39.8299992	sp Q2KJ83 CBPN_BOVIN	Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=CPN1 PE=2 SV=1	BOVIN	11
58	20.13	43.1499988	sp Q58D62 FETUB_BOVIN	Fetuin-B OS=Bos taurus OX=9913 GN=FETUB PE=1 SV=1	BOVIN	37
59	19.6	33.5200012	sp P00978 AMBP_BOVIN	Protein AMBP OS=Bos taurus OX=9913 GN=AMBP PE=1 SV=2	BOVIN	15
60	19.47	35.3799999	sp Q3SYV4 CAP1_BOVIN	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CAP1 PE=2 SV=3	BOVIN	11
61	19.25	31.4799994	sp Q3MHL4 SAHH_BOVIN	Adenosylhomocysteinase OS=Bos taurus OX=9913 GN=AHCY PE=2 SV=3	BOVIN	10
62	18.26	21.5000004	cont 000108	gij 3024050 sp O02668 ITI1H2_PIG Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor (ITI heavy chain H2) (Inter-alpha-inhibitor heavy chain 2) [Sus scrofa (contaminant)]	Sus scrofa (contaminant)	31
63	18.03	17.1599999	sp Q0VCM4 PYGL_BOVIN	Glycogen phosphorylase, liver form OS=Bos taurus OX=9913 GN=PYGL PE=2 SV=1"	BOVIN	11
64	18	65.2400017	sp P62935 PPIA_BOVIN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Bos taurus OX=9913 GN=PPIA PE=1 SV=2	BOVIN	12
65	17.95	20.4600006	sp Q0VCX1 C1S_BOVIN	Complement C1s subcomponent OS=Bos taurus OX=9913 GN=C1S PE=2 SV=2	BOVIN	10
66	17.82	44.5499986	sp Q3SZR3 A1AG_BOVIN	Alpha-1-acid glycoprotein OS=Bos taurus OX=9913 GN=ORM1 PE=2 SV=1	BOVIN	10
67	16.96	30.8899999	sp P28800 A2AP_BOVIN	Alpha-2-antiplasmin OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINF2 PE=1 SV=2	BOVIN	15
68	16.53	12.8199995	sp Q0VCU1 ACOC_BOVIN	Cytoplasmic aconitate hydratase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACO1 PE=2 SV=1	BOVIN	9
69	16.17	21.6199994	sp A7E3W2 LG3BP_BOVIN	Galectin-3-binding protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGALS3BP PE=1 SV=1	BOVIN	8
70	15.82	28.0099988	sp Q0VCG9 PTX3_BOVIN	Pentraxin-related protein PTX3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PTX3 PE=2 SV=1	BOVIN	9
71	15.57	60.5400026	sp O46375 TTHY_BOVIN	Transthyretin OS=Bos taurus OX=9913 GN=TTR PE=1 SV=1	BOVIN	9
72	15.43	31.3800007	sp Q3ZCJ2 AK1A1_BOVIN	Aldo-keto reductase family 1 member A1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=AKR1A1 PE=2 SV=1	BOVIN	8
73	14.52	39.9399996	sp P52898 DBBX_BOVIN	Dihydrodiol dehydrogenase 3 OS=Bos taurus OX=9913 PE=2 SV=1	BOVIN	15
74	14.34	50.9999999	sp P81644 APOA2_BOVIN	Apolipoprotein A-II OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOA2 PE=1 SV=2	BOVIN	16
75	14.27	20.2800006	sp Q2KJ63 KLKB1_BOVIN	Plasma kallikrein OS=Bos taurus OX=9913 GN=KLKB1 PE=2 SV=1	BOVIN	8
76	14.25	18.1700006	cont 000135	cra hCP1609934.2] keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis) [Homo sapiens (contaminant)]	Homo sapiens (contaminant)	10
77	14.21	30.340001	sp Q17QH6 COL11_BOVIN	Collectin-11 OS=Bos taurus OX=9913 GN=COLEC11 PE=2 SV=1	BOVIN	9

78	14.05	20.2999994	sp P50448 F12AI_BOVIN	Factor XIIIa inhibitor OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=1	BOVIN	9
79	14	24.7299999	sp P13605 FMOD_BOVIN	Fibromodulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=FMOD PE=1 SV=2	BOVIN	8
80	14	28.4700006	sp Q9N212 IPSP_BOVIN	Plasma serine protease inhibitor OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA5 PE=1 SV=1	BOVIN	7
81	12.41	64.9999976	sp P02584 PROF1_BOVIN	Profilin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PFN1 PE=1 SV=2	BOVIN	8
82	12.33	82.0699999	sp P02070 HBB_BOVIN	Hemoglobin subunit beta OS=Bos taurus OX=9913 GN=HBB PE=1 SV=1	BOVIN	18
83	12.26	41.7699993	sp Q5E956 TPIS_BOVIN	Triosephosphate isomerase OS=Bos taurus OX=9913 GN=TP11 PE=2 SV=3	BOVIN	7
84	12.22	50.4800022	sp P28801 GSTP1_BOVIN	Glutathione S-transferase P OS=Bos taurus OX=9913 GN=GSTP1 PE=1 SV=2	BOVIN	6
85	12.2	30.5599988	sp Q95122 CD14_BOVIN	Monocyte differentiation antigen CD14 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CD14 PE=2 SV=2	BOVIN	7
86	12.07	12.8000006	sp P00743 FA10_BOVIN	Coagulation factor X OS=Bos taurus OX=9913 GN=F10 PE=1 SV=1	BOVIN	6
87	11.49	23.9800006	sp A2I7N3 SPA37_BOVIN	Serpin A3-7 OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA3-7 PE=3 SV=1	BOVIN	8
88	10.61	24.2599994	sp E1BF81 CBG_BOVIN	Corticosteroid-binding globulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA6 PE=3 SV=1	BOVIN	7
89	10.59	26.67	sp Q3Y5Z3 ADIPO_BOVIN	Adiponectin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ADIPOQ PE=1 SV=1	BOVIN	6
90	10.52	31.0999999	sp P19879 MIME_BOVIN	Mimecan OS=Bos taurus OX=9913 GN=OGN PE=1 SV=2	BOVIN	8
91	10.38	14.1900003	sp Q0VCK0 PUR9_BOVIN	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Bos taurus OX=9913 GN=ATIC PE=2 SV=1	BOVIN	7
92	10.26	28.7600011	sp P37141 GPX3_BOVIN	Glutathione peroxidase 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GPX3 PE=2 SV=2	BOVIN	6
93	10.03	14.4099995	sp Q95M17 CHIA_BOVIN	Acidic mammalian chitinase OS=Bos taurus OX=9913 GN=CHIA PE=1 SV=1	BOVIN	6
94	10.03	33.1699997	sp Q2KIS7 TETN_BOVIN	Tetranectin OS=Bos taurus OX=9913 GN=CLEC3B PE=2 SV=1	BOVIN	5
95	10	48.4499991	sp Q2HJ86 TBA1D_BOVIN	Tubulin alpha-1D chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=TUBA1D PE=1 SV=1	BOVIN	16
96	10	14.0799999	sp Q5NTB3 FA11_BOVIN	Coagulation factor XI OS=Bos taurus OX=9913 GN=F11 PE=1 SV=1	BOVIN	5
97	10	36.3599986	sp P12260 F13A_BOVIN	Coagulation factor XIII A chain (Fragment) OS=Bos taurus OX=9913 GN=F13A1 PE=1 SV=2	BOVIN	5
98	10	12.3400003	sp P00741 FA9_BOVIN	Coagulation factor IX OS=Bos taurus OX=9913 GN=F9 PE=1 SV=2	BOVIN	5
99	10	41.7100012	sp O46415 FRIL_BOVIN	Ferritin light chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FTL PE=2 SV=3	BOVIN	5
100	9.85	26.0100007	sp P33433 HRG_BOVIN	Histidine-rich glycoprotein (Fragments) OS=Bos taurus OX=9913 GN=HRG PE=1 SV=1	BOVIN	7
101	9.18	9.26999971	sp Q24K22 HGFL_BOVIN	Hepatocyte growth factor-like protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=MST1 PE=2 SV=1	BOVIN	5
102	9.1	14.7200003	sp Q3ZBD7 G6PI_BOVIN	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Bos taurus OX=9913 GN=GPI PE=2 SV=4	BOVIN	7
103	8.88	44.8700011	sp P28783 S10A9_BOVIN	Protein S100-A9 OS=Bos taurus OX=9913 GN=S100A9 PE=1 SV=3	BOVIN	5

104	8.63	29.1500002	cont 000143	pdb 1FNI_A A Chain A, Crystal Structure Of Porcine Beta Trypsin With 0.01% Polydocanol [Sus scrofa (contaminant)]*	Sus scrofa (contaminant)	39
105	8.38	7.852	sp P07224 PROS_BOVIN	Vitamin K-dependent protein S OS=Bos taurus OX=9913 GN=PROS1 PE=1 SV=1	BOVIN	5
106	8.2	24.4100004	sp Q9TTJ5 RGN_BOVIN	Regucalcin OS=Bos taurus OX=9913 GN=RGN PE=2 SV=1	BOVIN	6
107	8.06	12.6499996	sp P19858 LDHA_BOVIN	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=LDHA PE=2 SV=2	BOVIN	4
108	8.02	5.30500002	sp Q28106 CNTN1_BOVIN	Contactin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CNTN1 PE=2 SV=1	BOVIN	4
109	8.02	6.14099987	sp Q32PF2 ACLY_BOVIN	ATP-citrate synthase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACLY PE=2 SV=1	BOVIN	4
110	8	26.7800003	sp P18902 RET4_BOVIN	Retinol-binding protein 4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=RBP4 PE=1 SV=1	BOVIN	4
111	8	26.6000003	sp Q27967 SPP24_BOVIN	Secreted phosphoprotein 24 OS=Bos taurus OX=9913 GN=SPP2 PE=1 SV=2	BOVIN	4
112	7.86	6.29400015	sp Q3SYU2 EF2_BOVIN	Elongation factor 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=EEF2 PE=2 SV=3	BOVIN	5
113	7.77	14.0300006	sp A6H768 GALK1_BOVIN	Galactokinase OS=Bos taurus OX=9913 GN=GALK1 PE=2 SV=2	BOVIN	4
114	7.6	16.99	sp P14568 ASSY_BOVIN	Argininosuccinate synthase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ASS1 PE=2 SV=1	BOVIN	4
115	7.34	16.7099997	sp Q76LV1 HSP90B_BOVIN	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSP90AB1 PE=2 SV=3	BOVIN	10
116	7.29	21.0800007	sp O18879 GSTA2_BOVIN	Glutathione S-transferase A2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GSTA2 PE=2 SV=4	BOVIN	5
117	7.09	15.9500003	sp Q3ZBN5 ASP_N_BOVIN	Asporin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ASP_N PE=2 SV=1	BOVIN	4
118	6.84	9.92899984	sp Q2KIG3 CBPB2_BOVIN	Carboxypeptidase B2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CPB2 PE=1 SV=1	BOVIN	4
119	6.75	18.6100006	sp P68103 EF1A1_BOVIN	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	BOVIN	5
120	6.6	9.07600001	sp Q2KJH4 WDR1_BOVIN	WD repeat-containing protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=WDR1 PE=2 SV=3	BOVIN	4
121	6.58	11.27	sp P55906 BGH3_BOVIN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=TGFBI PE=1 SV=2	BOVIN	5
122	6.46	21.3	sp Q3T054 RAN_BOVIN	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Bos taurus OX=9913 GN=RAN PE=2 SV=3	BOVIN	4
123	6.42	30.3900003	sp O46414 FRIH_BOVIN	Ferritin heavy chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FTH1 PE=2 SV=3	BOVIN	4
124	6.24	23.4799996	sp Q2KIV9 C1QB_BOVIN	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Bos taurus OX=9913 GN=C1QB PE=1 SV=1	BOVIN	5
125	6.16	7.52200037	sp Q3SWY2 ILK_BOVIN	Integrin-linked protein kinase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ILK PE=2 SV=1	BOVIN	3
126	6.05	7.82900006	sp Q08DP0 PGM1_BOVIN	Phosphoglucomutase-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PGM1 PE=2 SV=1	BOVIN	3
127	6.04	5.48299998	sp P80109 PHLD_BOVIN	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D OS=Bos taurus OX=9913 GN=GPLD1 PE=1 SV=1	BOVIN	4
128	6.04	27.1100014	sp Q5E9F7 COF1_BOVIN	Cofilin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CFL1 PE=2 SV=3	BOVIN	3
129	6.02	6.20899983	sp P98140 FA12_BOVIN	Coagulation factor XII OS=Bos taurus OX=9913 GN=F12 PE=1 SV=2	BOVIN	3

