



**Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología**

**Estudio comparativo de la actividad cisteín proteasa en los
exodegradomas de promastigotes y amastigotes de
*Leishmania mexicana***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela,
por la bachiller **Maria Isabel Mendible Mendoza** como
requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dra. María Carolina Pérez Gordones

CARACAS - VENEZUELA
ABRIL, 2020

El Presente Trabajo Especial de Grado presentado por la Bachiller
Maria Isabel Mendible Mendoza
Ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de
Licenciado en Biología y titulado:

**“Estudio comparativo de la actividad cisteín proteasa en los exodegradomas
de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*”**

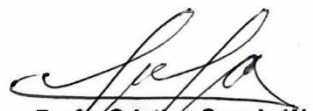
Fue realizado en forma telemática a través de la plataforma Google Meet, bajo la tutoría de la Profa. María Carolina Pérez Gordones, siendo aprobado en discusión pública por los siguientes miembros del jurado, designados por el Consejo de Escuela, quienes consideraron que cumplió con los requisitos exigidos por el reglamento universitario.

Caracas, a los 20 días del mes de noviembre del año 2020.



Profa. Yenis G. Pérez

(Jurado)



Profa. Cristina Sanoja W.

(Jurado)



Profa. María carolina Pérez Gordones

(Tutora)

Agradecimientos

Agradezco, desde el primer momento que comencé la carrera, haber contado con mi familia, con mis amigos, con profesores y personal administrativo y obrero de la Universidad Central de Venezuela, que me apoyaron y me brindaron su ayuda y cariño en todo momento.

Primero que nada, mis papas, Maria Elena Mendoza Cerrón y Mario Gerardo Mendible Soto, han sido y seguirán siendo mi más grande ejemplo, mis caballitos de batalla. Ellos me formaron, me criaron, me apoyaron, me consistieron, me inculcaron los mejores valores, y me enseñaron que tenía que luchar y culminar cada meta que me propusiera, que hay que seguir adelante, aunque el camino sea muy cuesta arriba y bastante que lo fue. Agradezco cada transporte, su tiempo, su paciencia, su consuelo y el haber estado ahí para nosotras siempre, incondicionalmente. Ellos han sido mi norte siempre y quienes han luchado por sacarnos adelante. A ellos les debo todo, esto y mucho más. Por siempre mi ejemplo, no podría pedir mejores padres y amigos.

A mis hermanas. Karol por siempre insistirme en que culminara, en que me esperaba, porque pasó muchos lados a mi lado y muchos años a distancia, pero siempre pendiente de nosotras. Mi otro ejemplo, porque después de esto ahora es que entiendo todo lo que ella paso para culminar su carrera, noches de desvelo, angustia, llanto, que luego se tradujeron en uno de los mayores logros de su vida. Mi gemela Maria Elena, ella es mi hermana, mi amiga, mi compañera y próximamente mi colega, sin ella estoy segura de que no lo hubiese logrado, la que me alentaba a seguir, la que estudiaba más y sacaba menos que yo, la mejor bióloga de las dos, mi apoyo y mi consuelo, a ella le debo mi carrera, gracias por

siempre haber estado en las buenas y en las malas y por nunca dejarme atrás. A mi prima Margareth, porque la quiero y me quiere como si fuéramos hermanas, crecimos juntas y juntas nos quedamos, mil gracias por entender cada paso de este proceso, por no preguntar cuanto nos faltaba, por acompañarnos en cada rato libre y por estar siempre a nuestro lado, gracias por escucharnos y acompañarnos en este largo camino, el haber estado ahí y compartir la misma casa de estudios fue lo mejor que nos pudo haber pasado.

Mi tutora. Después de mis papas, mi formadora, porque más que mi tutora, fue quien me abrió las puertas de su laboratorio para culminar la última etapa de la carrera, la que me animaba y me apoyaba en todo momento, la que me enseñó cada parte de ser profesional. Mejor elección imposible. Agradezco por cada detalle, por cada enseñanza y por todo el cariño que me brindo, siempre a mi lado impulsándome a ser cada vez mejor, quien creyó en mí y me permitió ser su primera tesista. De todo corazón mil gracias.

A Julio, por estar ahí siempre, por acompañarme en este camino desde el principio, y aunque al comienzo fue a mi lado luego a distancia seguiste apoyándome y alentándome a no abandonar. Quien me escucho, y se cansó de que me desquitara con él. Gracias por todas las palabras perfectas que me dijiste en todo momento, por alegrarte de cada logro y hacerme ver lo importante que era cada paso que daba.

Mis amigas, mi batallón, que, aunque por circunstancias personales, algunas no permanecieron a mi lado físicamente, las quiero igual a todas por haber sido y seguir siendo una parte importante en mi vida. A Michelle Ameruoso, por siempre estar ahí para nosotras, por darnos mucho cariño, por acompañarnos

en diferentes etapas en la universidad porque no solo fue mi amiga de carrera sino también de trabajo, ella es y será siempre la mejor amiga, que entiende, te escucha y no juzga, no pude haber pedido más, lo mejor que me ha dejado la carrera. Maira Pettits y Carla González, un agradecimiento inmenso, por todos los años que compartimos juntas, por siempre estar pendientes, por todos los escapes que nos echamos, por ser incondicionales y por llorar conmigo cuando lo necesitábamos, mi grupo, porque ustedes estuvieron siempre.

A mis tíos, por estar ahí, por brindarnos todo el apoyo que pudieron, por ofrecernos siempre su casa y darnos todo el cariño. Gracias por estar pendientes de nosotras y ofrecernos su ayuda sin pensarlo dos veces. Ustedes se alegraron en cada momento, sintieron nuestros logros como los suyos y se emocionaron cada vez que salimos a adelante.

A mis amigos. Bruno y Aarón, por dejarme ser parte de su equipo, por acompañarme, salvarme, apoyarme y nunca dejarme sola. Ellos son la clase de personas que te quieres encontrar en un momento de crisis, porque lo solventan contigo pase lo que pase, que no te dejan morir. Sin ellos mis últimas materias no hubiesen sido lo mismo, y aunque somos muy diferentes entre nosotros, logramos armar el mejor equipo. Pedro Pablo, mi amigo para todo, él cuenta conmigo y yo cuento con él, siempre pensado en mí, gracias por todo el cariño, por todo el apoyo, por ser incondicional, por alentarme y entenderme. Alexander, el que se pierde, pero siempre aparece, desde el principio juntos en la Facultad, pero de carreras diferentes, el mejor abrazo, a quien siempre buscaba y quien me recibía con mucho cariño, gracias por escucharme, por estar siempre y apoyarme. Por último y no menos importante, a Jorgen Venturini, mi amigo de tesis, a quien

conocí en la etapa final de la carrera, quien me enseñó, me oriento, me ayudo y me apoyo durante todo este proceso, pero especialmente en el último objetivo, dedicar tu tiempo, tu esfuerzo y además de haber confiado en mi no tiene precio.

Más que agradecida con mi casa de estudios y con el Instituto de Biología Experimental, los cuales me brindaron conocimientos, aprendizajes y memorias que atesorare toda la vida y me permitieron conocer a personas de gran valor, que me acogieron y me brindaron mucho cariño, comprensión y apoyo. Todas las personas que conocí a lo largo de estos años son de una calidad humana increíble, que a pesar de cualquier situación siempre salen adelante y demuestran que no pude estar en un mejor lugar. Mi cariño y mis mejores deseos siempre estarán con mi universidad, fue un placer para mí estar entre sus paredes.

Resumen

Miembros del género *Leishmania* son agentes etiológicos de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. Durante la infección, estos parásitos despliegan estrategias adaptativas que les permiten sobrevivir a los cambios impuestos por los ambientes donde se desarrollan. Factores liberados al medio extracelular, como proteínas, han sido vinculados con estos mecanismos, participando directamente en la interacción con el hospedador. Al conjunto de proteínas exportadas al exterior celular, bajo condiciones definidas, se le denomina exoproteoma (EP) y en *Leishmania* sp., las cisteín proteasas (CP) presentes en este, las cuales a su vez forman parte del exodegradoma (ED), son consideradas importantes blancos quimioterapéuticos y de diagnóstico dada su participación en los procesos de infección, replicación y desarrollo del parásito. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad CP presente en los ED de promastigotes y amastigotes-like de *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) y relacionarla con la virulencia del parásito. Esta evaluación se realizó comparando los patrones de degradación de gelatina en el ED de promastigotes y amastigotes, en zimogramas, en presencia y ausencia de medios de reacción que favorecen la actividad de las CP y de inhibidores de esta. Por otra parte, se evaluaron las diferencias de actividad CP entre los ED de promastigotes virulentos (PV) y naturalmente atenuados (PNA) de la misma cepa. Estos resultados nos permitieron concluir que los ED de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, bajo las condiciones de estudio establecidas, presentan una actividad CP diferencial, la cual se relaciona directamente con la virulencia del parásito.

Palabras clave: Exoproteoma, exodegradoma, cisteín proteasa, *Leishmania*, virulencia

Abreviaturas

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AgNO₃:** nitrato de plata
- **AL:** amastigotes-*like*
- **ANOVA:** Análisis de Varianza
- **Asn:** asparagina
- **BSA:** albumina sérica bovina
- **C₂₁H₂₀BrN₃:** bromuro de etidio
- **C₂H₃NaO₂:** acetato de sodio
- **C₂H₅NO₂:** glicina
- **C₂H₅OH:** etanol
- **C₃H₈O₃:** glicerol
- **CH₂O:** formaldehído
- **CH₃COOH:** ácido acético
- **CH₃OH:** metanol
- **CP:** cisteín proteasa
- **CPA:** cisteín proteasa A
- **CPB:** cisteín proteasa B
- **CPC:** cisteín proteasa C
- **CuSO₄•5H₂O:** sulfato de cobre pentahidratado
- **Cys:** cisteína
- **DG:** degradoma
- **dNTPs:** desoxirribonucleótidos fosfatos
- **DTE:** ditioeritritol
- **E/S:** excreción/secreción
- **E64:** trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (inhibidor cisteínproteasas)
- **ED:** exodegradoma
- **EDTA:** ácido tetraacético de etilenediamina
- **EP:** exoproteoma
- **GP63:** proteína leishmanolisina
- **GPI:** glicoinositol fosfolípidos
- **H₃PO₄:** ácido fosfórico
- **His:** histidina
- **IL-12:** Interleucina-12
- **Iod:** iodoacetamida
- **KCl:** cloruro de potasio
- **kDa:** kilo Dalton
- **KH₂PO₄:** fosfato monopotásico
- **LC:** leishmaniasis cutánea
- **Leu:** leupeptina
- **LIT:** Infusión de hígado y triptosa
- **LMC:** leishmaniasis mucocutánea
- **LPG:** lipofosfoglicanos
- **LV:** leishmaniasis visceral

- **MP:** metalo proteasa
- **Na₂C₄H₄O₆:** tartrato disódico
- **Na₂CO₃:** carbonato de sodio
- **Na₂HPO₄:** fosfato disódico
- **Na₂S₂O₃:** tiosulfato de sodio
- **NaCl:** cloruro de sodio
- **NaHPO₄:** fosfato sódico
- **NaOH:** hidróxido de sodio
- **NC-IUBMB:** Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
- **(NH₄)₂SO₄:** sulfato de amonio
- **P:** promastigotes
- **p/mL:** parásitos por mililitro
- **p/v:** peso/volumen
- **pb:** pares de bases
- **PBS:** solución amortiguadora fosfato salina
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PM:** peso molecular
- **PNA:** promastigotes naturalmente atenuados
- **PSA:** persulfato de amonio
- **PV:** promastigotes virulentos
- **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute
- **SDS:** dodecil sulfato sódico
- **SFB:** suero fetal bovino
- **SP:** serín proteasa
- **TAE:** tampón Tris-Acetato EDTA
- **Taq polimerasa:** *Thermus aquaticus* polimerasa
- **TP:** Tripan-Blue
- **VIH:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- **v/v:** volumen/volumen

Índice general

Veredicto	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	vii
Abreviaturas	viii
Índice general	x
Índice de figuras	xiv
Índice de tablas	xvi
1. Introducción	1
1.1. La leishmaniasis	1
1.1.1. Epidemiología	2
1.1.2. Etiología	2
1.1.3. Tratamientos para la leishmaniasis	4
1.1.4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	4
1.1.5. Factores de virulencia de <i>Leishmania</i> sp.	7
1.1.6. Degradoma y exodegradoma de <i>Leishmania</i> sp.	9
1.1.6.1. Cisteín proteasas en el exodegradoma de <i>Leishmania</i> sp.	13
2. Antecedentes	18
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo General	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. Materiales y Métodos	22

4.1.	Reactivos	22
4.2.	Metodología utilizada para la estandarización de la obtención y evaluación de las actividades proteolíticas de los exoproteomas	22
4.2.1.	Parásitos	22
4.2.2.	Cultivos axénicos de <i>Leishmania mexicana</i>	23
4.2.3.	Curvas de crecimiento de <i>Leishmania mexicana</i>	24
4.2.4.	Transformación a amastigotes-like de <i>Leishmania mexicana</i>	24
4.2.5.	Determinación de porcentaje de viabilidad	25
4.2.6.	Obtención del exoproteoma de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	25
4.2.7.	Determinación de la concentración de proteínas en los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	26
4.2.8.	Análisis de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-PAGE)	26
4.2.8.1.	Tinción de geles en condiciones disociantes con Coomassie coloidal G-250	27
4.2.9.	Determinación de la actividad proteolítica presente en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> mediante geles de actividad enzimática o	27

	zimogramas	
4.2.9.1.	Tinción de geles de actividad con Azul de Coomassie	29
4.3.	Metodologías utilizadas para evaluar la virulencia de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	29
4.3.1	Animales experimentales	29
4.3.2	Infección de animales experimentales con promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de <i>Leishmania mexicana</i> (BEL21)	30
4.3.3	Aislamiento de ADN proveniente de sangre, tejido y cultivo axénico	30
4.3.4	Diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de muestras provenientes de animales infectados	31
4.3.5	Diagnóstico parasitológico de animales infectados: frotis por aposición de extremidad infectada	32
4.3.6	Análisis Estadístico	33
5.	Resultados	34
5.1	Estandarización de las condiciones óptimas para la obtención y evaluación de las actividades proteolíticas de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	34

5.2	Identificación y caracterización parcial de la actividad cisteín proteasa presente en los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	40
5.3	Relación entre la presencia de actividad cisteín proteasa en el exodegradoma de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y la virulencia del parásito	45
6.	Discusión	52
7.	Conclusiones	70
8.	Bibliografía	71

Índice de figuras

Figura 1.	Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i>	3
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	6
Figura 3.	Mecanismo de acción de las cisteín proteasas	17
Figura 4.	Proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> identificadas por análisis de espectrometría de masa	20
Figura 5.	Curva de crecimiento de promastigotes axénicos de <i>Leishmania mexicana</i>	34
Figura 6.	Estandarización del título y tiempo de excreción/secreción de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	37
Figura 7.	Determinación de condiciones óptimas para la evaluación de la actividad cisteín proteasa de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	39
Figura 8.	Estudio comparativo de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	41
Figura 9.	Estudio comparativo de la actividad proteolítica de los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	42
Figura 10.	Efecto de inhibidores sobre la actividad cisteín proteasa en los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	44