130	6.02	2.49300003	sp P02465 CO1A2_BOVIN	Collagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=COL1A2 PE=1 SV=2	BOVIN	3
131	6	8.09699968	sp Q2KJH9 AL9A1_BOVIN	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALDH9A1 PE=2 SV=1	BOVIN	3
132	6	30.0000012	sp P00974 BPT1_BOVIN	Pancreatic trypsin inhibitor OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=2	BOVIN	6
133	6	20.6300005	sp Q32KY0 APOD_BOVIN	Apolipoprotein D OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOD PE=2 SV=1	BOVIN	3
134	6	29.6099991	sp P52556 BLVRB_BOVIN	Flavin reductase (NADPH) OS=Bos taurus OX=9913 GN=BLVRB PE=1 SV=2	BOVIN	3
135	6	41.5699989	sp P28782 S10A8_BOVIN	Protein S100-A8 OS=Bos taurus OX=9913 GN=S100A8 PE=1 SV=2	BOVIN	4
136	5.96	26.1700004	sp P01045 KNG2_BOVIN	Kininogen-2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KNG2 PE=1 SV=1	BOVIN	16
137	5.82	26.2300014	sp Q5E9E3 C1QA_BOVIN	Complement C1q subcomponent subunit A OS=Bos taurus OX=9913 GN=C1QA PE=2 SV=1	BOVIN	4
138	5.82	35.4200006	sp P19035 APOC3_BOVIN	Apolipoprotein C-III OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOC3 PE=1 SV=2	BOVIN	3
139	5.51	15.8299997	sp Q3T0A3 CFAD_BOVIN	Complement factor D OS=Bos taurus OX=9913 GN=CFD PE=2 SV=1	BOVIN	3
140	5.48	2.80200001	sp P02453 CO1A1_BOVIN	Collagen alpha-1(I) chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=COL1A1 PE=1 SV=3	BOVIN	3
141	5.46	16.4700001	sp P62261 1433E_BOVIN	14-3-3 protein epsilon OS=Bos taurus OX=9913 GN=YWHAE PE=2 SV=1	BOVIN	3
142	5.4	16.7699993	sp Q5E9B1 LDHB_BOVIN	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=LDHB PE=2 SV=4	BOVIN	5
143	5.26	13.9799997	sp O77742 OMD_BOVIN	Osteomodulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=OMD PE=1 SV=1	BOVIN	5
144	5.12	26.4899999	sp P60661 MYL6_BOVIN	Myosin light polypeptide 6 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MYL6 PE=2 SV=2	BOVIN	3
145	4.94	8.22900012	sp Q2TBU0 HPT_BOVIN	Haptoglobin OS=Bos taurus OX=9913 GN=HP PE=2 SV=1	BOVIN	4
146	4.9	11.53	sp P42916 CL43_BOVIN	Collectin-43 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CL43 PE=1 SV=2	BOVIN	3
147	4.78	18.5900003	sp Q5E9F5 TAGL2_BOVIN	Transgelin-2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=TAGLN2 PE=2 SV=3	BOVIN	3
148	4.69	56.1800003	sp Q3MHM5 TBB4B_BOVIN	Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=TUBB4B PE=2 SV=1	BOVIN	19
149	4.65	4.72499989	sp Q6URK6 CADH5_BOVIN	Cadherin-5 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CDH5 PE=2 SV=1	BOVIN	3
150	4.54	8.66099969	sp Q07130 UGPA_BOVIN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Bos taurus OX=9913 GN=UGP2 PE=1 SV=2	BOVIN	3
151	4.46	5.36900014	sp P22457 FA7_BOVIN	Coagulation factor VII OS=Bos taurus OX=9913 GN=F7 PE=1 SV=2	BOVIN	2
152	4.41	7.69200027	sp P12378 UGDH_BOVIN	UDP-glucose 6-dehydrogenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=UGDH PE=1 SV=2	BOVIN	3
153	4.34	6.38799965	sp Q5I597 BHMT1_BOVIN	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=BHMT PE=2 SV=1	BOVIN	2
154	4.19	4.53700013	sp A3KMV5 UBA1_BOVIN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=UBA1 PE=2 SV=1	BOVIN	3
155	4.17	11.8100002	sp Q3T0S5 ALDOB_BOVIN	Fructose-bisphosphate aldolase B OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALDOB PE=2 SV=1	BOVIN	3
156	4.11	6.74199983	sp P50397 GDI2_BOVIN	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Bos taurus OX=9913 GN=GDI2 PE=2 SV=3	BOVIN	2

157	4.03	2.02399995	sp Q27991 MYH10_BOVIN	Myosin-10 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MYH10 PE=2 SV=2	BOVIN	3
158	4.02	14.2199993	sp Q5EA01 B4GA1_BOVIN	Beta-1,4-glucuronyltransferase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=B4GAT1 PE=2 SV=2"	BOVIN	3
159	4.01	23.4200001	sp Q28035 GSTA1_BOVIN	Glutathione S-transferase A1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GSTA1 PE=2 SV=3	BOVIN	6
160	4.01	13.47	sp P63103 1433Z_BOVIN	14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus OX=9913 GN=YWHAZ PE=1 SV=1	BOVIN	2
161	4.01	4.16699983	sp P00745 PROC_BOVIN	Vitamin K-dependent protein C (Fragment) OS=Bos taurus OX=9913 GN=PROC PE=1 SV=1	BOVIN	3
162	4.01	7.41700009	sp A6H767 NP1L1_BOVIN	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=NAP1L1 PE=2 SV=1	BOVIN	2
163	4	9.56899971	sp A6QPQ2 SPA38_BOVIN	Serpin A3-8 OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA3-8 PE=2 SV=1	BOVIN	5
164	4	11.8100002	sp Q3SZ62 PGAM1_BOVIN	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PGAM1 PE=2 SV=3	BOVIN	2
165	3.77	19.4199994	sp P62803 H4_BOVIN	Histone H4 OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=2	BOVIN	2
166	3.63	13.5900006	sp P61223 RAP1B_BOVIN	Ras-related protein Rap-1b OS=Bos taurus OX=9913 GN=RAP1B PE=2 SV=1	BOVIN	3
167	3.42	3.74500006	sp Q5E9R3 EHD1_BOVIN	EH domain-containing protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=EHD1 PE=1 SV=1	BOVIN	2
168	3.37	4.60200012	sp Q95M18 ENPL_BOVIN	Endoplasmic OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSP90B1 PE=2 SV=1	BOVIN	3
169	3.35	10.6399998	sp Q3SZJ4 PTGR1_BOVIN	Prostaglandin reductase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PTGR1 PE=2 SV=1	BOVIN	2
170	3.23	12.7000004	sp P16116 ALDR_BOVIN	Aldose reductase OS=Bos taurus OX=9913 GN=AKR1B1 PE=1 SV=1	BOVIN	3
171	3.14	7.69200027	sp Q5EAD2 SERA_BOVIN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=PHGDH PE=2 SV=3	BOVIN	3
172	3.09	8.03200006	sp O02659 MBL2_BOVIN	Mannose-binding protein C OS=Bos taurus OX=9913 GN=MBL PE=2 SV=1	BOVIN	2
173	3.07	7.32700005	sp P38657 PDIA3_BOVIN	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PDIA3 PE=2 SV=1	BOVIN	2
174	2.99	3.40799987	sp Q9TTK6 AOC3_BOVIN	Membrane primary amine oxidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=AOC3 PE=2 SV=3	BOVIN	2
175	2.85	15.2500004	sp P50227 ST1A1_BOVIN	Sulfotransferase 1A1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=SULT1A1 PE=1 SV=2	BOVIN	2
176	2.77	3.44199985	sp P31976 EZRI_BOVIN	Ezrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=EZR PE=1 SV=2	BOVIN	2
177	2.7	3.48500013	sp A5D714 EXT1_BOVIN	Exostosin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=EXT1 PE=2 SV=1	BOVIN	2
178	2.69	21.2599993	sp P80425 FABPL_BOVIN	Fatty acid-binding protein, liver OS=Bos taurus OX=9913 GN=FABP1 PE=1 SV=1"	BOVIN	2
179	2.67	5.58900014	sp P48644 AL1A1_BOVIN	Retinal dehydrogenase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=3	BOVIN	2
180	2.41	11.5500003	sp P13213 SPRC_BOVIN	SPARC OS=Bos taurus OX=9913 GN=SPARC PE=1 SV=2	BOVIN	2
181	2.34	14.9700001	sp P13696 PEBP1_BOVIN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PEBP1 PE=1 SV=2	BOVIN	2
182	2.27	7.57599995	sp P00744 PROZ_BOVIN	Vitamin K-dependent protein Z OS=Bos taurus OX=9913 GN=PROZ PE=1 SV=1	BOVIN	2
183	2.27	12.9500002	sp O77834 PRDX6_BOVIN	Peroxiredoxin-6 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PRDX6 PE=1 SV=3	BOVIN	2

184	2.22	9.46699977	sp Q3SZB7 F16P1_BOVIN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=FBP1 PE=2 SV=3"	BOVIN	2
185	2.09	5.88200018	sp A7MBI7 COMT_BOVIN	Catechol O-methyltransferase OS=Bos taurus OX=9913 GN=COMT PE=2 SV=1	BOVIN	1
186	2.08	3.05100009	sp P19217 ST1E1_BOVIN	Estrogen sulfotransferase OS=Bos taurus OX=9913 GN=SULT1E1 PE=1 SV=1	BOVIN	1
187	2.08	0.75610001	sp Q71SP7 FAS_BOVIN	Fatty acid synthase OS=Bos taurus OX=9913 GN=FASN PE=2 SV=1	BOVIN	1
188	2.04	2.65699998	sp Q9XSG3 IDHC_BOVIN	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Bos taurus OX=9913 GN=IDH1 PE=2 SV=1	BOVIN	1
189	2.03	1.95499994	sp Q32LP0 URP2_BOVIN	Fermitin family homolog 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=FERMT3 PE=2 SV=1	BOVIN	1
190	2.02	2.33600009	sp A6QLR4 FLOT2_BOVIN	Flotillin-2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=FLOT2 PE=2 SV=1	BOVIN	1
191	2.01	3.69599983	sp Q0P5F9 AL8A1_BOVIN	2-aminomuconic semialdehyde dehydrogenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALDH8A1 PE=2 SV=1	BOVIN	1
192	2.01	2.24300008	sp Q148H7 K2C79_BOVIN	Keratin, type II cytoskeletal 79 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KRT79 PE=2 SV=1"	BOVIN	1
193	2.01	23.7599999	sp P19034 APOC2_BOVIN	Apolipoprotein C-II OS=Bos taurus OX=9913 GN=APOC2 PE=1 SV=2	BOVIN	1
194	2.01	2.62499992	sp Q5EA61 KCRB_BOVIN	Creatine kinase B-type OS=Bos taurus OX=9913 GN=CKB PE=1 SV=1	BOVIN	1
195	2.01	7.22199976	sp Q56JW4 APT_BOVIN	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Bos taurus OX=9913 GN=APRT PE=2 SV=1	BOVIN	1
196	2.01	1.38299996	sp Q3ZBV8 SYTC_BOVIN	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Bos taurus OX=9913 GN=TARS PE=2 SV=1"	BOVIN	1
197	2.01	2.87800003	sp P52193 CALR_BOVIN	Calreticulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=CALR PE=1 SV=2	BOVIN	1
198	2.01	11.5000002	sp P30932 CD9_BOVIN	CD9 antigen OS=Bos taurus OX=9913 GN=CD9 PE=2 SV=2	BOVIN	1
199	2	9.9059999	sp P34933 HSP72_BOVIN	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSPA2 PE=2 SV=2	BOVIN	6
200	2	30.0000012	sp P04815 BPT2_BOVIN	Spleen trypsin inhibitor 1 OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=2	BOVIN	4
201	2	0.96690003	sp A6QNM8 SYTC2_BOVIN	Threonine--tRNA ligase 2, cytoplasmic OS=Bos taurus OX=9913 GN=TARSL2 PE=2 SV=1"	BOVIN	1
202	2	12.0399997	sp Q2KIT0 HP20_BOVIN	Protein HP-20 homolog OS=Bos taurus OX=9913 PE=2 SV=1	BOVIN	1
203	2	1.09799998	sp A5D7D1 ACTN4_BOVIN	Alpha-actinin-4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACTN4 PE=2 SV=1	BOVIN	1
204	2	12.8399998	sp Q762I5 RETN_BOVIN	Resistin OS=Bos taurus OX=9913 GN=RETN PE=3 SV=1	BOVIN	1
205	2	1.24700004	sp Q6R8F2 CADH1_BOVIN	Cadherin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CDH1 PE=2 SV=1	BOVIN	1
206	2	7.46899992	sp Q5E9B7 CLIC1_BOVIN	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CLIC1 PE=2 SV=3	BOVIN	1
207	2	7.55800009	sp Q5E984 TCTP_BOVIN	Translationally-controlled tumor protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=TPT1 PE=2 SV=1	BOVIN	1
208	2	2.55100001	sp Q58CP0 IDH3G_BOVIN	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=IDH3G PE=2 SV=1"	BOVIN	1
209	2	2.37600002	sp Q3ZCJ8 CATC_BOVIN	Dipeptidyl peptidase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CTSC PE=2 SV=1	BOVIN	1

210	2	9.74600017	sp Q3ZCD0 CD81_BOVIN	CD81 antigen OS=Bos taurus OX=9913 GN=CD81 PE=2 SV=1	BOVIN	1
211	2	3.13399993	sp Q32L99 PTGR2_BOVIN	Prostaglandin reductase 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PTGR2 PE=2 SV=1	BOVIN	1
212	2	2.11900007	sp Q2KJ32 SBP1_BOVIN	Methanethiol oxidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=SELENBP1 PE=1 SV=1	BOVIN	1
213	2	6.97700009	sp Q2KIU3 HP252_BOVIN	Protein HP-25 homolog 2 OS=Bos taurus OX=9913 PE=2 SV=1	BOVIN	1
214	2	2.43900008	sp Q2KIH7 PH4H_BOVIN	Phenylalanine-4-hydroxylase OS=Bos taurus OX=9913 GN=PAH PE=2 SV=1	BOVIN	1
215	2	2.74	sp Q2KIH4 RRS1_BOVIN	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog OS=Bos taurus OX=9913 GN=RRS1 PE=2 SV=1	BOVIN	1
216	2	2.84400005	sp Q29RZ0 THIL_BOVIN	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACAT1 PE=2 SV=1"	BOVIN	1
217	2	3.46800014	sp P46193 ANXA1_BOVIN	Annexin A1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ANXA1 PE=1 SV=2	BOVIN	1
218	2	2.85700001	sp P26779 SAP_BOVIN	Prosaposin OS=Bos taurus OX=9913 GN=PSAP PE=1 SV=3	BOVIN	1
219	2	3.84600013	sp P13753 HA1B_BOVIN	BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7 OS=Bos taurus OX=9913 PE=2 SV=1"	BOVIN	1
220	2	13.5100007	sp P12082 CO5_BOVIN	Complement C5a anaphylatoxin OS=Bos taurus OX=9913 GN=C5 PE=1 SV=1	BOVIN	1
221	2	12.8399998	sp P01035 CYTC_BOVIN	Cystatin-C OS=Bos taurus OX=9913 GN=CST3 PE=1 SV=2	BOVIN	2
222	2	8.29299986	sp P00435 GPX1_BOVIN	Glutathione peroxidase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GPX1 PE=1 SV=3	BOVIN	1
223	1.93	3.87800001	sp A3KN12 PUR8_BOVIN	Adenylosuccinate lyase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ADSL PE=2 SV=1	BOVIN	1
224	1.89	7.79799968	sp Q9N0V4 GSTM1_BOVIN	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GSTM1 PE=1 SV=3	BOVIN	1
225	1.89	1.38699999	sp P80012 VWF_BOVIN	von Willebrand factor (Fragment) OS=Bos taurus OX=9913 GN=VWF PE=1 SV=2	BOVIN	1
226	1.88	6.46699965	sp Q58CX7 DIK2B_BOVIN	Divergent protein kinase domain 2B OS=Bos taurus OX=9913 GN=DIPK2B PE=2 SV=1	BOVIN	2
227	1.74	1.10099996	sp Q29451 MA2B1_BOVIN	Lysosomal alpha-mannosidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=MAN2B1 PE=1 SV=4	BOVIN	1
228	1.67	3.94699983	sp P05689 CATZ_BOVIN	Cathepsin Z OS=Bos taurus OX=9913 GN=CTSZ PE=2 SV=2	BOVIN	1
229	1.64	12.5	sp P63048 RL40_BOVIN	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Bos taurus OX=9913 GN=UBA52 PE=1 SV=2	BOVIN	1
230	1.58	5.20800017	sp Q9TU25 RAC2_BOVIN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=RAC2 PE=2 SV=1	BOVIN	1
231	1.54	5.528	sp Q9BGI3 PRDX2_BOVIN	Peroxiredoxin-2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PRDX2 PE=2 SV=1	BOVIN	1
232	1.54	4.33200002	sp Q3SZD7 CBR1_BOVIN	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CBR1 PE=2 SV=1	BOVIN	1
233	1.47	3.41599993	sp P00432 CATA_BOVIN	Catalase OS=Bos taurus OX=9913 GN=CAT PE=1 SV=3	BOVIN	1
234	1.43	1.71099994	sp P06394 K1C10_BOVIN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KRT10 PE=3 SV=1"	BOVIN	1

16. Anexo III: Trabajos generados

- **Artículo en revista indexada:**

- Laura Enequina Soto-Serna, Mariana Diupotex, Jaime Zamora-Chimal, Adriana Ruiz-Remigio, José Delgado-Domínguez, Rocely Buenaventura Cervantes-Sarabia, Adriana Méndez-Bernal, Alma Reyna Escalona-Montaño, María Magdalena Aguirre-García, Ingeborg Becker, "***Leishmania mexicana*: Novel Insights of Immune Modulation through Amastigote Exosomes**", Journal of Immunology Research, 2020, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/8894549>.

- **2 capítulos de libro relacionados:**

- Cañeda-Guzman Isabel Cristina, Zamora-Chimal Jaime, Fernández-Figueroa Edith A, Soto-Serna Laura E, Coria-Paredes Diego M, Becker Ingeborg. "**Leishmaniasis**". Así es la Medicina, Ecología medica, parasitología, 2018;22 p.
- Fernández-Figueroa Edith A, Zamora-Chimal Jaime, Cañeda-Guzman Isabel Cristina, Soto-Serna Laura E, Coria-Paredes Diego M, Becker Ingeborg. "**Respuesta inmune a parásitos protozoarios intestinales**", Así es la Medicina, Inmunología, 2018;16 p.

Research Article

Leishmania mexicana: Novel Insights of Immune Modulation through Amastigote Exosomes

Laura Enedina Soto-Serna ¹, Mariana Diupotex ¹, Jaime Zamora-Chimal ¹,
Adriana Ruiz-Remigio ¹, José Delgado-Domínguez ¹,
Rocely Buenaventura Cervantes-Sarabia ¹, Adriana Méndez-Bernal ²,
Alma Reyna Escalona-Montaño ³, María Magdalena Aguirre-García ³,
and Ingeborg Becker ¹

¹Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, CP 06726 Ciudad de México, Mexico

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Patología y Microscopía electrónica, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, CP 04510 Ciudad de México, Mexico

³Facultad de Medicina, División de Investigación, Unidad de Investigación UNAM-INC (Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez), Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, 14080 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Ingeborg Becker; becker@unam.mx

Academic Editor: Paulina Niedźwiedzka-Rystwej

Copyright © 2020 Laura Enedina Soto-Serna et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Exosomes are extracellular microvesicles of endosomal origin (multivesicular bodies, MVBs) constitutively released by eukaryotic cells by fusion of MVBs to the plasma membrane. The exosomes from *Leishmania* parasites contain an array of parasite molecules such as virulence factors and survival messengers, capable of modulating the host immune response and thereby favoring the infection of the host. We here show that exosomes of *L. mexicana* amastigotes (aExo) contain the virulence proteins gp63 and PP2C. The incubation of aExo with bone marrow-derived macrophages (BMMs) infected with *L. mexicana* led to their internalization and were found to colocalize with the cellular tetraspanin CD63. Furthermore, aExo inhibited nitric oxide production of infected BMMs, permitting enhanced intracellular parasite survival. Expressions of antigen-presenting (major histocompatibility complex class I, MHC-I, and CD1d) and costimulatory (CD86 and PD-L1) molecules were modulated in a dose-dependent fashion. Whereas MHC-I, CD86 and PD-L1 expressions were diminished by exosomes, CD1d was enhanced. We conclude that aExo of *L. mexicana* are capable of decreasing microbicidal mechanisms of infected macrophages by inhibiting nitric oxide production, thereby enabling parasite survival. They also hamper the cellular immune response by diminishing MHC-I and CD86 on an important antigen-presenting cell, which potentially interferes with CD8 T cell activation. The enhanced CD1d expression in combination with reduction of PD-L1 on BMMs point to a potential shift of the activation route towards lipid presentations, yet the effectivity of this immune activation is not evident, since in the absence of costimulatory molecules, cellular energy and tolerance would be expected.

1. Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by different species of the genus *Leishmania*, an intracellular parasite that infects the mammalian host after being transmitted by the sand fly vector (*Phlebotomus* spp. and *Lutzomyia* spp.) dur-

ing its bloodmeal [1]. *Leishmania* promastigotes are phagocytosed by antigen-presenting cells (APCs), such as macrophages and dendritic cells, where they differentiate into amastigotes and begin their replication [2]. Macrophages play multiple functions during the infection, including parasite elimination, antigen-presentation for T cell

activation, and cytokine production [3]. These coordinated response mechanisms are necessary to limit disease progression [3]. The parasite has developed diverse evasion strategies for its survival within the mammalian host, including inhibition of the respiratory burst, thereby lowering the toxic reactive oxygen intermediates (ROI) and reducing nitric oxide (NO) production, both of which are important leishmanicidal mechanisms [3, 4]. NO production is regulated by the inducible nitric-oxide synthase (iNOS) through activation of inducible nuclear factors, including nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cell (NF- κ B) [5]. Parasite evasion mechanisms are mediated by virulence factors as a glycoprotein of 63 kDa (gp63) and the elongation factor 1- α (EF-1 α), which activates SHP-1 (PTP) in macrophages, thus avoiding signaling through STAT-1 and inhibiting transcription factors such as NF- κ B and AP-1 [6–9]. Furthermore, the protein phosphatase 2C (PP2C), found in the secretome of various *Leishmania* species, regulates proinflammatory cytokine production in macrophages [10]. This protein has been implicated in pathogenic mechanisms favoring infectivity of various parasites such as *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* [11, 12].