Figura 11.	Curva de crecimiento de promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de <i>Leishmania mexicana</i>	45
Figura 12.	Evaluación del tamaño de la almohadilla plantar de animales inoculados con promastigotes virulentos y promastigotes naturalmente atenuados de <i>Leishmania mexicana</i>	46
Figura 13.	Diagnóstico molecular y parasitológico de animales experimentales inoculados con promastigotes virulentos o con promastigotes naturalmente atenuados de <i>Leishmania mexicana</i>	48
Figura 14.	Estudio comparativo de los exoproteomas de promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de <i>Leishmania mexicana</i>	49
Figura 15.	Estudio comparativo de la actividad proteolítica de los exodegradomas de promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de <i>Leishmania mexicana</i>	51

Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación de las proteasas en clanes y familias	11
Tabla 2.	Condiciones de ciclaje para la amplificación de ADN de <i>Leishmania mexicana</i> con los cebadores M1/M2	32
Tabla 3.	Secuencia de cebadores complejo específicos M1/M2	32
Tabla 4.	Determinación de los parámetros óptimos título de parásitos y tiempo de excreción/secreción para la obtención del exoproteoma de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	36
Tabla 5.	Parámetros óptimos para la obtención y evaluación de los exoproteomas de <i>Leishmania mexicana</i>	40
Tabla 6.	Actividad de posibles cisteín proteasas en el exodegradoma de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y su sensibilidad a inhibidores	56
Tabla 7.	Cisteín proteasas caracterizadas en los exoproteomas de <i>Leishmania mexicana</i>	57
Tabla 8.	Resumen de cisteín proteasas identificadas en el exodegradoma de <i>Leishmania mexicana</i> cepa BEL21	65

1. Introducción

1.1 La leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa transmitida al ser humano cuando una hembra hematófaga de dípteros del género *Lutzomyia* (en América) o *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África), pica al hospedador mamífero al alimentarse y al mismo tiempo regurgita parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Gómez y Olivier, 2010; Shing y Sivakumar, 2003). Esta se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas entre las que se destacan:

- **Leishmaniasis cutánea (LC):** manifestación clínica más frecuente. Se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas, tipo pápulas que se agrandan hasta un nódulo que posteriormente dan lugar a úlceras dejando cicatrices de por vida, las cuales son causa de discapacidad grave (OMS, 2016; Burza y col., 2018).
- **Leishmaniasis mucocutánea (LMC):** manifestación clínica descrita únicamente en el nuevo mundo (Kumar y Engwerda, 2014). Se caracteriza por generar la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta (OMS, 2016).
- **Leishmaniasis visceral (LV):** también conocida como kala-azar, es la manifestación clínica más severa presentando una mortalidad del 95% en los casos sin tratamiento (Kumar y Engwerda, 2014). Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia (OMS, 2016).

1.1.1 Epidemiología

La leishmaniasis es endémica en 98 países en regiones tropicales y subtropicales del mundo, con riesgo de transmisión a más de 350 millones de personas (OPS, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se producen entre 700000 y 1000000 de nuevos casos y entre 26000 y 65000 defunciones (OMS, 2016), cifras que han incrementado dado a que la leishmaniasis es una de las principales enfermedades oportunistas en pacientes VIH⁺ (Mundodi y col., 2005).

1.1.2 Etiología

En las Américas, la infección humana se produce principalmente por 15 especies del género *Leishmania* que se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (figura 1). En esta región, las especies más estudiadas de estos subgéneros son: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) guyanensis* (OPS, 2019). En Venezuela las manifestaciones clínicas más frecuentes, LC y la LMC, son causadas principalmente por las especies *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Hirst, y Stapley, 2000; Rodríguez y col., 2002).

En el presente trabajo se utilizó como modelo biológico la especie *Leishmania mexicana mexicana* - cepa MHOM/BZ/82/BEL21, la cual fue aislada a partir de lesiones humanas en Belice (1982). Esta es una cepa de referencia por parte de la OMS (Orué y col., 2008).

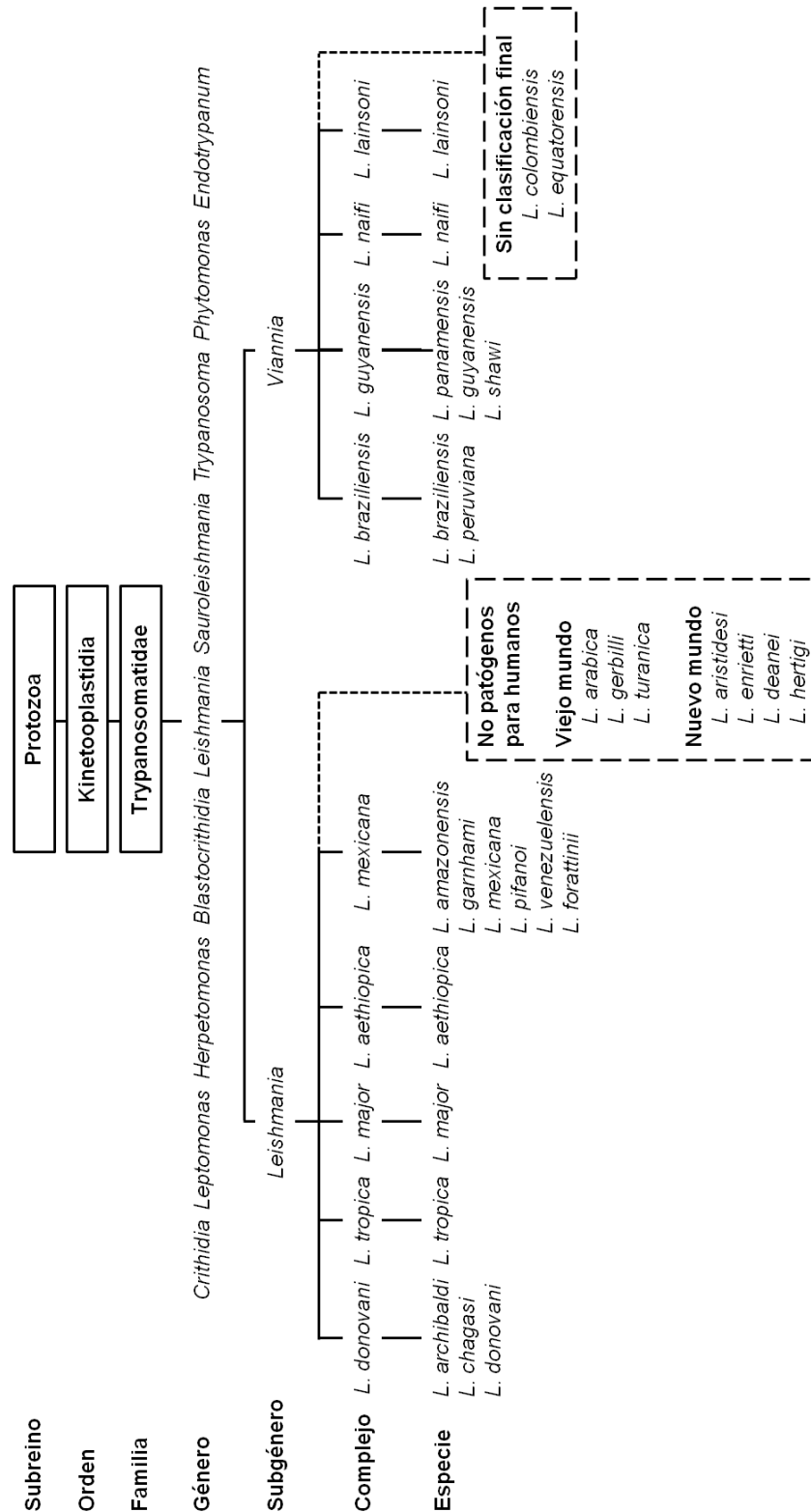


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania*. Representación esquemática de las principales especies de *Leishmania*. Tomado y modificado: OMS, 2010.

1.1.3 Tratamientos para la leishmaniasis

En áreas endémicas, al no existir una vacuna eficiente frente a estas enfermedades, el tratamiento farmacológico se convierte en la principal herramienta para combatirlas. A día de hoy, existen cerca de 25 compuestos que muestran efecto anti-*Leishmania*, pero sólo unos pocos han sido clasificados como sustancias válidas para tratamiento en humanos (Villa y col., 2014). Entre las principales drogas de primera línea, empleadas para combatir esta enfermedad, se pueden mencionar compuestos orgánicos de antimonio trivalentes y pentavalentes tales como, antimoniato de N-metil glucamina y estibogluconato de sodio. Por su parte, como compuestos de segunda línea se pueden mencionar: la anfotericina B, anfotericina B liposomal, la pentamidina, la paromomicina, la miltefosina y la aminosidina (Castro y col., 2003). En general, estos fármacos presentan una eficacia limitada, desarrollan resistencia por parte del parásito, son tóxicos para el paciente, requieren administración parenteral y sus tratamientos son largos y costosos (Jiménez y col., 2012). Por estas razones, es importante continuar en la búsqueda de nuevos blancos quimioterapéuticos, con el fin de desarrollar tratamientos efectivos y preventivos (vacunas).

1.1.4 Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Los representantes del género *Leishmania* son parásitos protozoarios con un ciclo de vida complejo y heteroxeno (figura 2), que involucra dos tipos de hospedadores y dos morfotipos principales del parásito (Ambit y col., 2011; Kumar y Engwerda, 2014). En el mosquito, los parásitos se replican como células flageladas extracelulares y activamente móviles conocidas como promastigotes (figura 2A), que residen principalmente en el tracto digestivo del insecto. Cuando

el mosquito pica a un hospedador mamífero (transmisión antroponótica o zoonótica), los promastigotes metacíclicos son inoculados y pueden ser fagocitados por macrófagos o células afines del hospedador, donde se diferencian a amastigotes, los cuales poseen una forma redondeada, no móvil (figura 2A) (Besteiro y col., 2007; Kumar y Engwerda, 2014) (figura 2B). Una vez transformados, se multiplican hasta producirse la lisis de los fagocitos, liberándose e infectando otras células. Posteriormente, un insecto vector sano se alimenta de la sangre del hospedador e ingiere los macrófagos infectados con amastigotes. Estos parásitos se transforman en promastigotes en el intestino medio del insecto vector, se dividen y migran a la probóscide, completándose el ciclo (Besteiro y col., 2007; Kumar y Engwerda, 2014) (figura 2B).

La presencia de morfotipos estructuralmente disímiles en el ciclo de vida de *Leishmania* sp., denota una clara adaptación del parásito a las diferentes condiciones ambientales dentro de sus hospedadores (Zilberstein y Shapira, 1994). Esto sugiere el despliegue de estrategias adaptativas que les permiten sobrevivir a los cambios impuestos por los ambientes donde se desarrollan (Sajid y McKerrow, 2002). El conocimiento de tales estrategias podría permitir el establecimiento de nuevas alternativas en el desarrollo de terapias contra la leishmaniasis.

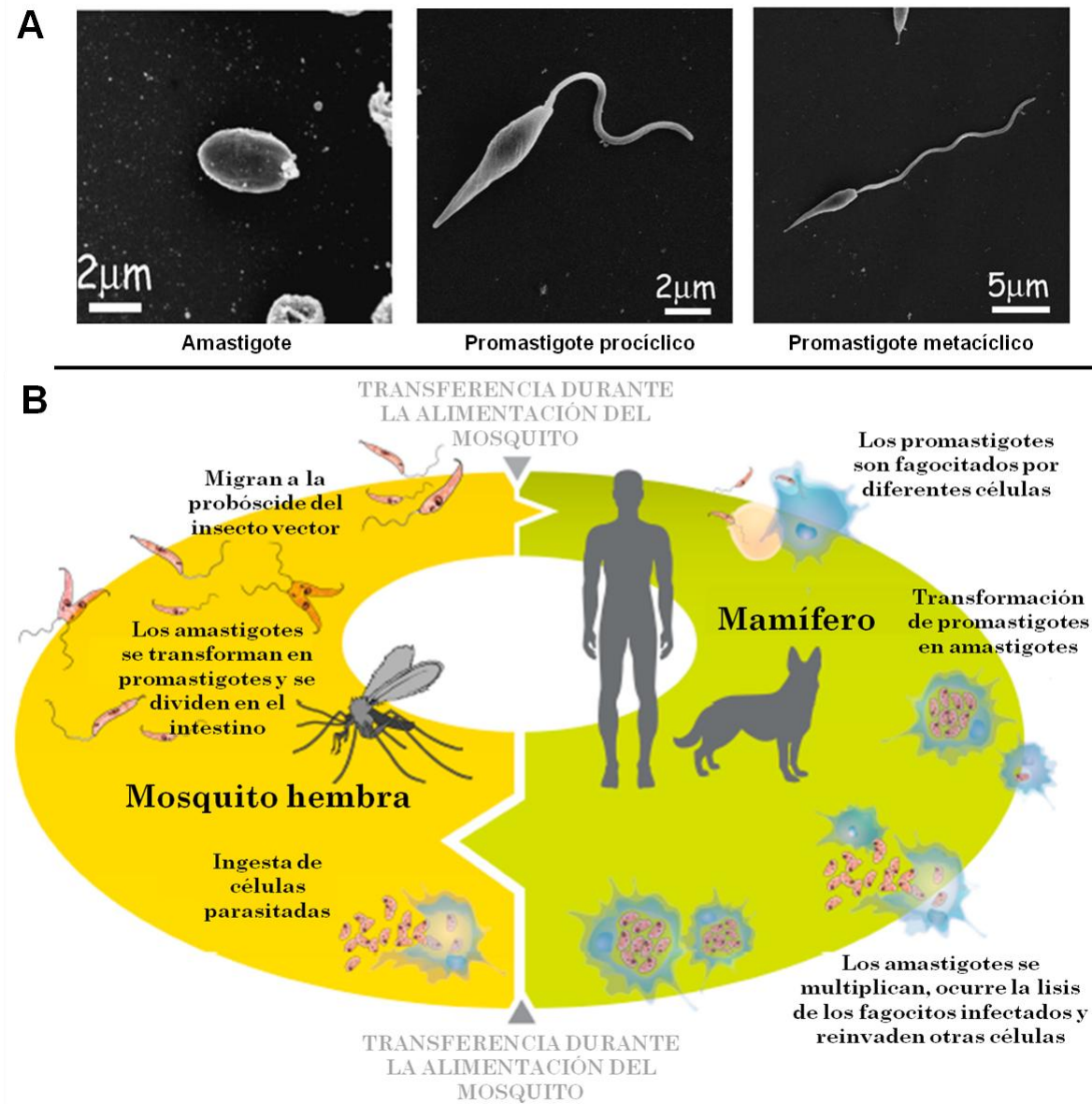


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. A) Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de los principales morfotipos de *Leishmania* sp.: amastigote, promastigote procíclico y promastigotes metacíclicos. B) Ciclo de vida de *Leishmania* sp: la hembra hematófaga infectada se alimenta del hospedador sano (transmisión antroponótica y/o zoonótica), en ese momento regurgita promastigotes metacíclicos. Estos son fagocitados por macrófagos u otro tipo de células mononucleares fagocíticas. Una vez dentro de las células del hospedador se transforman en amastigotes (los cuales pueden replicarse dentro de los fagolisosomas). Se multiplican, generando la lisis de los fagocitos, se liberan e infectan otras células. El insecto vector sano se alimenta del hospedador e ingiere los macrófagos infectados con amastigotes. Estos amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos en el intestino medio, se dividen y migran a la probóscide del insecto vector. Una vez ubicados en esa zona, se transforman en promastigotes metacíclicos infectivos, completándose el ciclo. Tomado y modificado de: Besteiro y col., 2017; Veras y Bezerra de Menezes, 2016.