Recently, exosomes secreted by either *Leishmania* or infected macrophages have been proposed as one of parasite evasion strategies within host cells, since they are able to modulate effector mechanisms and the expression of surface molecules involved in antigen presentation and costimulation [13, 14]. Exosomes are extracellular nanovesicles measuring 30–150 nm [15–17]. They are formed within multivesicular bodies (MVBs) and contain varied amounts of nucleic acids, proteins and lipids, which are released to extracellular spaces by almost all cells, serving as intercellular communication systems of eukaryotes and prokaryotes [16–18]. Exosomes regulate central biological processes, such as immune responses, and are found in diverse body fluids such as urine, saliva, blood and serum through which they can be distributed throughout the body [16].

In leishmaniasis, parasite-derived exosomes have been shown to contain the glycoprotein gp63 (a *Leishmania* zinc-metalloprotease abundantly expressed on the parasite surface), which can influence host signaling mechanisms [19, 20]. Parasite exosomes have also been shown to contain heat-shock proteins (HSP) 70 and 100 which aid parasite progression in the mammalian host [19]. Another protein recently described in *L. major* exosomes is the phosphatase LmPRL, which favors parasite growth and differentiation within macrophages, and exosomes of *L. infantum* interfere with activation of APCs by lowering their costimulatory molecules CD86 and CD40 [21, 22]. Yet exosomes of *L. mexicana* parasites that are capable of producing severe progressive cutaneous diseases remain to be explored. Therefore, in the current study, we analyzed the immunomodulatory effect exerted by exosomes of *L. mexicana* amastigotes on infected bone marrow-derived macrophages (BMMs).

2. Material and Methods

2.1. Animals. BALB/c mice were bred and housed at the animal facilities at the Unit of Experimental Medicine Research

of the Medical School-UNAM, 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-UNAM.

2.2. Parasite Culture. *Leishmania mexicana* (MHOM/MX/2011/Lacandona) amastigotes were aspirated from footpad lesions of infected BALB/c mice and cultured at 33°C in Grace's insect medium, pH 5.5 (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA), supplemented with 20% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Riverside MO, USA), 2 mM L-glutamine, 0.35 g/L sodium bicarbonate, and 1% Pen/Strep (100 IU/mL–100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to procedures previously described with some modifications [23].

2.3. Depletion of FBS-Derived Exosomes. Exosomes naturally present in FBS were depleted as previously described with some modifications [24]. Briefly, the serum was serially centrifuged at 300 x *g*/10 min, 1000 x *g*/20 min, and 3000 x *g*/30 min. Thereafter, it was filtered with a 0.22 μ m filter unit (Millex GV, Merck Millipore, Bedford, MA, USA) and ultracentrifuged at 100,000 x *g* during 90 min. The elimination of microvesicles was evidenced by flow cytometry (FACS Aria BD, San Jose, CA, USA), using reference beads measuring 0.1–2 μ m (Size reference kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Supplementary 1).

2.4. Growth Kinetics of *L. mexicana* Amastigotes. *L. mexicana* amastigotes were cultured for 10 days in modified complete Grace's insect medium supplemented with either 20% normal FBS or 20% exosome-free FBS (FBS/-exo). Amastigote cultures were initiated at 2×10^6 parasites/mL from stock cultures in their exponential growth phase. For counting, the parasites were passed through 27 G syringe needles three to five times to disrupt aggregates of amastigotes and were fixed in 2% glutaraldehyde for daily count in a Neubauer chamber. Amastigote viability was verified with 0.2% erythrosin B (Sigma-Aldrich).

2.5. Isolation of *L. mexicana* Amastigote Exosomes (aExo). *L. mexicana* exosomes were isolated from supernatants of amastigotes grown in axenic cultures in Grace's modified medium containing 20% FBS/-exo until reaching their stationary phase (7 days). Exosomes were enriched by differential centrifugation according to the protocol previously described [25]; thereafter, they were isolated with an ExoEasy Maxi kit (Qiagen, Hilden, Germany). Briefly, the parasites were centrifuged at 3,202 x *g* for 30 min, and the collected supernatant was filtered through a 0.22 μ m filter unit (Filter systems, Corning, Tewksbury, MA, USA). The supernatant was transferred to 26.3 mL polycarbonate tubes (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and ultracentrifuged at 100,000 x *g* for 1 h at 4°C. The pellet was suspended in 200 μ l phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) (Dulbecco, Caisson, CA, USA), and aExo were isolated with an ExoEasy Maxi kit, according to the manufacturer's instructions. Isolated exosomes were stored at -70°C until use.

2.6. Transmission Electron Microscopy (TEM). For TEM visualization, aExo were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer and mounted in formvar coated carbon-nickel grids. Uranyl acetate (2%) was used as a negative stain reagent. Samples were analyzed in a transmission electron microscope (JEOL 1010, Tokyo, Japan).

2.7. Protein Extraction. Isolated exosomes and stationary phase amastigotes were lysed in RIPA buffer (10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40) in a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) and sonicated three times (0.5 s pulses/32% amplitude) at 22°C (SONICS-Vibra cell, Newtown, CT, USA). Proteins were quantified using an EZQ fluorescence kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA), according to the manufacturer's instructions. Protein integrity was verified by silver staining (Biorad, Hercules, CA, USA).

2.8. SDS-PAGE and Western Blot. Protein profiles of gp63, HSP70, PP2C, CD63, and CD9 from amastigotes or exosomal lysates (5 µg) were analyzed by 10% SDS-PAGE in Tris-glycine-SDS (25 mM Tris, 0.1% SDS). For immunoblotting, proteins were transferred onto immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Thereafter, membranes were washed and blocked with 5% nonfat milk (Biorad) in TBS-T 1x (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20) for 1 h. As positive controls, gp63 (purified from *L. mexicana*), HSP70 (a protein lysate of cell-line 563), PP2C (recombinant PP2C of *L. major*), CD63 (protein lysate of the THP-1 cell line), and CD9 (protein lysate of ovarian cell line) were used (1 µg of each protein). The blots were incubated in TBS-T/milk overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibodies: anti-gp63 and anti-PP2C (both generated in our laboratory against native gp63 from *L. mexicana* promastigotes and recombinant *L. major* PP2C), both diluted 1:1000; mouse monoclonal antibodies: anti-HSP70 (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD63, and anti-CD9 (Abcam, Cambridge, MA, USA) (all at 1:5000 dilution). Thereafter, the membranes were washed with TBS-T for 1 h and incubated with secondary antibodies HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or HRP-conjugated goat anti-mouse IgG, respectively, at a 1:5000 dilution (Biomedex, Foster City, CA, USA) in TBS-T 1X with 1% nonfat milk. Finally, the membranes were washed ten times in TBS-T, and the bands were visualized by chemiluminescence substrate (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.9. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMMs). BMMs were differentiated from bone marrow stem cells obtained from the femurs and tibias of BALB/c mice. Briefly, long bones of BALB/c mice were aseptically removed, and cells were flushed out with ice-cold PBS. The cells (2×10^6) were transferred in Petri dishes (Falcon, Corning, New York, NY, USA) in RPMI-1640 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% FBS and 20% L929 fibroblast culture supernatants, as a source of macrophage-stimulating factor (M-SCF) [26]. They were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 7 days. Adherent BMMs were collected, and purity was ana-

lyzed by flow cytometry (FACS Canto II, BD, Becton Dickinson, San José, CA, USA). Staining with mouse monoclonal antibody (mAb) anti-F4/80 (FITC) (Biolegend) showed that 98% of the cells were macrophages.

2.10. Confocal Microscopy. To visualize the internalization of parasite exosomes by BMMs, green fluorescent exosomes were obtained from *L. mexicana* parasites transfected with superfolder variant of the green fluorescent protein (sfGFP) according to the previously reported method [27]. Exosomes of *L. mexicana*^{sfGFP} were isolated from amastigotes and promastigotes and comparatively analyzed for their intracellular green fluorescence intensity. For confocal microscopy, exosomes of *L. mexicana*^{sfGFP} promastigotes were used, since these showed a stronger intracellular fluorescent signal (data not shown). BMMs (2.5×10^5) were incubated with exosomes (10 µg/mL) in 24-well culture tissue plates containing glass coverslips in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS/-exo for 2 or 6 h at 37°C and 5% CO₂. As control, nonstimulated cells were used. BMMs attached to coverslips were washed with PBS and intracellular staining was done with mouse anti-CD63 (PE) (Biolegend). Briefly, BMMs were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 20 min at 4°C and washed with 1x Perm/Wash buffer (Biolegend). Staining was done with anti-CD63 diluted 1:100 in permeabilization solution for 30 min at 4°C. Thereafter, cells were washed again with 1x Perm/Wash and nuclei were counterstained with DAPI in fluoroshield mounting medium (Sigma-Aldrich). Stimulated BMMs were visualized by confocal microscopy (Leica, TCS SP5, Leica Microsystems, USA), using the software LAS X v. 3 to image analysis.

2.11. Infection of BMMs (iBMMs). BMMs (3×10^5) were plated in 96-well tissue culture plates (Falcon-Corning) in complete RPMI-1640 medium supplemented with 10% of FBS/-exo and centrifuged at 300 x *g* for 5 min to allowed adherence. Cells were incubated with *L. mexicana* amastigotes at 1:5 (cell/amastigotes) ratio, and to synchronize the infection, the plates were centrifuged at 2,450 x *g* for 5 min. Then, the plates were incubated for 2 h at 33°C, an ideal condition for infection of BMMs by amastigotes [28], and thereafter, they were cultured at 37°C with 5% CO₂ (to optimize culture conditions for BMMs) for 24 h.

2.12. Nitric Oxide (NO) Production. NO production by iBMMs stimulated with aExo was determined by measuring the accumulated levels of nitrites in the cell culture media [29]. Briefly, iBMMs were stimulated with LPS (100 ng/mL) and different concentrations of aExo in suspension (2.5, 5, 10, 25 and 50 µg/mL) for 24 h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS/-exo at 37°C with 5% CO₂. As controls, nonstimulated iBMMs and iBMMs stimulated only with LPS (100 ng/mL) were used. The supernatants were collected, and nitrite levels were quantified by Griess reaction (Sigma-Aldrich) at room temperature for 10 min, using sodium nitrite as standard curve (0-100 µM). Absorbance was measured in a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 540 nm.

2.13. Survival Assay of Intracellular Amastigotes. To analyze intracellular survival of amastigotes within BMMs in the presence of exosomes, iBMMs were stimulated with aExo in suspension (2.5, 5, 10, 25, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) during 24 h in RPMI-1640, supplemented with 10% FBS/-exo at 37°C in 5% CO_2 . As controls, nonstimulated iBMMs and iBMMs stimulated with LPS (100 ng/mL), both in the absence of exosomes, were used. After 24 h, stimulated iBMMs were washed with PBS and further incubated in complete RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS/-exo at 26°C for 72 h, leading to the gradual release of viable amastigotes, which transformed into promastigotes. Differentiated promastigotes were fixed in 2% glutaraldehyde and counted in a Neubauer chamber.

2.14. Flow Cytometry. The analysis of antigen presentation and costimulation molecules of infected and stimulated BMMs was analyzed by flow cytometry. BMMs were infected and stimulated, as described above. To detach adherent cells after stimulation, ice-cold PBS was added to each well and iBMMs were released by mechanical pressure. Cells were incubated with anti-CD16/CD32 (Biolegend) for 20 min at 4°C to prevent nonspecific binding. The antigen-presenting molecules were analyzed by staining the cells with mouse mAbs (Biolegend) anti-MHC-I (PE), anti-MHC-II (APC-Cy7), and anti-CD1d (FITC). Costimulatory and coinhibitory molecules were stained with mouse anti-CD86 (PerCP-Cy5.5) and anti-PD-L1 (PE-Cy7), respectively. All the antibodies were diluted 1:100 and incubated for 30 min in the dark at 4°C. Cells were then washed with PBS, fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and resuspended in PBS for FACS analysis. Events were recorded for individual samples using a FACSCanto II Flow cytometer. Data were analyzed by the FlowJo v.10 software (Treestar, Ashland, OR, USA).

2.15. Statistical Analysis. The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v.6 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Differences between groups were determined by nonparametric Mann-Whitney U tests. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. FBS-Derived Exosomes Are Not Required for *L. mexicana* Amastigote Growth. To determine if FBS-derived exosomes are required for parasite growth, kinetic growth curves of *L. mexicana* amastigotes were assessed in Grace's insect medium supplemented with either normal FBS or FBS/-exo. Growth curves showed that amastigotes grew equally well in medium supplemented with FBS/-exo, as compared to normal FBS. A logarithmic growth was observed between days 1 and 6, reaching the stationary phase at day 6 until day 8, after which the parasite culture declined (Figure 1). These results show that exosomes naturally present in FBS are not required for amastigote growth.

3.2. Exosomes Secreted by *L. mexicana* Amastigotes Contain gp63 and PP2C. To ascertain whether vesicles isolated from the *L. mexicana* amastigote cultures were exosomes, their size

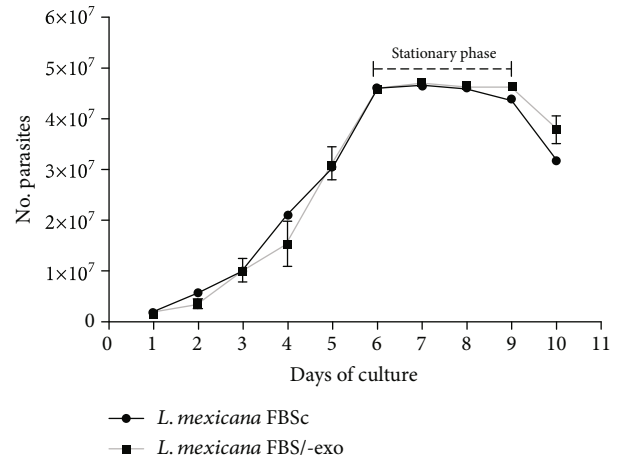


FIGURE 1: Exosomes derived from FBS are not required for growth of *L. mexicana* amastigotes. Parasite growth was analyzed in RPMI-1640 medium supplemented with normal FBS (control) or FBS/-exo for ten days. Data represent the mean of parasite number \pm SD ($n = 3$).

and the expression of mammalian exosome markers (CD63 and CD9), as well as the expression of virulence factors (gp63 and PP2C), were evaluated. TEM revealed that the diameter of the isolated vesicles ranged between 80 and 150 nm (Figure 2(a)), demonstrating that isolated vesicles were within the size range of exosomes. The electrophoretic (SDS-PAGE) protein analysis done with 10% silver staining revealed that protein profile in lysates of *L. mexicana* amastigotes differed from the profile of their purified exosomes (Figure 2(b)). Furthermore, Western blotting showed that exosomes isolated from supernatants of *L. mexicana* amastigote cultures did not express the mammalian exosome markers CD63 and CD9 (63 kDa and 25 kDa, respectively) nor HSP70 (70 kDa), although they did express the parasite virulence factors gp63 and PP2C (63 kDa and 70 kDa, respectively). This differed from amastigote lysates, which also showed gp63 and PP2C (45 kDa) expression, in addition to the mammalian exosome marker CD9 (25 kDa) (Figure 2(c)). Taken together, these observations confirm that the microvesicles isolated from *L. mexicana* amastigote cultures were exosomes, since their size was below 150 nm (exosome micrographs are shown in Supplementary 2) and they expressed parasite virulence factors such as gp63 and PP2C, capable of interfering with the host immune response.

3.3. Exosomes of *L. mexicana* Are Internalized by BMMs and Colocalize with CD63. To demonstrate that exosomes of *L. mexicana* are taken up by macrophages, exosomes were purified from *L. mexicana* parasites transfected with sfGFP (Supplementary 3). BMMs were coincubated with green fluorescent exosomes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 or 6 h and analyzed by confocal microscopy. Microphotographs revealed that nonstimulated BMMs did not exhibit green fluorescence in their cytoplasm, although these cells showed the tetraspanin marker CD63 on their cellular membrane (Figure 3(a)). After 2 h of incubation, green exosomes begin to be evidenced in the cytoplasm of BMMs (Figure 3(b)), and after 6 h, exosome

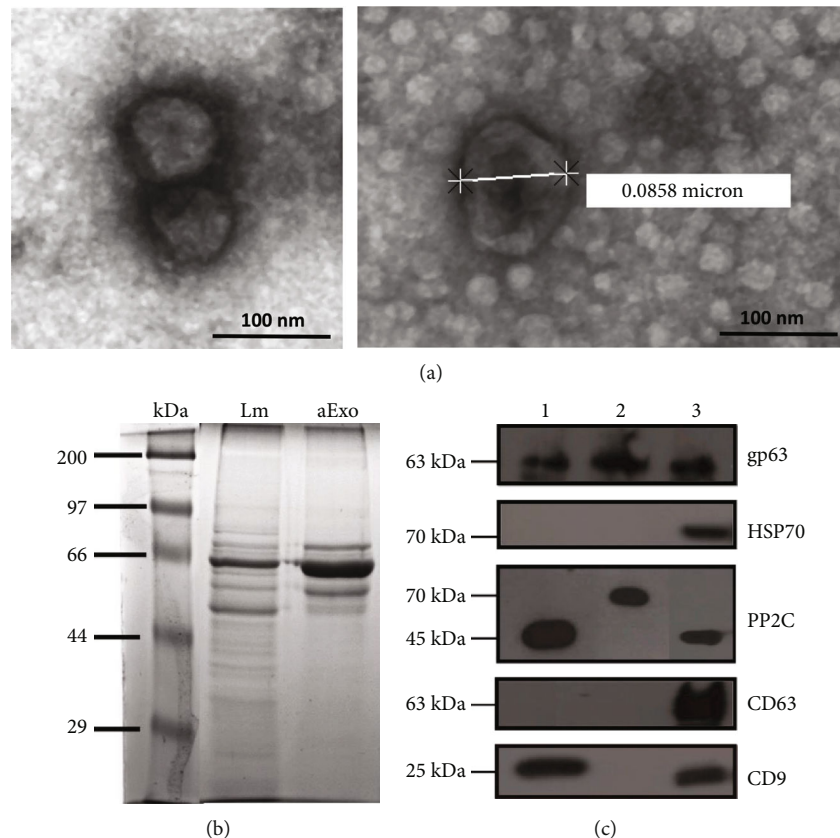


FIGURE 2: Exosomes released by *L. mexicana* amastigotes contain gp63 and PP2C. Isolated exosomes from supernatants of *L. mexicana* amastigote cultures were visualized by TEM and their protein profile was analyzed. (a) Representative TEM micrographs of aExo with negative staining. Left image shows exosomes contained within membranes (120,000x magnification). Right image exhibits aExo with a diameter of ~85 nm (160,000x magnification). (b) Protein profile of *L. mexicana* amastigotes lysate (Lm) and of their exosomes (aExo) in 10% SDS-PAGE with silver stain. (c) Immunodetection of gp63, HSP70, PP2C, CD63, and CD9 in lysates of *L. mexicana* amastigotes and their secreted exosomes. Lane 1: amastigote lysates; Lane 2: exosome lysates; Lane 3: positive controls. The images are representative of two 2 independent experiments.

internalization increased and some exosomes were found in the perinuclear region, forming aggregates that colocalized with the tetraspanin CD63 marker, possibly in late endosomes (Figure 3(c)). This was not evidenced after 2 h of incubation. These observations demonstrate that *L. mexicana* exosomes were efficiently internalized into macrophages.

3.4. aExo from *L. mexicana* Decrease NO Production and Enhance Parasite Survival within iBMMs. Given that the *L. mexicana* aExo contain virulence factors, such as gp63 and PP2C that may impair macrophage microbicidal mechanisms, NO production was evaluated in culture supernatants of iBMMs stimulated with LPS (100 ng/mL) and aExo during 24 h. Nonstimulated iBMMs (control) showed no production of nitrates, whereas iBMMs stimulated only with LPS exhibited high levels of nitrite production (40.6 ± 11.5). iBMMs stimulated concomitantly with LPS and aExo showed that exosomes exerted a reduction in nitrite production, which correlated with the concentration of exosomes in a dose-dependent manner. Thus, the most elevated concentration of aExo (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) elicited the most pronounced decrease of nitrite levels (21.4 ± 9.2), as compared with the LPS positive control (Figure 4(a)). To determine whether decreasing

levels of NO production induced by aExo stimulation impaired the killing capacity of macrophages, parasite intracellular survival was assessed after 24 h of aExo stimulation. iBMMs stimulated only with LPS (100 ng/mL) showed significantly reduced parasite survival (2.1×10^5), as compared to nonstimulated iBMMs (3.9×10^5). Yet, after incubation with exosomes, an enhanced parasite survival was observed in a dose-dependent fashion, surpassing the number of parasites that survived in the control. Thus, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aExo led to a significant increase (6.6×10^5) of viable parasite release of iBMMs (Figure 4(b)). Taken together, these data provide evidence that aExo of *L. mexicana* downregulate macrophage microbicidal activity exerted by NO production, leading to an increase of intracellular parasite survival.

3.5. *L. mexicana* aExo Modulate MHC-I and CD1d Expression on iBMMs. To evaluate whether aExo of *L. mexicana* modulate the expression of antigen-presenting molecules, expression of MHC and CD1d were analyzed on iBMMs stimulated with exosomes for 24 h. A progressive decrease on the expression of MHC-I was observed, which became significant at exosome concentrations above 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, where a 22.6% reduction of MHC-I expression

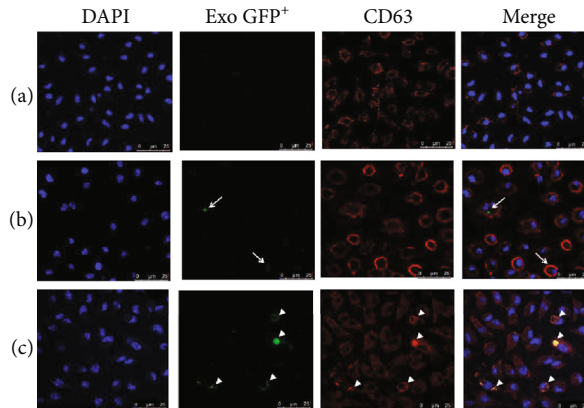


FIGURE 3: *L. mexicana* exosomes internalized by BMMs colocalize with CD63. Confocal microscopy of BMMs incubated with green fluorescent exosomes for 2 or 6 h. (a) Nonstimulated BMMs. (b) BMMs after 2 h of incubation with exosomes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Arrows show green exosomes localized in the cytoplasm of BMMs, and CD63 marker is evidenced on the cell membrane. (c) BMMs incubated for 6 h with exosomes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Merged image shows yellow staining (arrowheads) as a result of colocalization of CD63 marker and *L. mexicana* exosomes. DAPI stain shows nuclei in blue, tetraspanin CD63 is stained in red, and exosomes show green staining. The images are representative of two 2 independent experiments.

was evidenced, as compared to nonstimulated iBMMs (20,742 \pm 3,384 for control vs. 16,048 \pm 1,668 for aExo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 5(a)). No modification was observed on MHC-II expression after aExo stimulus for 24 h (Figure 5(b)). In contrast, CD1d expression increased 18.2% after incubation with aExo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the highest concentration tested (1,681 \pm 10.6 for control vs. 1,987 \pm 124.2 for aExo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 5(c)). The positive control of iBMMs stimulated with LPS (in the absence of exosomes) showed enhanced expression of all antigen-presenting molecules, as compared to nonstimulated iBMMs ($p < 0.05$). These data suggest that aExo modulated antigen-presenting molecules on infected macrophages.