1.1.5 Factores de virulencia de *Leishmania* sp.

El proceso de interacción entre parásitos del género *Leishmania* sp. y las células del sistema inmunológico del hospedador mamífero es altamente complejo. Este conduce a una respuesta inflamatoria esencial para el control de parásitos. Células adyacentes al sitio de infección liberan quimiocinas las cuales inducen el reclutamiento de células inflamatorias como los neutrófilos (Atayde y col., 2016). Se ha sugerido que factores liberados por parásitos presentan propiedades quimiotácticas similares a las de las quimiocinas, favoreciendo así su propia fagocitosis (Charmoy y col., 2010).

Estos factores juegan un papel clave en el establecimiento de la infección, denominándose así, factores de virulencia (Atayde y col., 2016). Por su parte, la virulencia está definida como el grado de patogenicidad de un microorganismo, la cual se refleja en el espectro de signos y síntomas clínicos observados (Chang y col., 1990). Entre los factores de virulencia mejor caracterizados de *Leishmania* sp. se pueden mencionar:

- **Los lipofosfoglicanos (LPG):** moléculas constitutivas del glicocálix que cubre completamente la superficie de los promastigotes, estando dramáticamente reducido en amastigotes (Forestier y col., 2014). Se sugiere que los LPG participan directamente en la interacción temprana parásito-hospedador (Descoteaux y col., 1992).
- **Los proteofosfoglicanos (PPG):** moléculas de superficie que se pueden presentar de manera filamentosa, unidas a la membrana y/o secretadas (Ilg, 2000). Los PPG se expresan tanto en promastigotes como en amastigotes y son constitutivos del gel secretor de promastigotes, matriz

gruesa secretada por los parásitos dentro del intestino medio del mosquito (Rogers y Bates, 2007). Se ha demostrado que este gel media el proceso de alimentación del insecto en beneficio del parásito, induciendo la regurgitación de los promastigotes en el hospedador mamífero (Rogers y Bates, 2007; Rogers y col., 2009).

- **Los Glicoinositol fosfolípidos (GPI):** moléculas lipídicas que contienen en su estructura uno o más inositoles modificados (Zufferey y col., 2003). Se ha demostrado que los GPI están involucrados en la inhibición de la activación y señalización de los macrófagos. Dado que los niveles de expresión de GPI en amastigotes son altos, se sugiere su participación en la supervivencia del parásito dentro del fagolisosoma (Zufferey y col., 2003).
- **Las Fosfatasas ácidas:** fosfatasas de alto peso molecular y altamente glicosiladas que están presentes en la superficie de todas las especies de *Leishmania* estudiadas hasta la fecha (Shakarian y col., 2003). Estas participan en la adquisición de nutrientes, la modulación del entorno del hospedador favoreciendo la sobrevivencia del parásito y confiriendo, gracias a su alto porcentaje de glicosilación, resistencia y protección ante la degradación proteolítica y bajo pH, característicos de la vacuola fagolisosomal de los macrófagos (Joshi y col., 2004).
- **Las Proteasas:** enzimas proteolíticas que desempeñan un papel clave en las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito. Actualmente hay evidencias de que los diferentes morfotipos del parásito son capaces de exportar proteasas que modulan directamente la migración a través de

barreras tisulares, la invasión de células, la degradación de la hemoglobina entre otras proteínas de la sangre, la evasión de la respuesta inmunológica, la activación de la inflamación en el hospedador mamífero y la modulación de rutas de señalización celular del hospedador, entre otras (Silva-Almeida y col., 2012).

La importancia de los factores de virulencia, en el proceso de interacción parásito-hospedador, denota que la identificación y caracterización de estas moléculas, mayoritariamente proteicas, constituiría una herramienta en la comprensión de las estrategias utilizadas por estos parásitos (Chang y col., 1990; Beverley, 2003). Razón por la cual, actualmente las investigaciones que involucran el desarrollo de nuevos tratamientos o quimioterapia, así como la búsqueda de nuevos blancos proteicos con fines diagnósticos, se abocan a la caracterización de los exoproteomas (EP), conjunto de proteínas liberadas al exterior celular en condiciones definidas (Corrales y col., 2010; Tonui y col., 2004), dado que estos aportan información sobre las proteínas que participan directamente en el proceso de infección (Peysselon y col., 2013).

1.1.6 Degradoma y exodegradoma de *Leishmania* sp.

El Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) asignó el uso del término proteasa al conjunto de hidrolasas que catalizan reacciones de ruptura de uniones tipo amida en macromoléculas proteicas y péptidos oligoméricos. Estas moléculas proteolíticas han sido identificadas en todos los sistemas biológicos, desde virus hasta vertebrados (Mottram y col., 2004; Olivier y col., 2005; Santarém y col., 2007). Inicialmente de acuerdo a la NC-IUBMB, las proteasas se clasificaban en

exoproteasas y endoproteasa de acuerdo al sitio de escisión del enlace peptídico (NC-IUBMB, 1992). Pueden clasificarse según su mecanismo catalítico, y distribuir en nueve clases principales: Aspartil (A), Cisteín (C), Glutamil (G), Metaló (M), Asparaginil (N), Mixtas (P), Serín (S), Treonín (T), Desconocidas (U) (Rawlings y col., 2014). No obstante, actualmente, se cuenta con un sistema de clasificación que las agrupa con base en sus características estructurales, las relaciones filogenéticas y los datos disponibles sobre su secuencia aminoacídica. Este sistema se conoce como la base de datos MEROPS y también ordena a las proteasas en grupos denominados clanes y familias (Rawlings y col., 2014).

Una familia se define como el conjunto de enzimas proteolíticas que muestran una similitud significativa en la secuencia aminoacídica con la enzima tipo que define a la familia o con otra proteína que ya se ha demostrado que es homóloga a la enzima tipo y, por lo tanto, es un miembro de la familia. La relación de homología debe existir al menos en los sitios de unión del sustrato primario (Rawlings y col., 2014). Cada familia se identifica con una letra que representa el tipo catalítico de las enzimas proteolíticas junto con un número único (Rawlings y col., 2014).

Un clan se compone por todas las proteasas que han surgido de un único origen evolutivo. Representa una o más familias que muestran evidencia de su relación evolutiva por sus estructuras terciarias similares, o si las estructuras terciarias no se encuentran disponibles, por el orden de los residuos del sitio catalítico en la cadena de polipéptidos (Rawlings y col., 2014). Cada clan se identifica con dos letras, la primera representa el tipo catalítico (A, C, G, M, P, S, T, U) de las familias incluidas en el clan y una segunda letra que corresponde a

una numeración alfabética (A-Z) (Rawlings y col., 2014). La tabla 1 resume la clasificación de los clanes y familias de proteasas más representativos.

Tabla 1. Clasificación de las proteasas en clanes y familias. Tomada y modificada: Rawlings y col., 2018

Clan	Familia	Peptidasas de referencia
Clan de las aspartil peptidasas		
AA	A1	pepsina A (<i>Homo sapiens</i>)
	A2	VIH-1 retropepsina (virus de inmunodeficiencia humana)
Clan de las cisteín peptidasas		
CA	C1	papaína (<i>Carica papaya</i>)
	C2	calpaína-2 (<i>Homo sapiens</i>)
	C14	caspasa-1 (<i>Rattus norvegicus</i>)
	C14	metacaspasa (subfamilia de la caspasa)
Clan de las glutamil peptidasas		
GA	G1	scytalidoglutamica peptidasas (<i>Scytalidium lignicolum</i>)
Clan de las metalo peptidasas		
MA	M1	aminopeptidasa N (<i>Homo sapiens</i>)
	M8	leishmanolisina (<i>Leishmania major</i>)
	M32	carboxipeptidasa Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)
MC	M14	carboxipeptidasa A1 (<i>Homo sapiens</i>)
Clan de las asparaginil peptidasas		
ND	N4	dominio de autoescisión asociado a Tsh y similar (<i>Escherichia coli</i>)
Clan de las serín peptidasas		
	S10	carboxipeptidasa Y (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	S62	influenza A PA peptidasa (influenza A virus)
Clan de las treonin peptidasas		
unassigned	T8	HopB1 g.p. (<i>Pseudomonas syringae</i>)

Se define como degradoma (DG) al conjunto de proteasas y su repertorio de sustratos naturales, que se expresan en un momento o circunstancia específica en una célula (López-Otín y Overall, 2002). En tripanosomatidios el DG cumple un papel primordial en la adaptación y sobrevivencia del parásito (McKerrow y col.,

2006). Avances recientes en diferentes proyectos Genoma de *Leishmania* sp., han permitido predecir que el 2% de todos los genes expresados codifican para enzimas proteolíticas, siendo en su mayoría proteasas pertenecientes al clan de las CP (Sajid y McKerrow, 2002). Por otra parte, análisis de los EP de *L. mayor* y *L. donovani*, sugieren que del 5% al 10% de la actividad catalítica total corresponde a actividad proteolítica (Choudhury y col., 2009).

Actualmente han sido identificadas y caracterizadas varias proteasas, pertenecientes a los clanes de las cisteín, serín y metalo proteasas, en los exodegradomas (ED), proteasas y sustratos naturales presentes en el EP, de diferentes especies de *Leishmania*. Estas proteasas participan en la patogénesis, desempeñando funciones en la invasión y migración de parásitos a través de los tejidos del hospedador (McKerrow y col., 2006). Entre estas cabe destacar:

- **La metalo proteasa Leishmaniosina o GP63:** endoproteasa que comparte características con las metalo proteasas (MP) de mamíferos y es la proteína de superficie más abundante en promastigotes de *Leishmania* sp. (Yao, 2010). A esta se le adjudica un rol central en los procesos de invasión tanto en las células epiteliales del vector como en el hospedador vertebrado y evasión de la respuesta inmunológica del hospedador vertebrado (Santos y col., 2006).
- **La serín proteasa soluble y secretada de 115 kDa (pSP):** proteasa soluble de 115 kDa, también asociada con procesos de virulencia y de interacción parásito-hospedador (Choudhury y col., 2009).

- **Las cisteín proteasas:** miembros del clan de las cisteín proteasa, específicamente tipo papaína (catepsina L y B), asociada con los procesos de virulencia, invasión celular y la interacción parásito-hospedador (Braga y col., 2014).

A pesar de los avances en la caracterización del ED de promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, aún se desconoce la función de un gran grupo de proteasas, sin mencionar la escasa información sobre el ED de amastigotes. Por tal motivo, la importancia de profundizar en su estudio, específicamente en la caracterización de representantes del clan de las CP contentivas en este, las cuales han sido reportadas como las más representativas en estos parásitos (Sajid y McKerrow, 2002).

1.1.6.1 Cisteín proteasas en el exodegradoma de *Leishmania* sp.

Las CP, inicialmente conocidas como proteasas de tiol, son enzimas que se caracterizan por presentar un grupo tiol en el residuo de cisteína de su sitio activo (Barrett, 1986). Estas proteínas muestran su mayor actividad hidrolítica en un rango de pH de 4 a 6.5 y debido a la alta tendencia del grupo tiol a la oxidación, los ambientes de estas deben contener un componente reductor (Grzonka y col., 2001), propiedad que se mantiene en las CP descritas en *Leishmania* sp. (Denise y col., 2006; Robertson y Coombs, 1990). En la figura 3A, se muestra una estructura tridimensional representativa de proteasas tipo papaína, la CP mejor caracterizada (Storer y Menard, 1994). En estas, el sitio activo se ubica en la interfaz de ambos subdominios en la parte superior de la molécula en una hendidura en forma de V (señalada con una flecha en la figura 3A).

Por su parte, el mecanismo catalítico de las CP, es ligeramente diferente a la de las serín proteasas (SP), mecanismo proteolítico mejor descrito, el cual involucran una tríada catalítica (Ser-His-Asp) en su sitio activo (Novinec y Lenarčič, 2013). Las CP difieren de estas dado a que ha sido corroborado, mediante ensayos de mutagénesis sitio dirigida, la participación directa de solo los residuos Cys₂₅ y His₁₅₉ en la catálisis, siguiéndose así un mecanismo de catálisis tipo diada (Grzonka y col., 2001; Verma y col., 2016). Sin embargo, y a pesar de que residuos adicionales como la Asn₁₇₅ y la Gln₁₉ (figura 3B), son necesarios para el posicionamiento adecuado de la diada, estos no son esenciales para la catálisis (Novinec y Lenarčič, 2013). La hidrólisis del enlace peptídico, por parte de la CP se da en dos pasos e involucra la formación de un intermediario tetraédrico de Tiolato-Imidazol (S-/H+Im) (figura 3C). Este intermediario se forma mediante el ataque nucleofílico del grupo tiolato del residuo de Cys₂₅ sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico hidrolizado induciendo así la liberación del extremo C-terminal del sustrato (figura 3D). En el siguiente paso, una molécula de agua reacciona con el intermediario, liberándose el extremo N-terminal, quedando la CP libre para comenzar un nuevo ciclo catalítico (Storer y Menard, 1994). El bolsillo de unión del sustrato de las CP, acomoda al menos 7 residuos en subsitios apropiados, donde el ambiente hidrofóbico de las posiciones S1 y S2 (dependiendo si pertenece a la familia de las caspasas o la papaína) es esencial para la incorporación del sustrato (figura 3E) (Stennicke y Salvesen, 1999).

Las CP identificadas en *Leishmania* sp., presentan un mecanismo catalítico similar al reportado para miembros de este clan en eucariotas superiores (Hughes, 1994). Entre estas enzimas se destacan: La CPA, CPB, y CPC, todas

pertenecientes al clan CA, familia C1, y con pesos moleculares aproximados a los 30 kDa (Mottram y col., 2004; Robertson y Coombs, 1990). Por su parte, CPA y CPB son tipo catepsina L, mientras que la CPC es tipo catepsina B (Alexander y col., 1998). Las CP tipo catepsina o proteasas lisosomales, son las más representativas de este clan, al igual que las demás CP descritas, requieren de un medio reductor, y un medio ligeramente ácido, como el de los lisosomas, para su actividad óptima. Estas fueron consideradas inicialmente como enzimas intracelulares, responsables de la proteólisis masiva e inespecífica en el compartimento endosomal/lisosomal, participando en la degradación de proteínas intra y extracelulares (Sajid y McKerrow, 2002). Las catepsinas tipo B y L presentan diferencias estructurales asociadas con sus especificidades de sustratos y mecanismos proteolíticos, y de secuencia (Siqueira-Neto y col., 2018; Sajid y McKerrow, 2002). En la catepsina L, la unión de los sustratos peptídicos abarca todo el canal entre los dos dominios de la proteína, lo que conduce a la actividad endopeptidasa. En contraste, la catepsina B presenta un circuito de oclusión adicional que restringe la unión del sustrato a pH bajo, lo que conduce a la actividad carboxipeptidasa; este bucle se desplaza a un pH alto, momento en el que la catepsina B muestra actividad endopeptidasa (Siqueira-Neto y col., 2018). En *L. mexicana*, la CPA y CPB juegan un papel importante en la autofagia y en la diferenciación del parásito a promastigotes metacíclicos infectivos (Williams y col., 2006), mientras que la CPC posee actividad inmunoreguladora. Adicionalmente, CPA participa en la interacción parásito-hospedador y CPB modula las respuestas del hospedador regulando negativamente la producción de Interleucina 12 (IL-12) y por lo tanto altera la señalización de los macrófagos (Cameron y col., 2004). Por

otra parte, también ha sido evidenciada la expresión diferencial de estas enzimas en los diferentes morfotipos del parásito, observándose una mayor actividad en su forma amastigote, sugiriendo con ello su importancia en la supervivencia del parásito en el hospedador mamífero (Coombs, 1982; Myburgh y col., 2013).