3.6. *L. mexicana* aExo Downregulate Costimulatory Molecules on iBMMs. Considering that aExo from *L. mexicana* altered the expression of antigen-presenting molecules on iBMMs, the expressions of costimulatory molecules were also analyzed on iBMMs stimulated with amastigotes exosomes. These included the activation molecule CD86 and the inhibitory costimulatory molecule PD-L1. A significant dose-dependent reduction was observed on the expression of both molecules on iBMMs after incubation of aExo concentrations above 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$) (Figure 6). The decrease of CD86 expression was approximately 60% (4,694 \pm 1,473 of control vs. 2,996 \pm 157.9 for aExo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 6(a)), whereas the reduction of PD-L1 was around of 20% on stimulated cells with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aExo (25,192 \pm 1,793 of control vs. 20,917 \pm 1,707 for aExo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 6(b)), as compared to the nonstimulated iBMMs. The positive control of iBMMs stimulated with LPS led to the enhanced expression of PD-L1, compared to control ($p < 0.05$), but no significant

change was observed on the CD86 expression. Taken together, these observations suggest that aExo of *L. mexicana* downregulate costimulatory molecules, such as CD86 and PD-L1.

4. Discussion

Exosomes are endocytic membrane-derived nanovesicles that contain functional biomolecules including DNA, RNA, mRNA, miRNA, lipids and proteins. They travel in bodily fluids and are capable of modifying cellular responses, such as the immune response [16, 30]. They are internalized by endocytosis or membrane fusions, and once inside of cells, such as macrophages, they are transported in endosomes and colocalize with tetraspanin CD63 in late endosomes [31]. In addition to CD63 marker, exosomal membranes are enriched in other endosomal-specific tetraspanins such as CD9, CD81, CD82 and CD37 [32]. *Leishmania* exosomes are loaded with membrane and cytoplasmic proteins in addition to virulence factors of the parasite [33]. Here, we analyzed exosomes of *L. mexicana* amastigotes and evaluated their effect on parasite-infected BMMs. We found that they not only inhibit nitric oxide production, favoring parasite survival within the cells, but they also modulate antigen-presenting molecules in the infected BMMs.

To avoid possible interference by FBS exosomes in our study, these were eliminated prior to all experiments. This was important since FBS exosomes are able to induce phenotypic changes and affect cellular proliferation and migration, as shown in tumor cells [24, 34–36]. Interestingly, depletion of FBS exosomes had no effect on the growth of *Leishmania* amastigotes, and it could be hypothesized that FBS exosomes possibly lack specific receptors or homologous signaling pathways related to proliferative responses of the parasite.

Exosomes of *L. mexicana* amastigotes have an average diameter of approximately 85 nm, which is within the limits (30–150 nm) described for exosomes of eukaryotic cells [15]. The protein analysis of amastigote exosomes showed that its content differed from that of amastigote lysates, which is in accordance with the literature, where more proteins have been reported in parasite extracts as compared to their exosomes [20]. Exosomal markers, such as tetraspanins CD63, CD9, or HSP70, were not found in amastigote exosomes. This observation also proved indirect evidence that no contamination with FBS exosomes was present in our study. Although the absence of tetraspanins CD63 and CD9 was to be expected, the lack of HSP70 in amastigote exosomes was noteworthy, since this protein had previously been described in *Leishmania* promastigotes, subjected to heat-stress [33]. We hypothesize that the absence of HSP70 in our study might be explained by the fact that *L. mexicana* amastigotes were cultured at 33°C, during which the parasites are not exposed to thermal stress conditions and therefore do not express HSP70.

Virulence factors contained within *Leishmania* exosomes are capable of interacting with host phosphatases, including gp63, aldolase (fructose-1-6-biphosphate aldolase), and EF-1 α . These are released in the parasitophorous vacuoles and reach the cytosol, as has been shown for macrophages infected

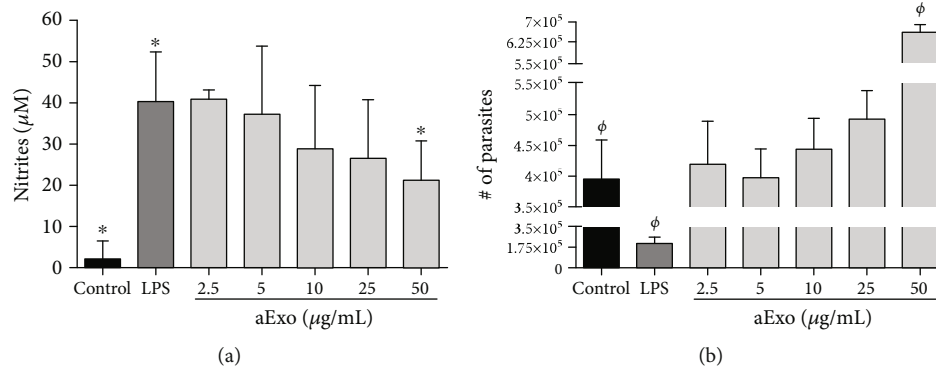


FIGURE 4: aExo from *L. mexicana* reduce NO production and favor parasite survival within iBMMs. For NO production analysis, iBMMs were cocultured with LPS (100 ng/mL) and aExo in suspension (2.5, 5, 10, 25, and 50 µg/mL) for 24 h, and cell supernatants were collected, and nitrates were quantified. For intracellular survival assay, iBMMs were stimulated with aExo for 24 h, washed, and further cultured for 72 h in RPMI medium supplemented with 10% FBS/-exo at 26°C. Differentiated promastigotes were counted. (a) Nitrites production by iBMMs stimulated with aExo. (b) Survival of intracellular parasites released by BMMs after aExo stimulation. Data are presented as mean ± SD ($n = 3$). Statistically significant differences were determined using Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ was considered significant, compared to control group.

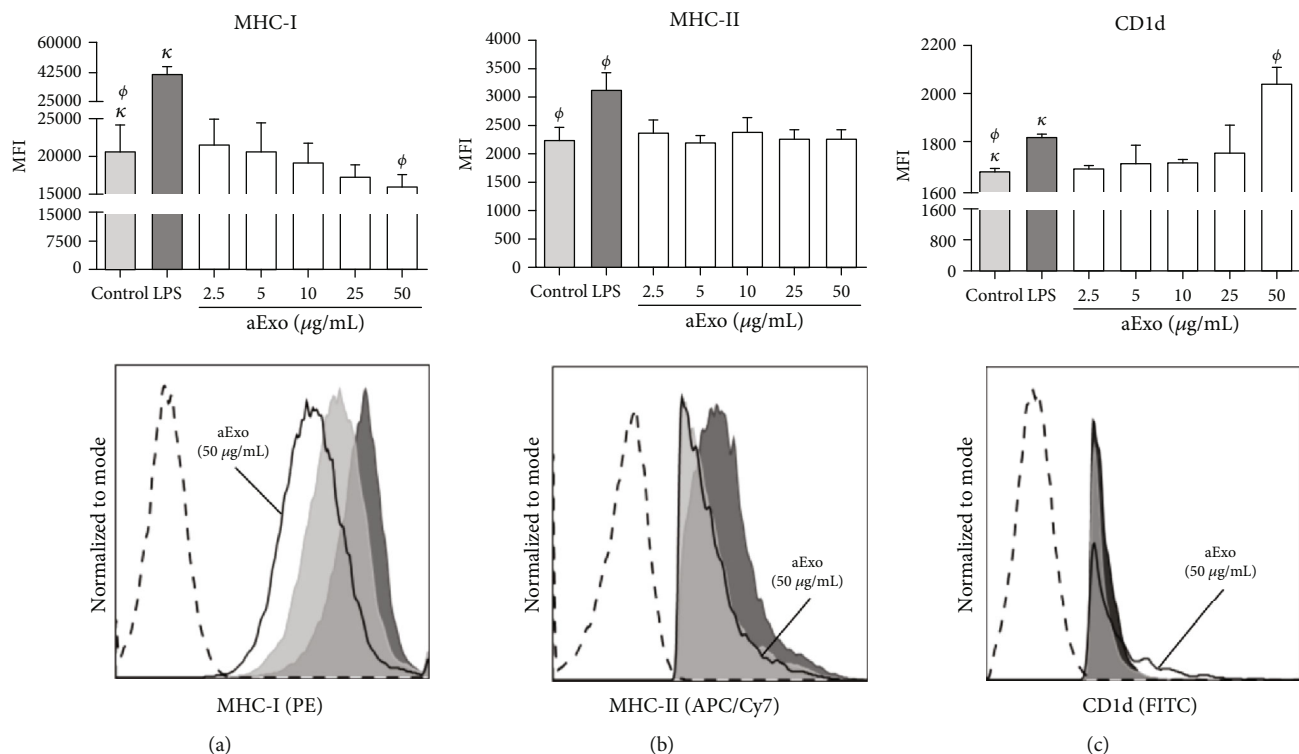


FIGURE 5: *L. mexicana* aExo modulate MHC-I and CD1d expression on iBMMs. Infected BMMs were incubated with different concentrations of aExo (2.5, 5, 10, 25, and 50 µg/mL) for 24 h. Cells were stained with mAbs anti-MHC-I, anti-MHC-II, and CD1d. (a) MHC-I expression. (b) MCH-II expression. (c) CD1d expression. Nonstimulated iBMMs and positive control of iBMMs incubated with LPS are presented. Top panels exhibit statistical summary bar graphs of mean fluorescence intensity (MFI) ± SD ($n = 5$). Statistically significant differences were determined using Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ was considered significant, compared to control group. Bottom panels show representative flow cytometry histograms of molecule expressions. Nonstimulated iBMMs (gray filled histograms), positive control (black filled histograms), and iBMMs stimulated with 50 µg/mL of aExo (black line) are shown. Unstained control is shown by a black dashed line.

with *L. donovani* [21, 33]. We now demonstrate that exosomes of *L. mexicana* amastigotes contain the metalloproteinase gp63 and the phosphatase PP2C, proteins that have been reported to be secreted by *Leishmania* [37, 38]. The zinc-metalloprotease gp63 plays a prominent role in establishing

conditions for the differentiation of promastigotes to amastigotes, being differentially expressed in *Leishmania* sp. Gp63 is predominantly expressed in promastigotes and downmodulated in the amastigote stage in *L. major*. However, it has been reported as the most abundant protein on amastigotes in *L.*

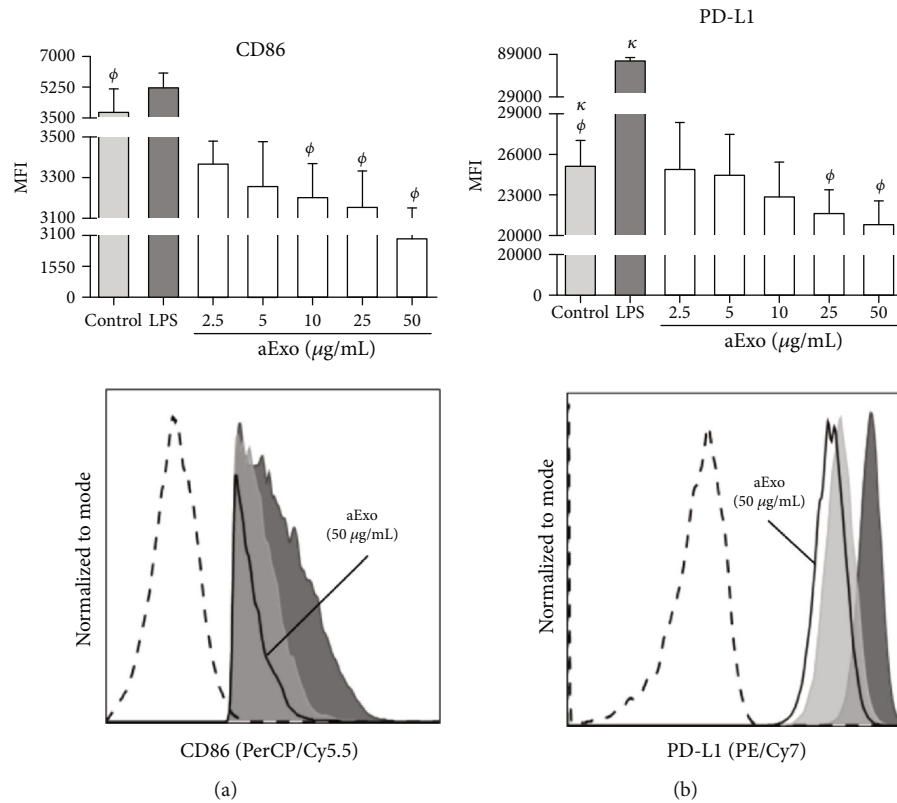


FIGURE 6: aExo of *L. mexicana* downregulate CD86 and PD-L1 expressions on iBMMs. Infected BMMs were incubated with aExo (2.5, 5, 10, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Cells were stained with mAbs anti-CD86 and anti-PD-L1. Controls: nonstimulated control and control of iBMMs incubated with LPS. (a) CD86 expression. (b) PD-L1 expression. Top panel displays a bar graph of MFI \pm SD ($n = 5$). Statistically significant differences were determined using Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ was considered significant, compared to control group. Bottom panels show representative histograms of molecule expressions. Nonstimulated iBMMs (gray filled histograms), positive control (black filled histograms), and iBMMs stimulated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of aExo (black line) are shown. Unstained control is shown in black dashed line.