La caracterización de las CP identificadas en los ED de promastigotes y amastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, denotan su importancia con base en: su expresión constitutiva (Sajid y McKerrow, 2002), su participación activa en el proceso de infección de diferentes células hospederas (Mottram y col., 1998; Mottram y col., 2004) y su papel en la modulación de las respuestas inmunitarias del hospedador, entre otras (Grzonka y col., 2001). Estas evidencias proponen a las CP, constitutivas del ED, como potenciales blancos proteicos dirigidos al diseño de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis y/o diagnóstico efectivo del parásito.

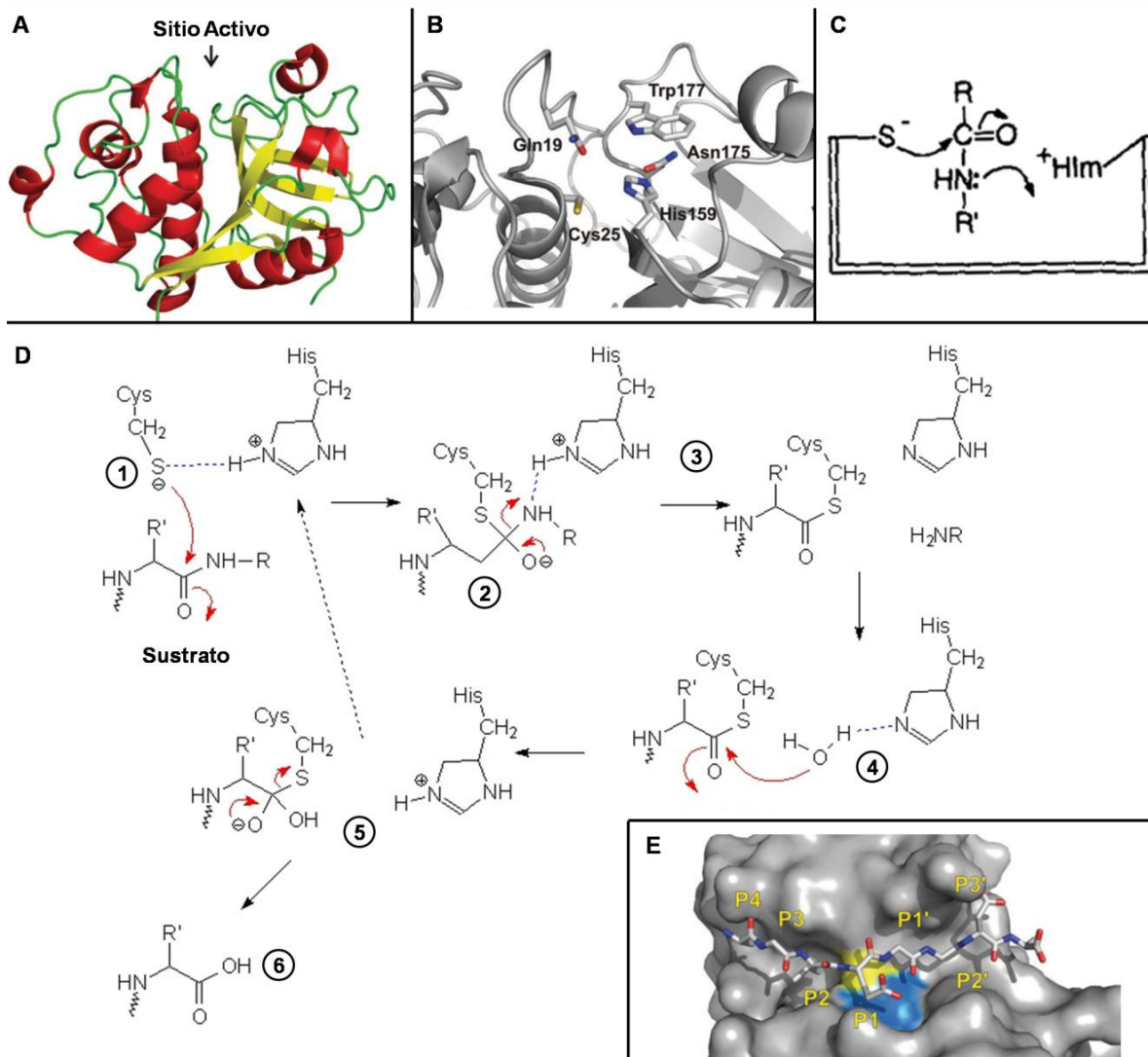


Figura 3. Mecanismo de acción de las cisteín proteasas. **A)** Estructura tridimensional de la papaína (sitio catalítico). **B)** Residuos involucrados en el mecanismo catalítico. **C)** Intermediario tiolato-imidazol. **D)** Mecanismo catalítico de la papaína. Ataque nucleofílico del grupo tiol de la Cys sobre el grupo carbonilo del péptido a ser hidrolizado, liberándose el primer fragmento del péptido escindido (1) y formándose el intermediario tetraédrico (2). La His interacciona con un grupo amino del sustrato y ocurre la liberación del extremo N-terminal (3) y la hidrólisis de la molécula de H₂O (4). El intermediario acilado (acil-enzima) reacciona con el grupo OH (5) liberándose el segundo fragmento escindido del sustrato y se regenera nuevamente la enzima (6). **E)** Complejo enzima-sustrato de la papaína con un hexapéptido (subsitos del sustrato). Tomado y modificado de: Schechter y Berger, 1967; Storer y Menard, 1994; Grzonka y col., 2001; Verma y col., 2016.

2. Antecedentes

Análisis por espectrometría de masa de los EP de diferentes especies de *Leishmania*, han permitido identificar representantes de diferentes clanes de proteasas, entre las que cabe destacar: la Gp63 (Braga y col., 2014; Santarém y col., 2013), la CPA (Santarém y col., 2013), la CPB (Hassani y col., 2011), la CPC (Braga y col., 2014), CP tipo caspasa (Hassani y col., 2011), serín proteasa 115 kDa (Choudhury y col., 2009), CP tipo calpaína (Braga y col., 2014) y la adenosilhomocisteína hidrolasa (Santarém y col., 2013), entre otras. Dichas proteasas están directamente asociadas con el establecimiento de la infección y el mantenimiento del parásito en la célula hospedera (Siqueira-Neto y col., 2018).

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Laboratorio de Fisiología de Membranas – IBE) han permitido evidenciar, mediante la degradación de gelatina en geles de actividad, que los ED de promastigotes y amastigotes *L. braziliensis* y *L. mexicana* (BEL21) presentan mayoritariamente actividad proteolítica del tipo MP y CP, observándose en ambos casos, mayor actividad de hidrólisis a pH 5 (Pérez–Gordones y col., 2012; Pérez–Gordones y col., 2014). Cabe destacar, que promastigotes y amastigotes, de ambas especies, presentaron patrones de degradación de gelatina disímiles entre sí, sugiriendo con ello, un ED diferencial tanto a nivel de morfotipos como de especies (Pérez–Gordones y col., 2012; Pérez–Gordones y col., 2014).

Por otra parte, el análisis del EP de promastigotes de *L. mexicana*, por espectrometría de masa, permitió establecer que el 12% de las proteínas totales, corresponden a enzimas proteolíticas, corroborándose nuevamente una mayor representación por parte de los clanes de las MP y CP (figura 4) (Pérez–Gordones

y col., 2016). Dentro de las proteasas identificadas, el 60% arrojaron función biológica desconocida cuando fueron analizadas con el programa “Gene Ontology Consortium/ PANTHER”, indicando la poca información existente sobre el DG y ED de las diferentes especies de *Leishmania*. Sin embargo, y a pesar de desconocerse el papel biológico de estas, análisis *in silico*, evidenciaron su potencialidad como blancos quimioterapéuticos y/o diagnósticos, dado que sus características topológicas y estructurales sugieren alta probabilidad antigénica, además, de presentar un bajo porcentaje de homología con proteínas humanas (Tavares y col., 2018).

La participación de miembros del clan de las CP en los procesos de infección, evasión de la respuesta inmune del hospedador mamífero, mantenimiento del parásito, su expresión constitutiva, entre otras, las propone como potenciales blancos proteicos para el desarrollo de nuevos fármacos y/o métodos diagnósticos contra las diferentes especies de *Leishmania*. Por tal motivo, la identificación, caracterización y comparación de CP presentes en el ED de los diferentes morfotipos de *L. mexicana*, propósito central de este trabajo, sería una contribución importante para comprender las diferentes estrategias que el parásito emplea tanto en el proceso de infección, como en su sobrevivencia.

Nombre	Familia	PM kDa	Función molecular (GO)	ID <i>L. mexicana</i>
Oligopeptidasa b	Serin peptidasa, clan SC, familia S9A	83.4	•Serin peptidasa	GI:401416529
Cistein peptidasa B	Cistein peptidasa B, tipo cathepsina, familia C1	47.7	•Cistein peptidasa •Primordialmente expresada en amastigotes	GI:1730100
4-methyl-5(beta-hidroxietil)-tiazole monofosfato	Cistein peptidasa	20.5	•Cistein peptidasa •Factor de transcripción •Péptido de unión al DNA y RNA	GI:401425479
Cistein peptidasa tipo calpaina putativa	Cistein peptidasa, clan CA, familia C2	48.8	•Cistein peptidasa •Péptido de unión a Ca ²⁺ •Péptido de interacción con calmodulina y con fosfolípidos dependiente de Ca ²⁺	GI:401424277
Metalo-peptidasa	Metalo-peptidasa, clan MA(E), familia M1	96.3	•Metalo peptidasa	GI:401415676
GP63, Leishmanolisina	Leishmanolisina	69.5 63.6	•Metalo peptidasa	GI:401416776 GI:401416778
N-acil-L-aminohidrolasa putativa	N-acil-L-amino amidohidrolasa Putativa	43.7	•Metalo peptidasa •Actividad deacetilasa	GI:401426292
Peptidil dipeptidasa putativa	Metalo-peptidasa, clan MA(E), familia M3	76.4	•Metalo peptidasa	GI:401414348
Dipeptidil-peptidasa III	Metalo-peptidasa, clan M-, familia M49	75.6	•Metalo peptidasa	GI:401414979
Oligopeptidasa putativa	Metalo-peptidasa, clan MA(E), familia M3	76.9	•Metalo peptidasa	GI:401423944

Figura 4. Proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana* identificadas por análisis de espectrometría de masa. La clasificación de las familias de proteasas identificadas por espectrometría de masas fue realizada utilizando el programa “Gene Ontology Consortium/ PANTHER”. Tomado de: Pérez–Gordones y col., 2016.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad cisteín proteasa en el exodegradoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* y su relación con la virulencia del parásito.

3.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar las condiciones óptimas para la obtención y evaluación de las actividades proteolíticas de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa BEL21).
2. Identificar y caracterizar parcialmente la actividad cisteín proteasa en el exodegradoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*.
3. Relacionar la presencia de actividad cisteín proteasa en el exodegradoma de promastigotes de *Leishmania mexicana* con la virulencia del parásito.

4. Materiales y Métodos

4.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos con el mayor grado de pureza posible.

- Los cebadores complejo específicos para *Leishmania* sp. (M1 y M2) fueron donados por la Dra. Noris Rodríguez del Laboratorio de Ingeniería Genética del Instituto de Biomedicina-UCV.
- El E64 fue donado por el Dr. José Bubis del Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Simón Bolívar.
- El colorante azul de Coomassie G-250 fue donado por el Dr. Wilmer Tezara del Laboratorio de Ecología de Xerófitas del IBE-UCV.
- El Tritón X100 fue donado por el MSc. Christian Calderón del Laboratorio Fisiología y Biofísica del IBE-UCV.
- El formaldehído fue donado por el Lic. José Mejía del Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular Aplicada IBE-UCV.
- EL DPX (solución de montaje) y el colorante Giemsa fue donado por la Dra. Cristina Sanoja del Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia del IBE-UCV.

4.2. Metodología utilizada para la estandarización de la obtención y evaluación de las actividades proteolíticas de los exoproteomas

4.2.1. Parásitos

En este trabajo se utilizó como material biológico la cepa de referencia internacional MHOM/BZ/1982/BEL21, correspondiente a *Leishmania mexicana*. La

cepa fue donada por la Dra. Zelandia Fermín del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Biomedicina-UCV.

4.2.2. Cultivos axénicos de *Leishmania mexicana*

La cepa MHOM/BZ/1982/BEL21 fue expandida en modelos murinos, siguiendo la metodología descrita por Payares, 1981 con modificaciones. Brevemente: hámsters juveniles (línea genética Golden) procedentes del Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), UCV, fueron inoculados en la almohadilla plantar de la extremidad posterior derecha con promastigotes de *L. mexicana* resuspendidos en 50 μ L de solución amortiguadora fosfato salino 1X (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 2 mM KH₂PO₄) a pH 7.4 a razón de 1×10^8 p/mL. Los animales infectados fueron monitoreados semanalmente hasta la visualización de lesiones. Posteriormente, los amastigotes, recuperados de lesiones (aproximadamente 30 días post-inoculación), fueron incubados para su transformación a promastigotes en medio LIT (Liver Infusion Tryptose; 2 g/L lactoalbumina, 10 g/L triptosa, 2 g/L extracto de hígado, 5 g/L extracto de levadura 9 g/L NaCl, 0,4 g/L KCl, 7,5 g/L Na₂HPO₄ y 4 g/L glucosa) a pH 7.2 suplementado con 20% (v/v) SFB inactivado por calor (57 °C, 45 min.). Para ello, los parásitos se mantuvieron en frascos de cultivo estéril, en oscuridad, sin agitación, a temperatura ambiente 23-25°C (condiciones de trabajo establecidas) y con cambio de medio semanal, hasta su adaptación al medio de cultivo. Una vez adaptados, se procedió a disminuir a 10% (v/v) el porcentaje de SFB. Los cultivos fueron monitoreados mediante su observación interdiaria en un microscopio óptico a 400X (Marca Nikon, modelo Eclipse E4000).

Con la finalidad de garantizar que los parásitos no perdieran su capacidad infectiva, se trabajó con un número máximo de 15 repiques (número de semanas fuera del modelo murino) (Moreira y col., 2012).

4.2.3. Curvas de crecimiento de *Leishmania mexicana*

Con la finalidad de establecer el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, se realizaron curvas de crecimiento celular. Para ello, se partió de un inóculo de 2×10^6 p/mL (en fase estacionaria de crecimiento) en un volumen final de 20 mL de medio LIT a pH 7.2 suplementado con 10% (v/v) SFB. Los cultivos fueron mantenidos bajo las condiciones de trabajo establecidas (ver apartado 4.2.2.). El crecimiento de los parásitos en los cultivos fue monitoreado diariamente durante 10 días por espectrometría, midiendo a 560 nm en un espectrofotómetro (marca BAUSCH & LOMB, modelo Spectronic 20) y corroborado por conteo directo con cámara de Neubauer, empleando una solución de fijación 1:2 de formaldehído al 37% (v/v). Las gráficas de las curvas de crecimiento mostradas en este trabajo se obtuvieron a partir de la media de 3 experimentos independientes, cada uno por duplicado.

4.2.4. Transformación a amastigotes-like de *Leishmania mexicana*

Promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria, fueron transformados a amastigotes-like (AL) siguiendo la metodología descrita por Hernández-Chinea, 2007 con modificaciones. Brevemente: al cultivo en fase estacionaria se le adicionó 1 volumen de medio LIT a pH 5 suplementado con 20% (v/v) SFB, bajo una temperatura de incubación de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad, sin agitación hasta que los parásitos se transformaran (tiempo aproximado de transformación 96

horas). Este procedimiento fue monitoreado por observación diaria en un microscopio óptico Nikon (modelo Eclipse E4000) a 1000X (inmersión).

4.2.5. Determinación del porcentaje de viabilidad

La viabilidad de los cultivos de promastigotes y amastigotes-*like*, pre y post-excreción/secreción (E/S), fue monitoreada siguiendo la metodología descrita por Shapiro, 1988. Brevemente: el número de parásitos vivos se determinó realizando el conteo directo con cámara de Neubauer en presencia del colorante azoico Azul de Tripiano al 0,4% (p/v), el cual permite discriminar las células viables gracias a la exclusión del colorante. El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando la ecuación:

$$\% V = \frac{\text{número de parásitos vivos}}{\text{número de parásitos totales}} \times 100$$

4.2.6. Obtención del exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*

Para la obtención de los EP de promastigotes en fase estacionaria y amastigotes-*like*, los parásitos fueron recuperados por centrifugación a temperatura ambiente (10 min. a 2000 x g). Posteriormente fueron lavados dos veces con PBS 1X a pH 7.4 y una vez con medio RPMI a pH 7 a temperatura ambiente, con el propósito de eliminar del medio rastro del SFB, para evitar alteraciones en la composición proteica de los EP a analizar. A continuación, los parásitos fueron incubados a razón de 2×10^6 , 2×10^7 y 2×10^8 p/mL en medio RPMI 1640, bajo las condiciones de trabajo establecidas (apartado 4.2.2) para promastigotes y modificando la temperatura de incubación a $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para amastigotes por tiempos variables de 3, 6 y 24 horas. Pasado el tiempo, los

sobrenadantes fueron recuperados removiendo los parásitos por centrifugación a temperatura ambiente (10 min. a 2000 x g y 30 min. a 15.000 x g.) Los EP recuperados se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

4.2.7. Determinación de la concentración de proteínas en los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*

La concentración de proteínas presente en los EP, fue determinada siguiendo la metodología descrita por Lowry, 1951. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína patrón para la curva de calibración. La absorbancia fue determinada a 660 nm en un espectrofotómetro (UNICO 2802 UV/VIS Spectrophotometer).

4.2.8. Análisis de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli, 1970. Brevemente: concentraciones conocidas de las muestras se diluyeron en relación 4:1 con una solución desnaturalizante de carga (50 mM Tris-HCl (pH=6,8), 25% Glicerol, 2% (p/v) Dodecil sulfato sódico (SDS), 14.4 mM β -Mercaptoetanol y 0,1% (p/v) de azul de bromofenol). Posteriormente las muestras fueron desnaturalizadas en baño de María a 100°C por 5 min. y corridas a un amperaje constante de 25 mA, en geles de poliacrilamida (12% (v/v) acrilamida/bis-acrilamida, 0,4 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,06% TEMED y 0,05% $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$) en una solución de corrida (25 mM Tris-HCl (pH= 8.3), 192 mM Glicina y 0,1% SDS). Se utilizó un marcador de peso molecular de rango amplio como referencia. Para ello, se empleó una cámara Bio-rad Mini-Protean.

Cabe destacar que, en el presente trabajo, para la descripción de geles de acrilamida tipo SDS-PAGE la muestra evaluada recibió la connotación de exoproteoma (EP) dado a que en dichos geles se pueden visualizar todo péptido presente en este, cuya concentración este dentro de los límites de sensibilidad de la técnica de tinción utilizada.

4.2.8.1. Tinción de geles en condiciones disociantes con Coomassie coloidal G-250

La tinción de los geles SDS-PAGE se realizó con Coomassie coloidal G-250 (rango de sensibilidad de 8 a 50 ng), dada la baja concentración de proteínas presentes en las muestras a analizar. Para ello, los geles fueron incubados durante 3 horas o toda la noche, a temperatura ambiente, con agitación constante en una solución fijadora (30% (v/v) C_2H_5OH y 2% (v/v) H_3PO_4). Posteriormente, se le realizaron tres lavados de 30 min. con H_2O desionizada. Pasado el tiempo los geles fueron incubados 1 hora en solución de tinción (17% (p/v) $(NH_4)_2SO_4$, 2% (v/v) H_3PO_4 y 34% (v/v) CH_3OH) en agitación constante. Sobre esta solución se incorporó 0,5 g/L de azul de Coomassie G-250, incubándose por 12 horas. Los geles fueron mantenidos en H_2O desionizada hasta su registro fotográfico, el cual se llevó a cabo en un equipo Gel Doc (Fluor-S™ Multilmager, marca Biorad).

4.2.9. Determinación de la actividad proteolítica presente en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* mediante geles de actividad enzimática o zimogramas

La actividad proteolítica fue evidenciada en geles de acrilamida copolimerizados con gelatina. Para ello: concentraciones conocidas de las muestras se diluyeron en relación 4:1 con una solución de carga semi-desnaturalizante (50

mM Tris-HCl (pH=6.8), 25% Glicerol, 2% (p/v) SDS y 0,1 % (p/v) de azul de bromofenol). Las muestras fueron corridas con amperaje constante de 25 mA, en geles de poliacrilamida (12% (v/v) Acrilamida/bis-acrilamida, 0,4 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0,1% SDS, 0,06% TEMED y 0,05% PSA) copolimerizados con gelatina al 0,1% (p/v), en solución de corrida a 4°C, adicionalmente se procedió a la corrida de un marcador de peso molecular de rango amplio, como referencia. Culminada la corrida el SDS fue removido mediante lavados con solución de lavado 1 (100 mM Acetato/Tris (pH5 y/o 8) + 2,5% Tritón X-100). Posteriormente, el Tritón X-100 fue removido con lavados sucesivos de 30 min. cada uno con solución de lavado 2 (100 mM Acetato/Tris pH5 y/o 8, respectivamente). Finalmente, los geles fueron incubados en medios de reacción que favorecen la actividad de los principales clanes de proteasas y en presencia y ausencia de: 2 mM DTE, 2 mM EDTA e inhibidores comerciales de cisteín proteasas (20 µM leupeptina, 0,5 mM iodoacetamida y 10 µM E64) a 37°C durante 24 horas.

Los medios de reacción ensayados fueron:

- **Solución A:** 100 mM Acetato de sodio (pH 5) y/o Tris a (pH 8).
- **Solución B:** 100 mM Acetato de sodio (pH 5) y/o Tris a (pH 8) + 2 mM DTE.

Una vez finalizada la incubación en los diferentes medios de reacción, se realizó la tinción de los geles con Azul de Coomassie R-250. El registro fotográfico de los geles obtenidos se realizó empleando un equipo Gel Doc (Fluor-S™ Multilmager, marca Biorad).

En el presente trabajo, para todas las descripciones de geles de actividad o zimogramas, se empleó la connotación de exodegradoma (ED), dado que en dichos geles solo se pueden visualizar proteasas capaces de degradar el sustrato

universal gelatina (colágeno desnaturalizado). Es importante resaltar que las intensidades de las bandas en estos geles dependen de la activación de estas enzimas no existiendo necesariamente una relación directa entre la actividad de estas y la concentración de las mismas.

4.2.9.1. Tinción de geles de actividad con Azul de Coomassie

La tinción de los geles de actividad se realizó con solución colorante de Azul de Coomassie R-250 (1 g/L Coomassie Blue, 45% v/v CH₃OH, 9% v/v CH₃COOH; rango de sensibilidad superior a 0.1µg) por 2 horas. Posteriormente, se procedió a realizar lavados de 30 min. con solución decolorante (10% v/v CH₃OH, 10% v/v CH₃COOH) hasta la observación de bandas de degradación.

4.3. Metodologías utilizadas para evaluar la virulencia de promastigotes de

Leishmania mexicana

En el presente trabajo se estableció como promastigotes virulentos (PV) aquellos cultivos con un máximo de 15 repiques y como promastigotes naturalmente atenuados (PNA) aquellos con un número de repiques superior a 30. Se consideró un repique el inóculo de 2×10^6 p/mL en 20 mL de medio de cultivo realizado cada 7 días.

Con la finalidad de corroborar la atenuación natural de la virulencia de los parásitos con más de 30 repiques (PNA) se realizaron ensayos de infección *in vivo* mediante las siguientes metodologías.

4.3.1. Animales experimentales

Los ensayos de virulencia se realizaron en el modelo murino *Mesocritus auratus*, nombre común hámsters, fondo genético: Golden, machos, juveniles, con un peso promedio de 90-110 gramos, los cuales fueron proporcionados y

mantenidos en el Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), UCV, bajo el asesoramiento del Dr. Gilberto Payares y la Dra. Cristina Sanoja.

4.3.2. Infección de animales experimentales con promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana* (BEL21)

La virulencia de los PV y PNA fue evaluada mediante la infección de hámsters siguiendo la metodología descrita por Payares, 1981, con modificaciones. Brevemente: empleando una aguja 26g x 1" adaptada a una jeringa, se inocularon en la almohadilla plantar de la extremidad posterior derecha del animal experimental, 50 µl de cultivo de PV o PNA a razón de 1×10^8 p/mL resuspendidos en PBS 1X estéril a pH 7.4. El monitoreo de la infección se realizó a partir de la primera semana post-inoculación, cada 3 días durante 80 días. Para ello, la extremidad infectada de cada ejemplar fue medida con un vernier, registrándose adicionalmente el peso del animal. Los resultados mostrados son producto de tres ensayos independientes con sus respectivos duplicados (n=3). Transcurrido el tiempo de observación, los animales infectados y sanos fueron sacrificados por separado en cámara húmeda con cloroformo e inmediatamente se procedió a la extracción de sangre por punción cardiaca. La sangre fue trasvasada a un tubo estéril con anticoagulante para el posterior aislamiento de ADN. Simultáneamente, se llevó a cabo la disección de la extremidad posterior de estos hámsters (ver más adelante apartado 4.3.5.) con el objetivo de recuperar tejido para realizar: frotis por aposición y aislar ADN.

4.3.3. Aislamiento de ADN proveniente de sangre, tejido y cultivo axénico

ADN de sangre y tejido de los animales sanos e infectados fue aislado utilizando el estuche comercial de aislamiento de ADN genómico de Quiagen (Spin

column, DNeasy Blood & Tissue kit) y Promega (Wizard^R Genomic DNA Purification kit), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. El ADN de *L. mexicana* a partir de cultivo, fue aislado utilizando el estuche comercial de aislamiento de ADN total de Promega (Wizard^R Genomic DNA Purification kit). La integridad de los ADN aislados fue visualizada en geles de agarosa al 1% corridos en solución TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH=8.3) a 110 V, posterior a su tinción en una solución que contenía 0,5 µg/mL de Bromuro de etidio (C₂₁H₂₀BrN₃).

4.3.4. Diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de muestras provenientes de animales infectados

El ADN total aislado de muestras de sangre y tejido de animales infectados con PV y PNA, sangre y tejido de animal sano y cultivos axénicos de *L. mexicana*, fue utilizado como molde para corroborar la amplificación por PCR, con los cebadores M1/M2, de un fragmento de 800 pb exclusivo para *L. mexicana*. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl, empleando una solución Tampón 1X (Tris-HCl 250 mM [pH 9.0], NaCl 250 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1,25 U/µL Taq Polimerasa, 10 ng de ADN como templado y 10 pmol de los cebadores M1 y M2, siguiendo las condiciones de ciclado establecidas (Tabla 2) (Hernández-Montes y col., 1998). M1 y M2 (tabla 3), son cebadores complejo específicos, que amplifican una región de kADN obteniéndose un producto de 800 pb en *L. mexicana* y de 700 para *L. amazonensis* (Eresh y col., 1994). La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Biometra Personal Cycler). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) en una cámara horizontal en 1X TAE a 110V por 1 hora, al igual que el marcador

de peso molecular 1 kb y visualizados después de su incubación por 10 min. en una solución que contenía 0,5 µg/ml de C₂₁H₂₀BrN₃, en un transiluminador de luz UV. El registro fotográfico de los geles obtenidos se realizó empleando un equipo Gel Doc (Fluor-S™ Multimager marca Biorad).

Tabla 2. Condiciones de ciclaje para la amplificación de ADN de *Leishmania mexicana* con los cebadores M1/M2 (Hernández-Montes y col., 1998)

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	6 min.	1
Desnaturalización	93	1 min.	35
Hibridación	60	1 min.	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	5 min.	1
Mantenimiento	4	∞	

Tabla 3. Secuencia de cebadores complejo específicos M1/M2 (Eresh y col., 1994)

Nombre	Secuencia
M1	3'-GAGGCCCGAGCTTTGACC-5'
M2	5'-GGTGTAATAAGGGGCGGATGCTCTG-3'

4.3.5. Diagnóstico parasitológico de animales infectados: frotis por aposición de extremidad infectada

Una vez transcurrido el tiempo de registro de la infección, se procedió a realizar la disección de la extremidad infectada (extremidad posterior derecha) en la campana de cultivo, en condiciones estériles. La misma se cortó, bañó con etanol 70% y se colocó en una cápsula de Petri que contenía solución salina al 0,85% p/v estéril a temperatura ambiente, se limpió el área de pelos y uñas y se procedió a exponer el interior de la lesión. Inmediatamente se realizó la impresión sobre un portaobjetos limpio, se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió

a teñir con el colorante Giemsa (marca comercial Riedel-DeHaëin) siguiendo el protocolo de rutina (Sagasti, 2017). Brevemente: una vez secas las muestras, fueron fijadas con metanol al 100% v/v y coloreadas durante 25 min. utilizando una dilución 1:20 de la solución de Giemsa en agua destilada. Posteriormente, fueron lavados con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Culminado el proceso de tinción, se realizó el montaje con DPX (marca comercial Riedel-DeHaëin), para realizar el registro fotográfico a 1000x.

4.3.6. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados bajo la asesoría del Dr. Ernesto González, con ayuda del programa STATISTICA, versión 10 (StatSoft), realizándose una prueba de homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) y un Anova anidado para el análisis de los datos obtenidos en la estandarización de las condiciones óptimas para la recuperación de los EP y pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) para el análisis de la infección de animales experimentales. Para todos los casos se utilizó un $p \leq 0,05$. Las gráficas mostradas en el presente trabajo fueron realizadas mediante el uso del graficador y analizador de datos Origin.