mexicana and downmodulated in the promastigote differentiation stage [39, 40]. This major surface glycoconjugate secreted by the parasite interferes with many host defense mechanisms, including the cleavage of components of signaling cascades of fusion molecules and hampering the phagolysosomal fusion [8]. It has been shown to localize in the nuclear envelope and perinuclear area of host cells [41]. Gp63 cleavage of host cell substrates can affect transcription factors c-Jun and NF- κ B (p65/RelA fragment), as well as host phosphatases, including SHP-1 (Src homology region 2-domain-containing phosphatase-1) [7, 41, 42]. The proteolytic activation of host phosphatases, such as SHP-1, can lead to inhibition of signaling pathways in the host cells required for parasite control [7]. Thus, by subverting multiple microbicidal and immune functions of the cell, gp63 helps create a safe niche for parasite replication.

In addition to modulating host phosphatases, parasite virulence factors contained in exosomes are the parasite's own phosphatases that can interfere with phosphorylation events in host cells. Our data now show that exosomes of *L. mexicana* amastigotes contain the phosphatase PP2C, a metal-dependent protein phosphatase that dephosphorylates serine/threonine substrates, thereby negatively regulating protein kinase cascades [43]. This enzyme has been proposed to regulate key cellular events by downregulating MAPK sig-

nalizing pathway, thereby also affecting the oxidative burst and iNOS production [44, 45]. In leishmaniasis, it is regarded a virulence factor and has been reported in vesicles and in the flagellar pocket of *Leishmania* amastigotes and promastigotes, where exosome secretion takes place [37]. The PP2C phosphatase of *Leishmania major* was shown to have a molecular mass of 44.9 kDa [37]. Antibodies produced against *L. major* PP2C recognized a \sim 70 kDa protein in the secretome fraction of the *L. mexicana* parasite, possibly corresponding to a glycosylated form of the protein [10]. This same antibody was used in our current study, and it is noteworthy that this antibody recognizes a \sim 70 kDa protein in exosomes of *L. mexicana* amastigotes, which has the same molecular weight of PP2C in the secretome fraction, where exosomes are also present. Another explanation for the weight of PP2C could be that a protein homologous to PP2C could be present in exosomes of *L. mexicana* amastigotes. This is plausible, since 15 different PP2C proteins with similar sequences have been described by a phylogenetic analysis in *L. major* [46]. Other phosphatases found in exosomes of different *Leishmania* species that possibly play a role as virulence factors include LmPRL-1, which are predominantly expressed and secreted by exosomes of *L. major*, evidenced during macrophage infections. This parasite phosphatase was also found in the cytoplasm of the host cells and

suspected to modulate signaling pathways by targeting host cell phosphoproteins, thereby interfering with cellular functions and contributing to the survival of the parasite [21]. It would be of interest to study their function also in *L. mexicana* infection.

The use of green exosomes obtained from sfGFP transfected *L. mexicana* parasites showed that they appear in the cytosol of BMMs after 2 h of incubation and increased throughout the next 6 h. Exosomes can enter cells through diverse routes, such as phagocytosis, receptor-mediated endocytosis, or by membrane fusion [17, 47]. In mammalian exosomes, an internalization motif based on tyrosine has been described in the C-terminal of the CD63 tetraspanin, which leads to their rapid endocytosis [48]. Yet, since *L. mexicana* exosomes do not express CD63, another unknown pathway of entry seems to be present. A proteomic analysis has shown that *L. major* exosomes contain orthologous proteins to the clathrin heavy chain and target SNARE proteins found in the mammalian exosome proteome, which are central components of endocytosis and eukaryotic fusion mechanisms [33, 49]. This possibly suggests that exosomes enter cells through clathrin-mediated endocytosis or SNARE protein-mediated membrane fusion [49]. Once inside BMMs, *L. mexicana* exosomes were found to colocalize with the tetraspanin CD63 (present in late endosomes and lysosomes) after 6 h. This is suggestive of a possible fusion between parasite and macrophage exosomes and that possibly parasite exosomes are recycled in macrophage endosomes [50]. After their uptake by phagocytic cells, *Leishmania* amastigotes release proteins and exosomes in parasitophorous vacuoles, a phagolysosome-like structure that shelters the intracellular amastigotes [51]. These later fuse with multiple structures including late endosomes, also known as MVBs [18, 51]. Thus, macrophages possibly eliminate parasite proteins through their exosomes that derive from late endosomes [13]. By systematically delivering messages through exosomes, parasite amastigotes are able to modulate the response of their host cells in addition to becoming recirculated to other cells, favoring disease progression [13]. This is in accordance with a report on patients with tuberculosis, where exosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* proteins were found in serum of the patients, possibly contributing to the infection [52].

Our data now show that exosomes of *L. mexicana* amastigotes, in addition to inhibiting NO production of macrophages, they also exert an impact on host immune mechanisms by modifying antigen-presenting and costimulatory molecules, both of which have a crucial role in the immune defense against the parasite [53]. Hampering leishmanicidal mechanisms of macrophages through reduction of the NO production, in combination with reducing antigen-presenting mechanisms, limits the functional capacity of these cells to activate the adaptive immune response [53]. Our report is in accordance with previous reports that have shown that *L. mexicana* promastigotes, as well as their exosomes, inhibit NO production in the macrophage cell line B10R [54]. Furthermore, *L. major* exosomes were shown to downregulate the *NOS2* gene and degrade NF- κ B and AP-1 subunits, possibly by their gp63 [20]. Based on these observa-

tions, we now speculate that the inhibition of NO and the downregulation of MHC-I, CD86 and PDL-1 expressions in iBMMs cocultured with exosomes of *L. mexicana* amastigotes are possibly linked to degradation of NF- κ B by exosome gp63. It is noteworthy that the MHC-II expression remained unchanged, possibly because this molecule forms part of a protein complex related to multiple transcription factors, the most important of which is the class II transactivator (CIITA), the master regulator of class II gene activation, and the protein expression is regulated by transcription factors STAT-1 α , IRF-1 and USF-1 [55]. This result has also been observed for *L. infantum* parasites and their exosomes, which did not affect the expression of MHC-II in BMDCs and BMMs [22]. It now remains to be established, whether the reduced expression of MHC-I and costimulatory molecules induced by amastigote exosomes affects CD8 T cell activation in *Leishmania* infections.

It is noteworthy that our data on enhanced CD1d expression caused by *L. mexicana* aExo in iBMMs contrasts with reports in the literature, where exosomes of *L. major* promastigotes have been reported to reduce mRNA for CD1d in the cell line B10R [20]. Since the expression of CD1d is controlled by the transcription factor C/EBP- β [56], it remains to be established whether this opposing effect can be related to differences in parasite species and/or to the fact that exosomes of different parasite developmental stages were used. The enhanced expression of CD1d possibly suggests that amastigote exosomes could facilitate glycolipid antigen presentations, such as ceramides and sphingolipids of exosome surfaces or parasite glycolipids, such as lipophosphoglycan (LPG), glycoinositol phospholipids (GIPLs), glycosphingophospholipid (GSPL) and glycosylphosphatidylinositol (GPI) [57, 58]. These could be presented to NKT cells by CD1d, thereby inducing cytokine production [58]. However, since this enhanced CD1d expression occurs concomitantly with a reduction of the costimulatory molecule CD86, this possibly suggests that cellular activation is limited.

It was noteworthy that the expression of PD-L1 was found to be reduced on *L. mexicana*-infected BMMs stimulated with aExo. The contrary effect was expected, since in leishmaniasis an inhibition of T lymphocytes has been reported [59]. Moreover, the reduction of PD-L1 became more pronounced after incubating the iBMMs with higher levels of exosomes. Since the transcription of PD-L1 is also regulated by NF- κ B [60], a possible explanation for its reduction could be the before-mentioned degradation of NF- κ B by exosomal gp63.

Our data now enrich knowledge on the pathogenic mechanisms exerted by amastigote exosomes, aiding intracellular parasite survival. Thus, *Leishmania* amastigotes secrete exosomes inside of parasitophorous vacuoles [51], which lead to a reduction of the free radical NO, avoiding the hostile microenvironment within the cell. We propose that exosomes then fuse with proteins of the endosome membrane of the infected macrophages and are released into the cytosol of the host cells. While being in the perinuclear space [41], parasite exosomes are able to modulate microbicidal mechanisms of infected macrophages by phosphatases contained in their exosomes (PP2C) and by modulating protein tyrosine

phosphatases of the host cells (SHP-1) through gp63, thereby inhibiting the nuclear translocation of transcription factors, such as NF- κ B, JAK/STAT-1 and AP-1 [6]. The inactivation of NF- κ B and other transcription factors can lead to a reduced expression of MHC-I and costimulatory molecules CD86 and PD-L1, which hampers antigen presentation by the infected cells. Yet, despite enhancing CD1d expression when present in large numbers, exosomes still impair an effective immune response, since the lack of costimulatory molecules favors tolerance and cellular anergy [61, 62]. The release of exosomes to the extracellular medium through exocytosis appears to be an important pathway that permits the parasite to export its virulence factors outside the host cells. The interplay of these mechanisms generates conditions leading to enhanced parasite survival within the cell, in addition to permitting the release and spread of abundant parasites to neighboring cells.

5. Conclusions

Taken together, we now show that exosomes of *L. mexicana* amastigotes measure ~85 nm, containing protein-phosphatase PP2C (not previously described in exosomes) and the protease gp63. Parasite exosomes are internalized by BMMs and colocalize with the tetraspanine CD63 of endosomal membranes. In infected BMMs, exosomes reduce NO production, favoring parasite survival. They negatively modulate the immune response of the host cell by reducing MHC-I and CD86, both of which hamper effective T cell activation.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

LSS performed the experiments and drafted the manuscript. LSS, MD, and JZCH analyzed data and helped with the manuscript revision. JDD helped in gp63 purification from parasites. RCS assisted in the isolation of exosomes and maintained parasite culture. AMB performed TEM. ARR helped in NO production analysis. AREM and MMAG helped perform and analyze Western blots. IB supervised the study, helped with data interpretation, and reviewed the manuscript.

Acknowledgments

Laura Enedina Soto Serna is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received the fellowship 270872 from CONACYT. We would like to thank to María José Gómora Herrera for her help in the confocal microscopy. We also thank the Flow Cytometry core facility

from Coordinación de Investigación en Salud at Centro Médico Nacional, Siglo XXI of IMSS. This project was funded by PAPIIT IN211418.