5. Resultados

5.1 Estandarización de las condiciones óptimas para la obtención y evaluación de las actividades proteolíticas de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*

Con la finalidad de evaluar el tiempo necesario para que los cultivos de *L. mexicana* alcanzasen fase estacionaria, se procedió a la realización de curvas de crecimiento de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21). En este sentido, se iniciaron los cultivos axénicos con un inóculo de 2×10^6 p/mL en un volumen final de 20 mL de medio LIT suplementado con 10% (v/v) SFB. En la figura 5, se puede evidenciar una curva de crecimiento típica, presentando una fase exponencial entre las 48 y 120 horas post-inóculo, una fase estacionaria entre las 120 y 168 horas y el inicio de la fase de muerte a partir de las 192 horas. Este resultado, permitió establecer el 6^{to} día (144 horas) como punto de partida para el inicio de la E/S de los promastigotes y para iniciar la transformación *in vitro* de promastigotes a amastigotes.

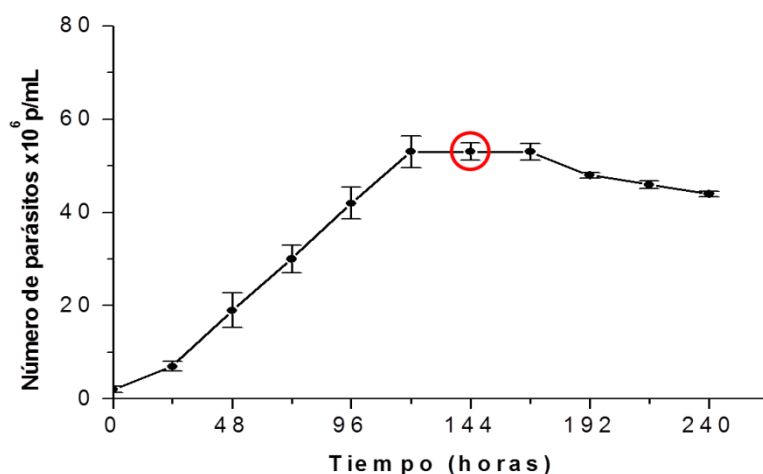


Figura 5. Curva de crecimiento de promastigotes axénicos de *Leishmania mexicana*. En la gráfica se representa el número de parásitos $\times 10^6$ p/mL en función del tiempo (horas). Los parásitos fueron cultivados en medio LIT suplementado con 10% (v/v) SFB. Esta gráfica representa la media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado. El círculo rojo indica el día definido para dar inicio a la obtención de los productos E/S e inducir la transformación *in vitro* a amastigotes-like.

Determinado el tiempo necesario para alcanzar fase estacionaria, se procedió a la estandarización de las condiciones óptimas para la obtención y evaluación de los EP. Para ello, y garantizando una viabilidad pre y post E/S superior al 95 %, se procedió a evaluar títulos variables de parásitos (2×10^6 , 2×10^7 y 2×10^8 p/mL) frente al factor tiempo de E/S (3, 6 y 24 horas), con la finalidad de obtener concentraciones de proteínas apropiadas para ser visualizadas con las técnicas electroforéticas empleadas en este trabajo.

Los resultados mostrados (tabla 4) evidenciaron un incremento de la concentración de las proteínas totales presentes en los EP a medida que aumenta el título y el tiempo de E/S, siendo este mayor al inocular con un título de 2×10^8 p/mL y un tiempo de E/S de 24 horas. Por otra parte, en todas las condiciones ensayadas la viabilidad de los cultivos permaneció por encima del 95%, reportándose el menor valor para la condición 2×10^8 p/mL / 24 horas de E/S. Sin embargo, a pesar de presentarse un 96% de viabilidad, está aún se mantiene dentro del rango de viabilidad establecido (Rashidi y col., 2018) y se compensa la disminución con la obtención de una concentración de proteína mayor ($0,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Tabla 4).

Tabla 4. Determinación de los parámetros óptimos título de parásitos y tiempo de excreción/secreción para la obtención del exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Morfotipo	[parásitos] (p/mL)	Tiempo de E/S (horas)	Viabilidad (%)	[proteínas] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Promastigotes	2×10^6	3	100	0,1
		6	100	0,22
		24	100	0,35*
	2×10^7	3	100	0,15
		6	100	0,29
		24	99	0,44*
	2×10^8	3	100	0,21
		6	99	0,38
		24	96	0,6*

Los valores mostrados son el resultado de la media obtenida de al menos tres experimentos independientes con duplicados. Los asteriscos indican que los resultados son significativamente diferentes entre sí, obteniéndose un F de 18.493 y un $p < 0.05$, tras la realización de una prueba de ANOVA anidado.

La figura 6A corrobora los resultados mostrados en la tabla 4. Se puede observar que al analizar un volumen fijo (10 μL) de los EP obtenidos a partir de un título de 2×10^8 p/mL con tiempos variables (3 a 24 horas) de E/S hay un incremento progresivo del número de bandas observadas. En esta figura se observa 2 bandas en el EP recuperado tras 3 horas de E/S y 12 bandas en el EP recuperado tras 24 horas E/S. Los valores de concentración de proteínas encontrados (tabla 4), fueron analizados mediante una prueba estadística de homogeneidad de varianza (Prueba de Levene). Determinándose que la data no presentaba homogeneidad de varianza. Posteriormente se aplicó un test de ANOVA anidado, el cual sobre un nivel de significancia menor a 0.05, indicó que existían valores significativamente distintos entre sí, sugiriendo los parámetros título de parásitos, 2×10^8 p/mL y tiempo de E/S, 24 horas, como la condición más significativa (figura 6B).

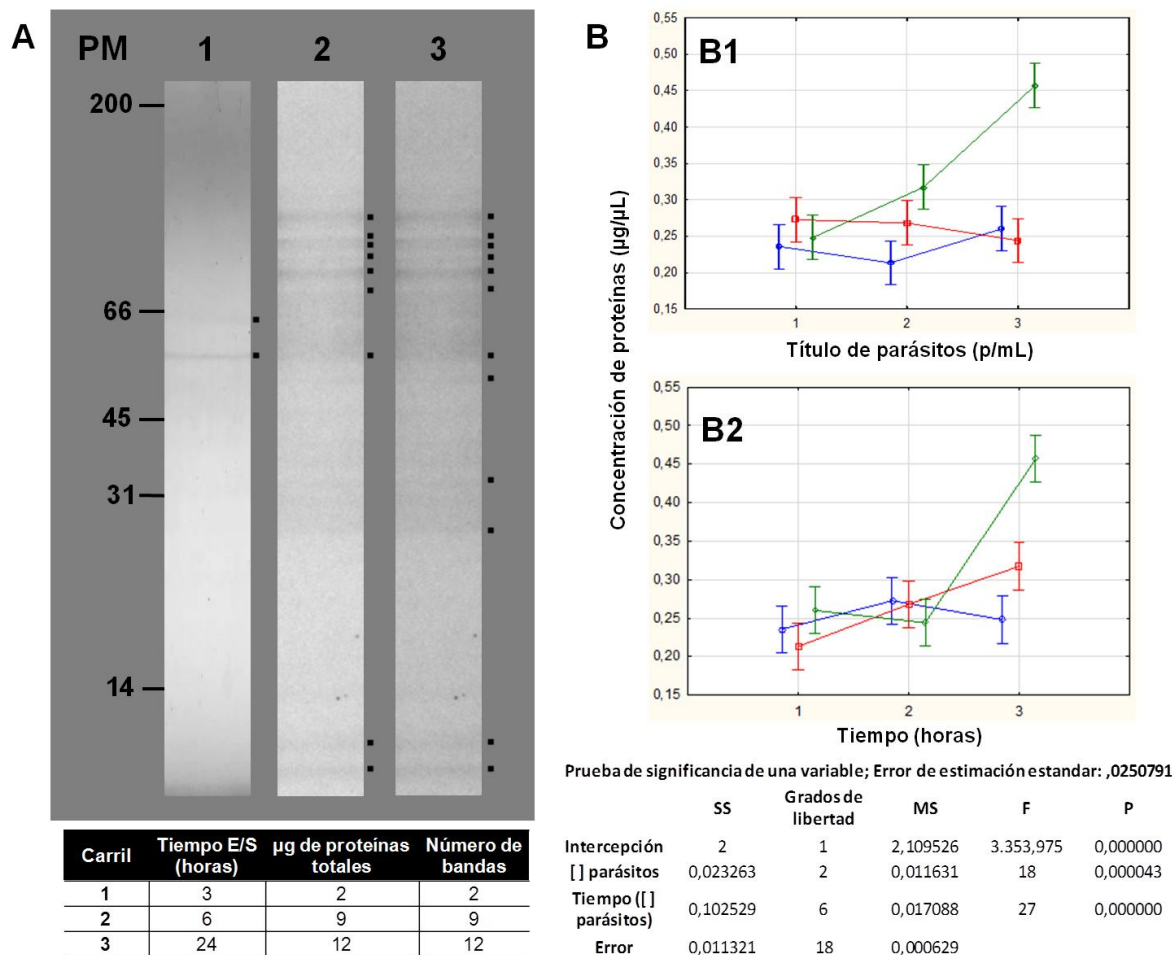


Figura 6. Estandarización del título y tiempo de excreción/secreción de promastigotes de *Leishmania mexicana*. **A)** Efecto del tiempo de E/S sobre la concentración de proteínas en el EP de *L. mexicana*. Gel de acrilamida en condiciones disociantes al 12% (v/v). Carriles: 3 horas de E/S (1); 6 horas de E/S (2); 24 horas de E/S (3). En las tres condiciones ensayadas se mantuvo fijo tanto el título de parásitos (2×10^8 p/mL) como el volumen cargado 10 µL. Cada muestra cargada presentó una concentración final de 2, 9 y 12 µg/µL, respectivamente. Tinción con Coomassie coloidal. La tabla ubicada en la parte inferior del gel resume el número de bandas observadas por carril. Los (.) indican bandas proteicas observadas. **B)** Estadística aplicada a datos de estandarización, ANOVA anidado. Gráfica obtenida por el programa STATISTICA, versión 10 (StatSoft). **B1:** los colores de los trazos indican azul 3 horas, rojo 6 horas y verde 24 horas. **B2:** los colores de los trazos indican azul 2×10^6 p/mL, rojo 2×10^7 p/mL horas y verde 2×10^8 p/mL. $F=18.493$, $p=0.00004$.

Establecidos los parámetros, título de parásitos y tiempo de E/S, se procedió a determinar los µg de proteínas totales apropiadas para realizar los análisis electroforéticos bajo condiciones disociantes (SDS-PAGE) y geles de actividad respectivamente. En la figura 7A, se observa un aumento significativo del número de bandas y en la definición de estas, al incrementar de 5 a 20 µg las proteínas

totales. Distinguiéndose con 20 µg, 21 bandas definidas. Con base en este resultado, se estableció 20 µg como la cantidad de proteínas totales a utilizar en ensayos posteriores.

Posteriormente, se procedió a establecer si los 20 µg de proteínas óptimas para visualizar bandas en geles SDS-PAGE permitirían, igualmente, la visualización de bandas de actividad definidas. Adicionalmente y con el propósito de establecer las condiciones óptimas para el desarrollo de la actividad proteolítica CP, se procedió a evaluar, paralelamente, el pH y la composición del medio de reacción más favorable para el desarrollo de la actividad del clan CA de proteasas. En la figura 7B, se observa que 20 µg de proteínas permitieron la obtención de un patrón de degradación de gelatina con bandas claramente definidas tanto en el ED de promastigotes como en el de amastigotes. Específicamente se denota la presencia de 7 y 8 bandas de actividad en los dos medios de reacción ensayados A y B, respectivamente, a pH 5. Así mismo, se observan 4 bandas en el medio de reacción A y 5 bandas en el medio de reacción B a pH 8 para el ED de promastigotes. En el ED de amastigotes se observaron 5 bandas en el medio de reacción A y 8 bandas en el medio de reacción B a pH 5. Dichos resultados permitieron definir que hay una mayor actividad proteolítica (mayor número de bandas y mayor intensidad de los patrones de degradación) a pH 5, en el medio de reacción B (medio contentivo de poder reductor, 2 mM DTE).

Adicionalmente, en la figura 7B, se señalan con una x, las bandas que se activaron únicamente en presencia de poder reductor, 2 bandas en el caso del ED de promastigotes y 4 en el de amastigotes (figura 7B, carriles 2 y 4 y 6), sugiriéndose estas como posibles bandas de actividad tipo CP.

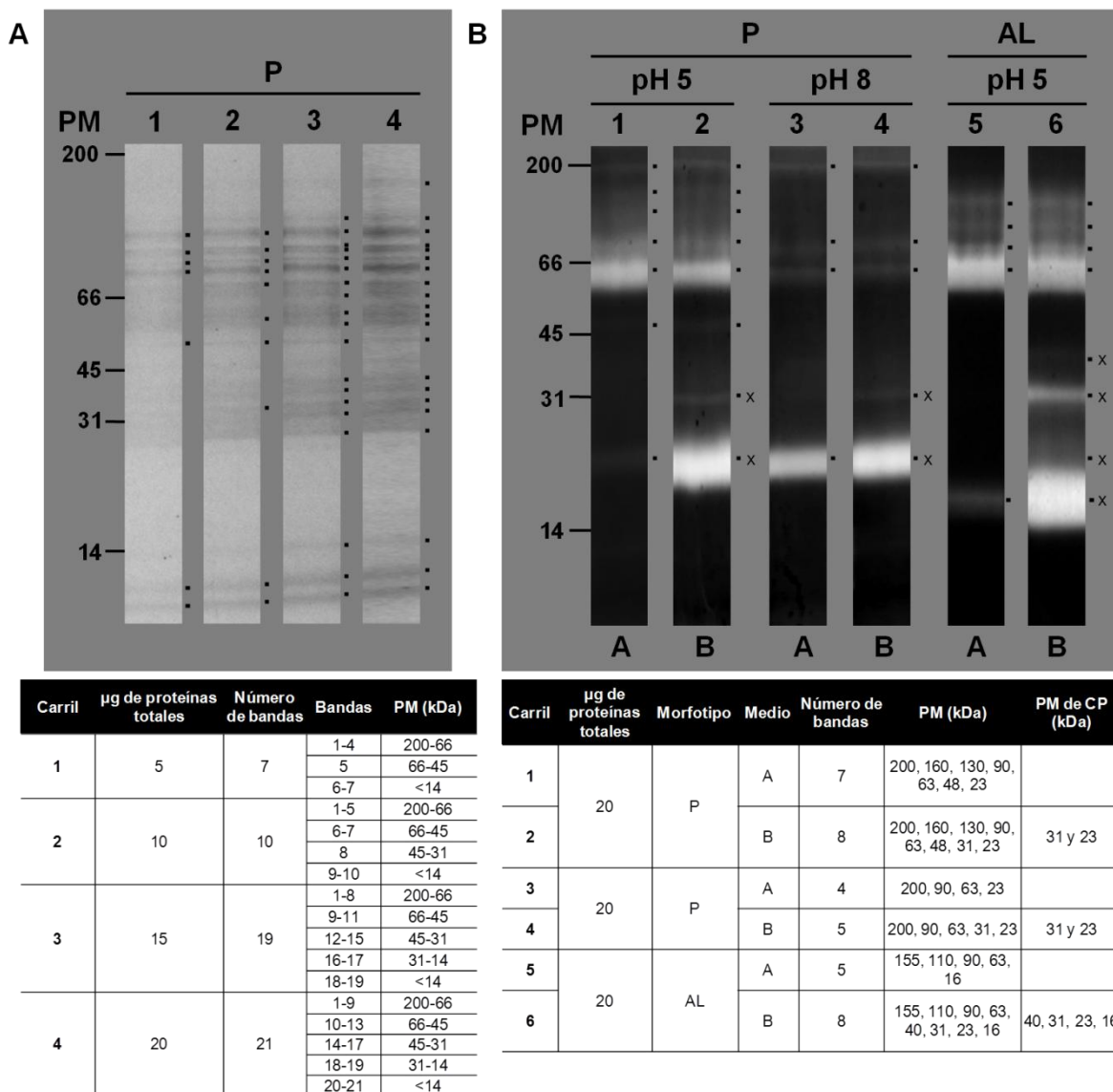


Figura 7. Determinación de condiciones óptimas para la evaluación de la actividad cisteín proteasa de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*. A) Determinación de los µg de proteínas E/S óptima para la evaluación de los EP de promastigotes de *L. mexicana* mediante técnicas electroforéticas. Gel de acrilamida en condiciones disociantes al 12% (v/v). Carriles: 5 µg (1), 10 µg (2), 15 µg (3) y 20 µg (4) de muestra cargadas. Tinción con Coomassie coloidal. **B)** Efecto del pH y del medio de reacción sobre la actividad proteolítica del ED de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* en presencia de 20 µg de proteína total. Zimograma, gel de acrilamida al 12% (v/v) copolimerizado con gelatina al 0,1% (p/v). Actividad desarrollada a pH 5 y pH 8. Medios de reacción: solución amortiguadora de acetato de sodio o Tris 0,1 M (A), y solución amortiguadora de acetato de sodio o Tris 0,1 M + Agente reductor DTE 2 mM (B). 24 horas de incubación a 37 °C. Geles teñidos con Azul de Coomassie. Las tablas ubicadas en la parte inferior de los geles resumen el número de bandas proteicas y de actividad observadas respectivamente. Los (.) indican bandas proteicas y de actividad proteolítica observadas. Las (x) indican bandas de actividad dependientes de poder reductor. Las tablas indican el número de bandas visualizadas por carril y el PM aparente de cada una.