Supplementary Materials

Supplementary 1: flow cytometry analysis of FBS-derived exosomes depletion through ultracentrifugation. (a) Flow cytometer was calibrated with reference FITC+ beads (0.1–2 μ m). (b) Flow cytometry analysis of complete normal FBS (FBS). (c) Flow cytometry analysis of exosome-free FBS (FBS/-exo). Supplementary 2: transmission electron microscopy of *L. mexicana* exosomes. A moderate number of vesicles were observed with a negative staining technique, contrasted with 2% uranyl acetate. (a–e) Photomicrographs of vesicles whose diameters range between 30 and 150 nm in diameter corresponding to exosomes. Bar: 100 nm. (b, f, h) In these exosomes, it is possible to appreciate the lipid bilayer membrane of exosomes (white arrows). (f) Various exosomes are observed in the field. Bar: 500 nm. Some exosomes showing darker staining incorporated a larger amount of contrasting agent. Supplementary 3: fluorescence analysis of transfected *L. mexicana* promastigotes with sfGFP gene. Parasites were transfected with sfGFP gene through the pLEXSY expression plasmid as described Diupotex et al. 2019 [27]. (a) Flow cytometry histogram shows wild-type *L. mexicana*^{WT} parasites (unfilled histogram) and *L. mexicana*^{sfGFP} parasites transfected with sfGFP gene (gray filled histogram). (b) Epifluorescence micrograph of *L. mexicana*^{sfGFP} parasites. (Supplementary Materials)

References

- [1] J. Sunter and K. Gull, "Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding," *Open Biology*, vol. 7, no. 9, article 170165, 2017.
- [2] D. Liu and J. E. Uzonna, "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2, no. 83, 2012.
- [3] M. Podinovskaia and A. Descoteaux, "*Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction," *Future Microbiology*, vol. 10, no. 1, pp. 111–129, 2015.
- [4] A. A. Wilkins-Rodríguez, A. R. Escalona-Montaña, M. Aguirre-García, I. Becker, and L. Gutiérrez-Kobeh, "Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells," *Experimental Parasitology*, vol. 126, no. 3, pp. 426–434, 2010.
- [5] Y. H. Li, Z. Q. Yan, A. Brauner, and K. Tullus, "Activation of macrophage nuclear factor- κ B and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS," *Respiratory Research*, vol. 3, no. 1, article 23, 2002.
- [6] V. D. Atayde, K. Hassani, A. da Silva Lira Filho et al., "*Leishmania* exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions," *Cellular Immunology*, vol. 309, pp. 7–18, 2016.
- [7] M. A. Gomez, I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster, and M. Olivier, "*Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases," *Science Signaling*, vol. 2, no. 90, 2009.

- [8] A. Isnard, M. T. Shio, and M. Olivier, "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2, p. 72, 2012.
- [9] D. Nandan, T. Yi, M. Lopez, C. Lai, and N. E. Reiner, "Leishmania EF-1 α activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 51, pp. 50190–50197, 2002.
- [10] A. R. Escalona-Montaña, D. M. Ortiz-Lozano, A. Rojas-Bernabé et al., "*Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages," *Parasitology*, vol. 143, no. 11, pp. 1409–1420, 2016.
- [11] L. A. Gilbert, S. Ravindran, J. M. Turetzky, J. C. Boothroyd, and P. J. Bradley, "*Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells," *Eukaryotic Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 73–83, 2007.
- [12] C. B. Mamoun and D. E. Goldberg, "Plasmodium protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1 β and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity in vitro," *Molecular Microbiology*, vol. 39, no. 4, pp. 973–981, 2001.
- [13] K. Hassani and M. Olivier, "Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 5, article e2185, 2013.
- [14] J. M. Silverman and N. E. Reiner, "*Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 1, p. 26, 2012.
- [15] G. K. Patel, M. A. Khan, H. Zubair et al., "Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 5335, 2019.
- [16] J. S. Schorey, Y. Cheng, P. P. Singh, and V. L. Smith, "Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions," *EMBO Reports*, vol. 16, no. 1, pp. 24–43, 2015.
- [17] G. Coakley, R. M. Maizels, and A. H. Buck, "Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections," *Trends in Parasitology*, vol. 31, no. 10, pp. 477–489, 2015.
- [18] T. Skotland, K. Sandvig, and A. Llorente, "Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward," *Progress in Lipid Research*, vol. 66, pp. 30–41, 2017.
- [19] J. M. Silverman, J. Clos, E. Horakova et al., "Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 9, pp. 5011–5022, 2010.
- [20] K. Hassani, M. T. Shio, C. Martel, D. Faubert, and M. Olivier, "Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, article e95007, 2014.
- [21] S. Leitherer, J. Clos, E. M. Liebler-Tenorio, U. Schleicher, C. Bogdan, and D. Soulat, "Characterization of the protein tyrosine phosphatase LmPRL-1 secreted by *Leishmania major* via the exosome pathway," *Infection and Immunity*, vol. 85, no. 8, article e00084-17, 2017.
- [22] B. Pérez-Cabezas, N. Santarém, P. Cecílio et al., "More than just exosomes: distinct *Leishmania infantum* extracellular products potentiate the establishment of infection," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 7, no. 1, article 1541708, 2018.
- [23] P. A. Bates, "Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture," *Parasitology*, vol. 108, no. 1, pp. 1–9, 1994.
- [24] E. Eitan, S. Zhang, K. W. Witwer, and M. P. Mattson, "Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 4, no. 1, p. 26373, 2015.
- [25] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton, "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids," *Current Protocols in Cell Biology*, vol. 30, no. 1, pp. 3.22.1–3.22.29, 2006.
- [26] M. D. Englen, Y. E. Valdez, N. M. Lehnert, and B. E. Lehnert, "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells," *Journal of Immunological Methods*, vol. 184, no. 2, pp. 281–283, 1995.
- [27] M. Diupotex, M. B. Martínez-Salazar, A. R. Escalona-Montaña et al., "The mKate fluorescent protein expressed by *Leishmania mexicana* modifies the parasite immunopathogenicity in BALB/c mice," *Parasite Immunology*, vol. 41, no. 2, article e12608, 2019.
- [28] P. Scott, "Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature," *Parasite Immunology*, vol. 7, no. 3, pp. 277–288, 1985.
- [29] N. S. Bryan and M. B. Grisham, "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 43, no. 5, pp. 645–657, 2007.
- [30] G. V. Shelke, C. Lässer, Y. S. Gho, and J. Lötvall, "Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 3, no. 1, p. 3, 2014.
- [31] C. Subra, D. Grand, K. Laulagnier et al., "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins," *Journal of Lipid Research*, vol. 51, no. 8, pp. 2105–2120, 2010.
- [32] Z. Andreu and M. Yáñez-Mó, "Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, p. 442, 2014.
- [33] J. M. Silverman, J. Clos, C. C. de'Oliveira et al., "An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 6, pp. 842–852, 2010.
- [34] G. V. Shelke, C. Lässer, Y. S. Gho, and J. Lötvall, "Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 3, no. 1, article 24783, 2014.
- [35] F. Angelini, V. Ionta, F. Rossi et al., "Exosomes isolation protocols: facts and artifacts for cardiac regeneration," *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, no. 2, pp. 303–311, 2016.
- [36] J. Ochieng, S. Pratap, A. K. Khatua, and A. M. Sakwe, "Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes," *Experimental Cell Research*, vol. 315, no. 11, pp. 1875–1888, 2009.
- [37] A. R. Escalona-Montaña, R. Pérez-Montfort, N. Cabrera et al., "Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *Leishmania major*: cloning and characterization," *Parasitology Open*, vol. 3, no. e15, pp. 1–9, 2017.
- [38] J. M. Silverman, S. K. Chan, D. P. Robinson et al., "Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*," *Genome Biology*, vol. 9, no. 2, p. R35, 2008.

- [39] G. Arango Duque, A. Jardim, É. Gagnon, M. Fukuda, and A. Descoteaux, "The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole," *PLoS Pathogens*, vol. 15, no. 7, article e1007982, 2019.
- [40] E. Medina-Acosta, R. E. Karess, H. Schwartz, and D. G. Russell, "The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 37, no. 2, pp. 263–273, 1989.
- [41] I. Contreras, M. A. Gómez, O. Nguyen, M. T. Shio, R. W. McMaster, and M. Olivier, "*Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 10, article e1001148, 2010.
- [42] D. J. Gregory, M. Godbout, I. Contreras, G. Forget, and M. Olivier, "A novel form of NF- κ B is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression," *European Journal of Immunology*, vol. 38, no. 4, pp. 1071–1081, 2008.
- [43] A. Stern, E. Privman, M. Rasis, S. Lavi, and T. Pupko, "Evolution of the metazoan protein phosphatase 2C superfamily," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 64, no. 1, pp. 61–70, 2007.
- [44] P. Jakkula, R. Qureshi, A. Iqbal, S. R. Sagurthi, and I. A. Qureshi, "*Leishmania donovani* PP2C: kinetics, structural attributes and *in vitro* immune response," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 223, pp. 37–49, 2018.
- [45] W. Ratajczak-Wrona, E. Jablonska, M. Marcinczyk, Z. Grabowska, and L. Piotrowski, "Role of p38 MAPK pathway in induction of iNOS expression in neutrophils and peripheral blood mononuclear cells in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 67, no. 11, pp. 2354–2363, 2009.
- [46] R. Brenchley, H. Tariq, H. McElhinney et al., "The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains," *BMC Genomics*, vol. 8, no. 1, p. 434, 2007.
- [47] D. Feng, W. L. Zhao, Y. Y. Ye et al., "Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis," *Traffic*, vol. 11, no. 5, pp. 675–687, 2010.
- [48] S. Charrin, S. Jouannet, C. Boucheix, and E. Rubinstein, "Tetraspanins at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 127, no. 17, pp. 3641–3648, 2014.
- [49] K. O. Schubert, M. Föcking, J. H. Prehn, and D. R. Cotter, "Hypothesis review: are clathrin-mediated endocytosis and clathrin-dependent membrane and protein trafficking core pathophysiological processes in schizophrenia and bipolar disorder?," *Molecular Psychiatry*, vol. 17, no. 7, pp. 669–681, 2012.
- [50] A. de Gassart, C. Géminard, D. Hoekstra, and M. Vidal, "Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins?," *Traffic*, vol. 5, no. 11, pp. 896–903, 2004.
- [51] F. Real and R. A. Mortara, "The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 2, article e1518, 2012.
- [52] S. Bhatnagar, K. Shinagawa, F. J. Castellino, and J. S. Schorey, "Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*," *Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3234–3244, 2007.
- [53] M. Olivier, D. J. Gregory, and G. Forget, "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 18, no. 2, pp. 293–305, 2005.
- [54] K. Hassani, E. Antoniak, A. Jardim, and M. Olivier, "Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, article e18724, 2011.
- [55] S. J. Lee, H. Qin, and E. N. Benveniste, "The IFN- γ -induced transcriptional program of the CIITA gene is inhibited by statins," *European Journal of Immunology*, vol. 38, no. 8, pp. 2325–2336, 2008.
- [56] H. Sikder, Y. Zhao, A. Balato et al., "A central role for transcription factor C/EBP-beta in regulating CD1d gene expression in human keratinocytes," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 3, pp. 1657–1666, 2009.
- [57] C. Théry, M. Ostrowski, and E. Segura, "Membrane vesicles as conveyors of immune responses," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 8, pp. 581–593, 2009.
- [58] J. Zamora-Chimal, J. Hernández-Ruiz, and I. Becker, "NKT cells in leishmaniasis," *Immunobiology*, vol. 222, no. 4, pp. 641–646, 2017.
- [59] S. Habib, A. El Andaloussi, K. Elmasry et al., "PDL-1 blockade prevents T cell exhaustion, inhibits autophagy, and promotes clearance of *Leishmania donovani*," *Infection and Immunity*, vol. 86, no. 6, article e00019-18, 2018.
- [60] K. Gowrishankar, D. Gunatilake, S. J. Gallagher, J. Tiffen, H. Rizos, and P. Hersey, "Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- κ B," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, article e0123410, 2015.
- [61] L. J. Appleman and V. A. Boussiotis, "T cell anergy and costimulation," *Immunological Reviews*, vol. 192, no. 1, pp. 161–180, 2003.
- [62] H. Waldmann, "Mechanisms of immunological tolerance," *Clinical Biochemistry*, vol. 49, no. 4-5, pp. 324–328, 2016.