Los resultados obtenidos en esta primera parte, permitieron definir los parámetros óptimos, bajo las condiciones de estudio establecidas, para la obtención y evaluación de la actividad proteolítica tipo CP de los EP. Estos parámetros se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros óptimos para la obtención y evaluación de los exoproteomas de *Leishmania mexicana*

Título de parásitos	Tiempo de E/S	Proteínas a utilizar	pH del medio de reacción	Medio de reacción
2x10 ⁸ p/mL	24 horas	20 µg	5	B

5.2 Identificación y caracterización parcial de la actividad cisteín proteasa presente en los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*

Una vez definidos los parámetros óptimos para la obtención y evaluación de los EP, se procedió a comparar los patrones proteicos de los EP de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*. Observándose, en la figura 8, un patrón diferencial entre estos, señalándose con un asterisco (*) las bandas únicas o exclusivas de cada EP. Como se reportó previamente, 20 µg de proteínas permitieron definir 21 bandas en el EP de promastigotes, mientras que, bajo las mismas condiciones, se observaron 18 bandas en el EP de amastigotes. De las 21 bandas señaladas en el EP de promastigotes, 11 parecen coincidir con el patrón de bandas mostrado para el EP de amastigotes, mientras que las 10 bandas restantes de peso molecular aparente de 180, 130, 120, 100, 60, 58, 55, 14, 10 y 8 kDa, señaladas con un asterisco (*) en la figura 8, no parecen estar presentes en el EP de amastigotes. Por su parte, 7 bandas de peso molecular de 122, 102, 62, 59, 56, 54, y 31 kDa, señaladas con un asterisco (*), se sugieren exclusivas del EP de amastigotes.

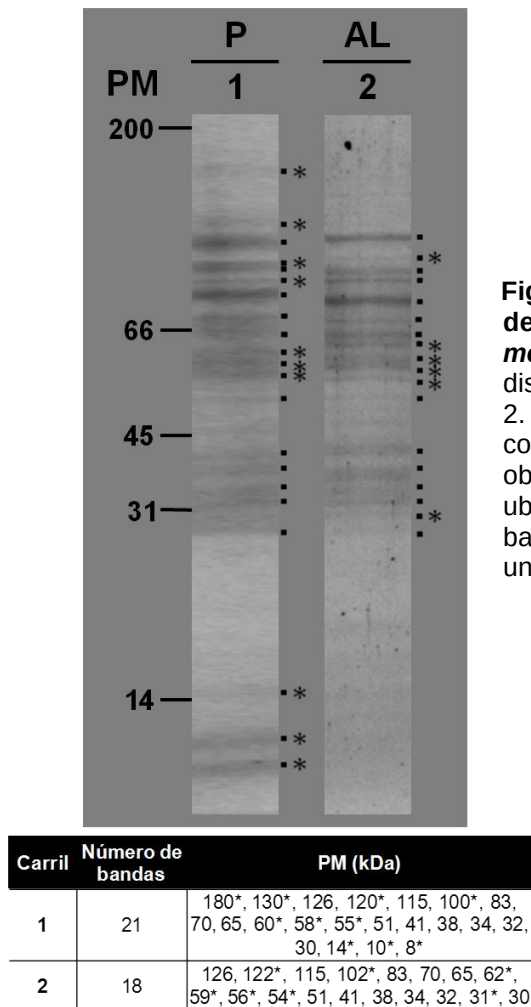


Figura 8. Estudio comparativo de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*. Gel de acrilamida en condiciones disociantes al 12% (v/v). Carriles: 1. Promastigotes (P); 2. Amastigotes-like (AL). Tinción con Coomassie coloidal. 20 µg proteínas totales. Los (.) indican bandas observadas. Los (*) indican bandas únicas. La tabla ubicada en la parte inferior del gel resume el número de bandas observadas por carril y el PM aparente de cada una.

Una vez analizado el patrón obtenido en los EP, se procedió a comparar las actividades proteolíticas desarrolladas en el medio de reacción B a pH 5 en los ED de promastigotes y de amastigotes, estos resultados permitieron distinguir un patrón de degradación diferencial entre ambos morfotipos (figura 9). Se observaron 8 bandas de actividad en ambos ED con pesos moleculares disímiles entre sí. Dichas bandas únicas en cada ED fueron señaladas con un asterisco (*) de pesos moleculares aparentes iguales a 200, 160, 130 y 48 kDa en promastigotes y 155, 110, 40 y 16 kDa en amastigotes. Adicionalmente fueron señaladas con una equis (x) las bandas que se observaron solo en presencia de

poder reductor con pesos moleculares aparente igual a 31 y 23 kDa en el ED de promastigotes y 40, 31, 23 y 16 kDa en el de amastigotes.

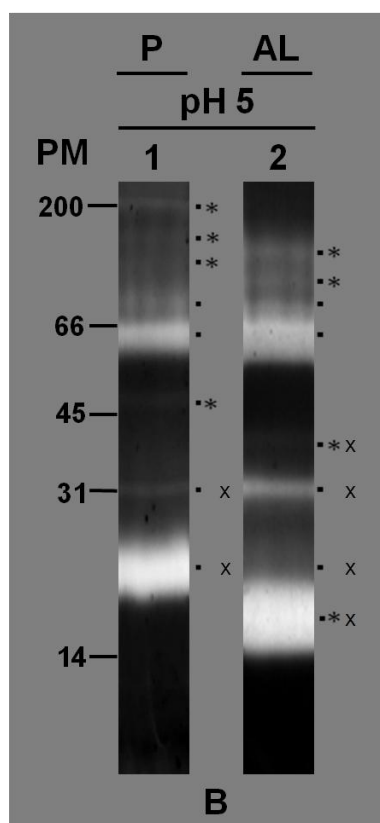


Figura 9. Estudio comparativo de la actividad proteolítica de los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*. Comparación de los exodegradomas de promastigotes y amastigotes en medio B pH 5. Carriles: 1. Promastigotes (P); 2. Amastigotes-like (AL). Zimograma, gel de acrilamida al 12% (v/v) copolimerizado con gelatina al 0,1% (p/v). Medio de reacción: 0,1 M acetato de sodio pH 5 + 2 mM DTE (B). 24 horas de incubación a 37 °C. Geles teñidos con Azul de Coomassie R-250. 20 µg de proteínas totales cargados por carril. Los (.) indican bandas observadas. Los (*) indican bandas únicas. Las (x) indican bandas de actividad dependientes de poder reductor. La tabla ubicada en la parte inferior del gel resume el número de bandas de actividad por carril y presenta los pesos moleculares aparentes de las bandas de actividad observadas y de las dependientes de poder reductor.

Carril	Número de bandas	PM (kDa)	PM de CP (kDa)
1	8	200, 160, 130, 90, 63, 48, 31, 23	31 y 23
2	8	155, 110, 90, 63, 40, 31, 23, 16	40, 31, 23, 16

Con la finalidad de profundizar en la identificación de la actividad tipo CP presente en los ED de ambos morfotipos y de compararlas entre sí, se procedió a estudiar el efecto del quelante de cationes divalente (EDTA) y de los inhibidores comerciales de CP leupeptina, iodoacetamida y E64, sobre la actividad proteolítica. En la figura 10, se puede observar que en presencia de EDTA, la actividad proteolítica total de ambos ED disminuye significativamente. Específicamente, 4 bandas en el ED de promastigotes y 7 bandas en el ED de

amastigotes, señaladas con un triángulo (Δ), disminuyen significativamente sus actividades. Cabe destacar, el aumento de la actividad de 1 banda de 10 kDa en el ED de promastigotes en presencia de EDTA, señalada con una flecha.

Con respecto al efecto de los inhibidores leupeptina, iodoacetamida y E64 sobre las actividades proteolíticas, estos fueron capaces de inhibir completamente la actividad remanente tras el efecto del EDTA en el ED de promastigotes y solo inhibieron parcialmente la actividad presente en el ED de amastigotes. Observándose, en este último, únicamente la inhibición de 4 de las 8 bandas remanentes tras el efecto del EDTA (figura 10, carriles 8, 9 y 10), de las cuales 2 fueron inhibidas totalmente ($\blacktriangle$), mientras que las 2 bandas restantes fueron inhibidas parcialmente (Δ).

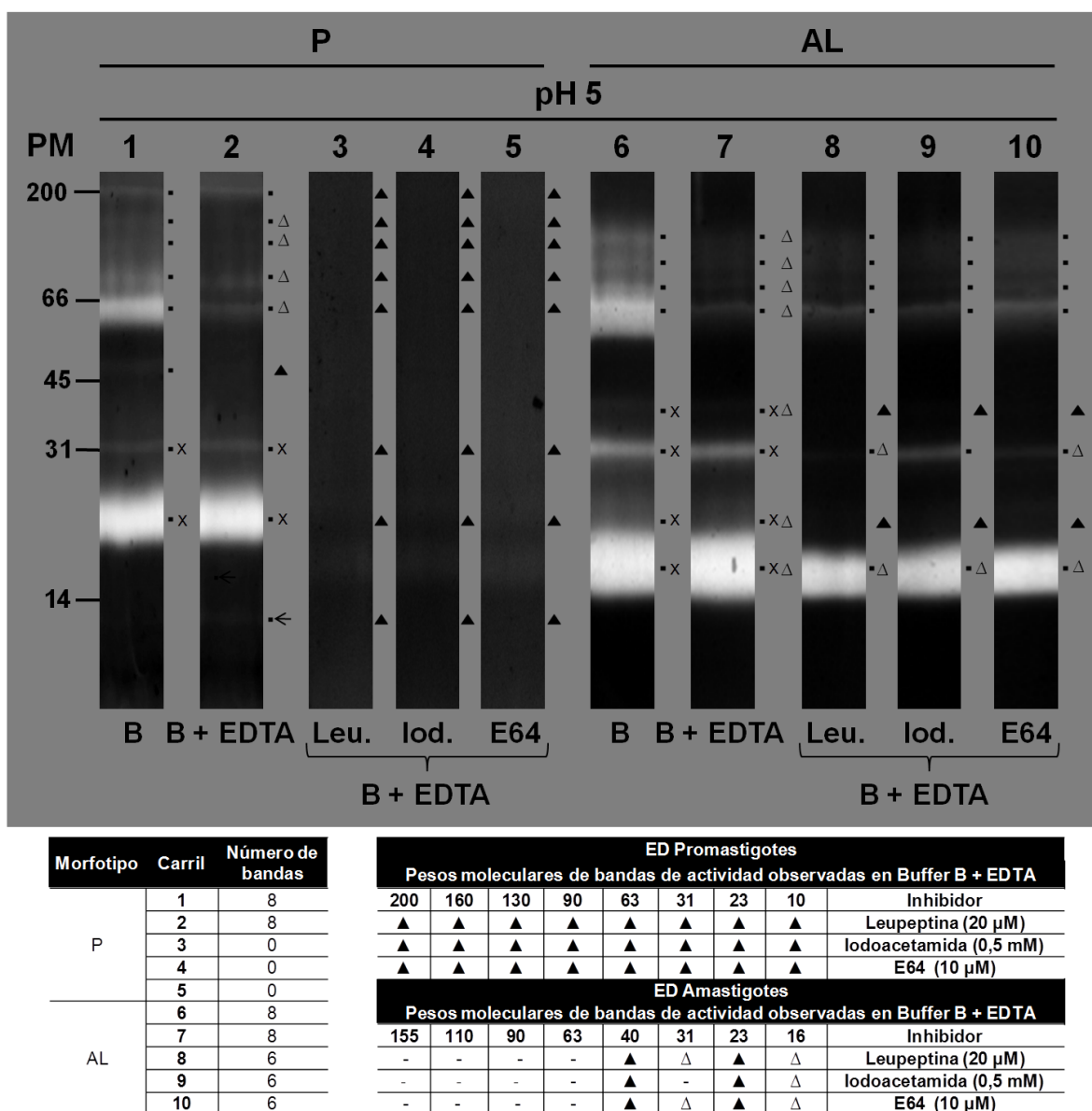


Figura 10. Efecto de inhibidores sobre la actividad cisteín proteasa en los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*. Zimograma, gel de acrilamida al 12% (v/v) copolimerizado con gelatina al 0,1% (p/v). Carriles: 1-5. Promastigotes (P); 6-10. Amastigotes-like (AL). Medios de reacción: Solución amortiguadora 0,1 M acetato de sodio pH 5 + 2 mM DTE (B); en presencia de EDTA 2 mM y de los inhibidores leupeptina 20 μM, iodoacetamida 0,5 mM y E64 10 μM respectivamente. 24 horas de incubación a 37 °C. 20 μg de proteínas totales cargados en carril. Los puntos (.) indican bandas observadas. La flecha (←) indica incremento de actividad. Las (x) indican bandas de actividad dependientes de poder reductor. Las tablas ubicadas en la parte inferior del gel resumen número de bandas observadas por carril, el PM aparente de cada una y el efecto inhibitorio de las bandas observadas por carril, respectivamente. Los triángulos (▲) indican inhibición completa. Los triángulos (Δ) indican inhibición parcial.

5.3 Relación entre la presencia de actividad cisteín proteasa en el exodegradoma de promastigotes de *Leishmania mexicana* y la virulencia del parásito

Con el propósito de relacionar la actividad CP presente en el ED de *L. mexicana* con la virulencia del parásito, se procedió a evaluar posibles diferencias entre las actividades CP presentes en los ED de promastigotes virulentos (PV) y promastigotes naturalmente atenuados (PNA) de *L. mexicana*. Con tal fin, se procedió a confirmar la atenuación natural de la virulencia de promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21) que presentaban números de repiques superiores a 30. Para ello, se compararon las cinéticas de crecimiento de PNA y PV, esta última descrita en la figura 5, con la finalidad de corroborar que se mantuvieran los parámetros de E/S, establecidos. La figura 11, muestra que los PNA presentan una cinética de crecimiento similar a la de los PV, manteniéndose el 6^{to} día (144 horas) como de punto de inicio de E/S del EP.

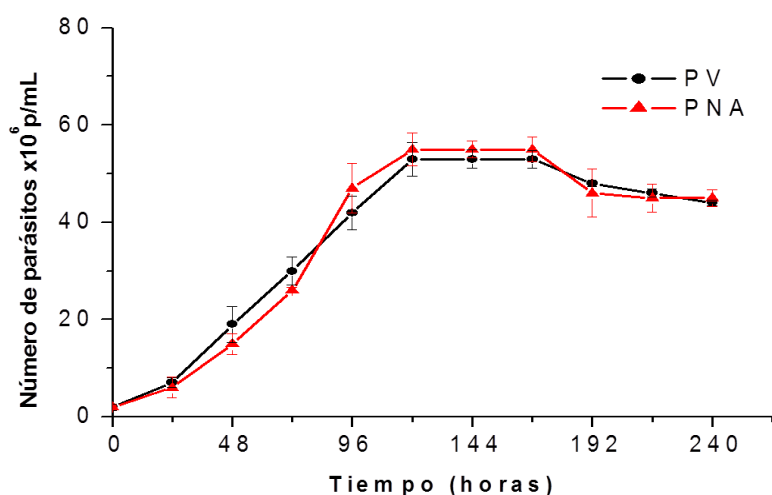


Figura 11. Curva de crecimiento de promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana*. La gráfica representa el número de parásitos $\times 10^6$ p/mL en función del tiempo (horas). Promastigotes virulentos (PV) y naturalmente atenuados (PNA). Los parásitos fueron cultivados en medio LIT suplementado 10% (v/v) SFB. La gráfica representa la media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado.

Posteriormente se procedió a corroborar el grado de virulencia de los PV y PNA, mediante ensayos de infección *in vivo* utilizando modelos murinos. La figura 12 muestra la aparición de lesiones a partir de la 5ta semana de infección en la almohadilla plantar de los animales inoculados con PV (aparición de lesión), la cual fue incrementando su tamaño con el tiempo hasta los 80 días post infección, último día de registro. Por su parte, no se observó cambio significativo en las extremidades de los animales inoculados con PNA. De manera paralela a la medición del tamaño de la extremidad infectada, se realizó un seguimiento del peso de los animales experimentales, sin observarse variaciones significativas (data no mostrada). Los datos obtenidos a partir del registro del tamaño de las extremidades fueron analizados mediante una prueba estadística de homogeneidad de varianza (Prueba de Levene). La prueba aplicada, sugirió que la data no presentaba homogeneidad de varianza. Por tal motivo, se procedió a aplicar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, la cual, sobre un nivel de significancia menor a 0.05, indicó que los datos analizados de ambas infecciones eran significativamente distintos entre sí.

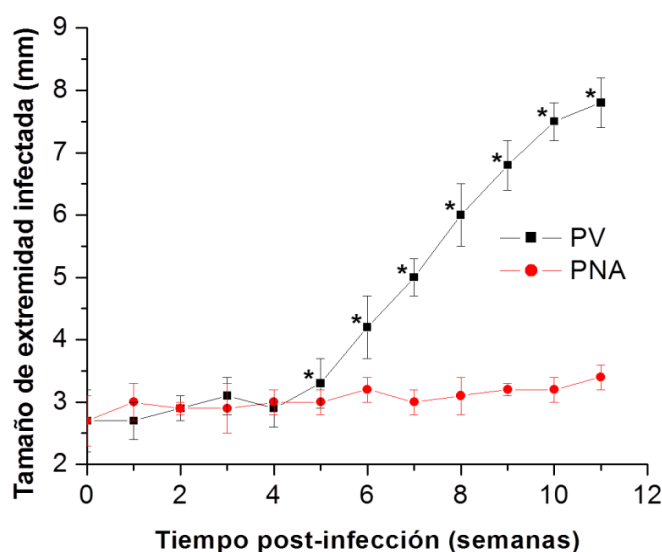


Figura 12. Evaluación del tamaño de la almohadilla plantar de animales infectados con promastigotes virulentos y promastigotes naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana*. Representación gráfica del tamaño de la extremidad infectada (mm) en función del tiempo (semanas), de hámsters (*Mesocricetus auratus*) con promastigotes virulentos y promastigotes naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana*. Promastigotes virulentos (PV) y naturalmente atenuados (PNA). Esta gráfica representa la media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado. Los (*) indican aquellos resultados que presentaron diferencias significativas.

Ante la no observación de lesiones aparentes en los animales inoculados con PNA se procedió la aplicación de métodos de diagnóstico molecular y parasitológico. La figura 13A muestra los resultados del frotis por aposición de las lesiones aisladas de hámsters infectados con PV, donde se identificaron macrófagos infectados con amastigotes, así como amastigotes libres y linfocitos. Por su parte, en la figura 13B, muestra los frotis obtenidos de las extremidades inoculadas con PNA, donde se observaron macrófagos intactos (no infectados con amastigotes), y ausencia de parásitos. Las figuras 13A1 y 13B1 muestran la presencia y ausencia de lesión, sobre el miembro inoculado con PV y PNA, respectivamente en la pata trasera derecha.

La segunda prueba diagnóstica realizada, fue un PCR complejo específico (M1/M2), el cual permite amplificar un fragmento de 800 pb en *L. mexicana* (Eresh y col., 1994; Hernández-Montes y col., 1998). Esta prueba se realizó utilizando como molde ADN aislado a partir de sangre y tejido de animales inoculados tanto con PV como con PNA, de sangre y tejidos de hámster sano y de PV (*L. mexicana*) en cultivo axénico. En la figura 13C1, se observa un producto de amplificación de aproximadamente 800 pb únicamente en los carriles 3 (ADN aislado de cultivo axénicos de *L. mexicana*, control positivo) y 4 (ADN aislado a partir de sangre de animal infectado con PV). Por su parte, la figura 13C2, muestra la amplificación de un producto de tamaño similar únicamente en los carriles 3 (control positivo) y 4 (ADN aislado de tejido de animal infectado con PV). No se observó amplificación alguna en los ADN aislados a partir de sangre y/o tejido de animales inoculados con PNA y en los animales sanos (figura 13 C1/ C2).

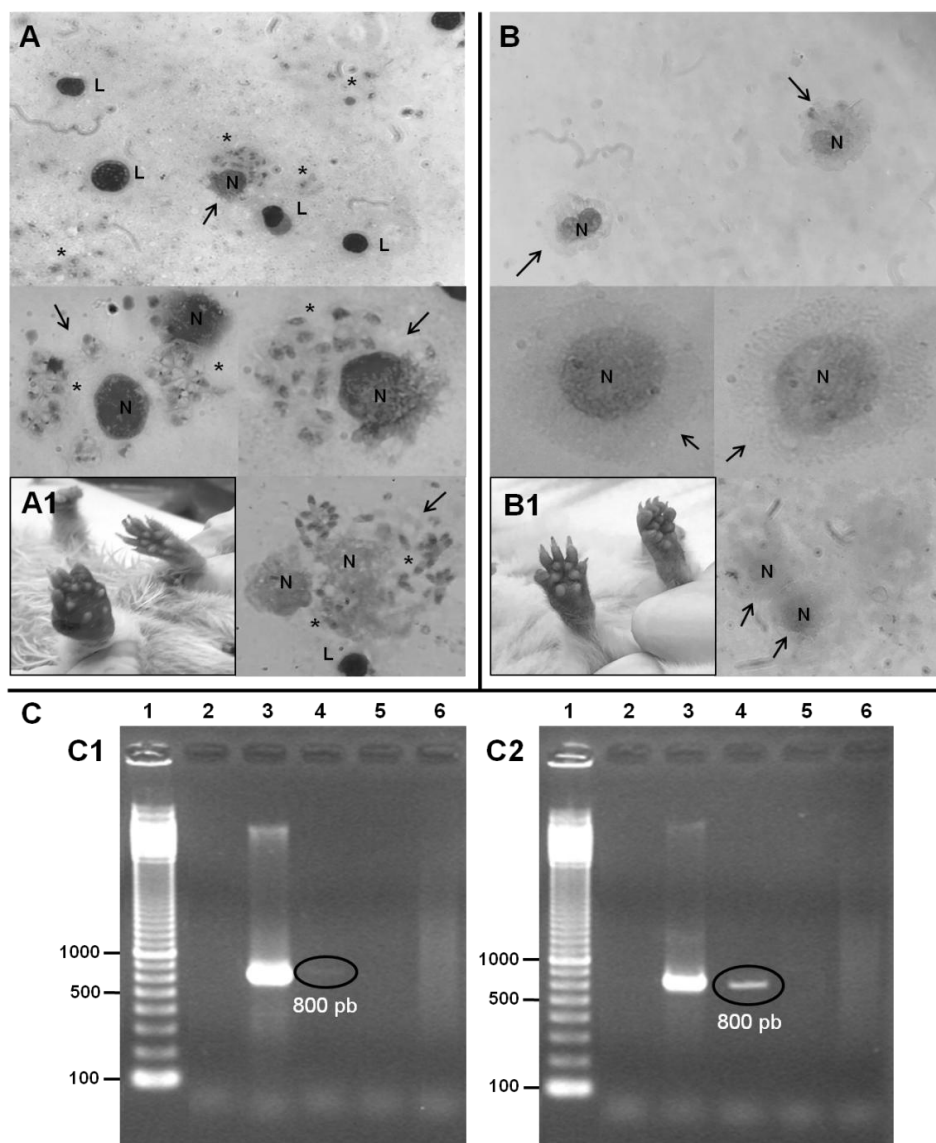


Figura 13. Diagnóstico molecular y parasitológico de animales experimentales inoculados con promastigotes virulentos o con promastigotes naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana*. **A)** Frotis por aposición de extremidad posterior de hámsters infectados con PV y lesión generada (**A1**). **B)** Frotis por aposición de la almohadilla plantar de la extremidad posterior de hámsters infectados con PNA y ausencia de lesión (**B1**). **A-B)** Tinción con colorante Giemsa. Las flechas indican presencia de macrófagos. Los (*) indican presencia de amastigotes. N: núcleo del macrófago; L: linfocitos. El registro fotográfico se realizó a 1000x. **C)** Diagnóstico molecular mediante PCR de *L. mexicana*. **C1)** Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb; Carril 2: H₂O (control sistema); Carril 3: ADN proveniente de cultivo axénico de *L. mexicana* (Control positivo); Carril 4: ADN total de sangre de hámster infectado con PV de *L. mexicana*; Carril 5: ADN de sangre de hámster infectado con PNA de *L. mexicana*; Carril 6: ADN de sangre de hámster sano. **C2)** Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb; Carril 2: H₂O (control sistema); Carril 3: ADN proveniente de cultivo axénico de *L. mexicana* (Control positivo); Carril 4: ADN de tejido proveniente de lesión de hámster infectado con PV de *L. mexicana*; Carril 5: ADN de tejido proveniente de la almohadilla plantar de hámster infectado con PNA de *L. mexicana*; Carril 6: ADN de tejido proveniente de la almohadilla plantar de hámster sano. Gel de agarosa al 2% (p/v). El círculo alrededor de las bandas indica los productos obtenidos de 800 pb. Se analizaron 10 ng de ADN.

La ausencia de lesión visible, amastigotes en frotis de tejido, así como la falta de producto de amplificación en la prueba diagnóstica por PCR en animales experimentales inoculados con PNA, sugiere atenuación de la virulencia.

Corroborada la atenuación natural de PNA, se procedió a evaluar la relación entre la virulencia y la actividad CP de estos promastigotes. Se evaluaron posibles diferencias en los patrones proteicos y de degradación de gelatina entre los EP de PV y PNA. La figura 14, muestra un patrón proteico diferencial entre los EP evaluados. Observándose, 21 bandas proteicas en el EP de PV y 20 bandas en el EP de PNA, indicándose con asteriscos (*) bandas exclusivas con pesos moleculares aparentes iguales a 100, 41, 38 y 32 kDa en PV y 135, 128 y 76 kDa en PNA.

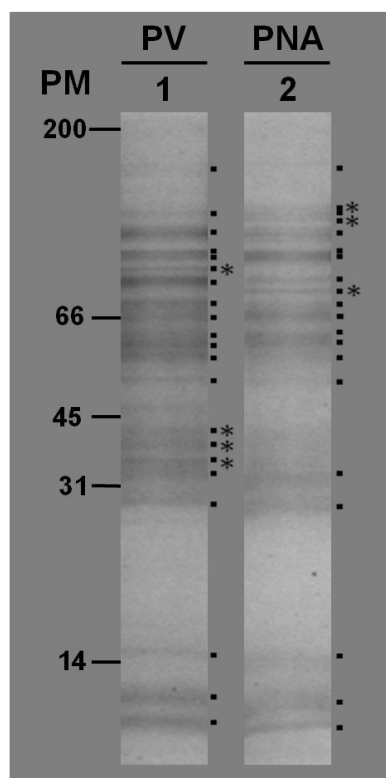


Figura 14. Estudio comparativo de los exoproteomas de promastigotes virulentos y naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana*. Gel de acrilamida en condiciones disociantes al 12% (v/v). Carriles: promastigotes virulentos (PV) y naturalmente atenuados (PNA). Tinción con Coomassie coloidal. 20 µg proteínas totales. Los (.) indican bandas observadas. Los (*) indican bandas únicas. La tabla ubicada en la parte inferior del gel resume el número de bandas observadas por carril.

Carril	Número de bandas	PM (kDa)
1	21	180, 130, 126, 120, 115, 100*, 83, 70, 65, 60, 58, 55, 51, 41*, 38*, 34*, 32*, 30, 14, 10, 8
2	18	180, 135*, 130, 128*, 126, 120, 115, 83, 76*, 70, 65, 60, 58, 55, 51, 41, 30, 14, 10, 8

Los resultados mostrados en la figura 15 evidencian una disminución en la actividad proteolítica total en el ED de PNA. Observándose, 6 bandas de actividad en el medio de reacción A, 7 en el B y 5 al quelar los cationes divalentes del medio y la desaparición total de las bandas de actividad de 31, 23 y 10 kDa. Por su parte, en el ED de PV, se observan 7 bandas de actividad en el medio de reacción A, 8 en el medio B y 8 al quelar los cationes divalentes (figura 15A), resultados consecuentes con los observados en la figura 10 carril 1. Al comparar la actividad proteolítica de ambos ED, presente en el medio que favorece la actividad CP (figura 15B), se puede observar no solo un patrón de degradación disímil entre sí, sino una disminución significativa de la actividad proteolítica total en el ED de PNA.

6. Discusión

La identificación y caracterización de factores proteicos constitutivos de los EP de organismos parasíticos, se ha convertido en la estrategia central de numerosos estudios que se abocan a la búsqueda de nuevos blancos proteicos con fines quimioterapéuticos y/o diagnósticos dado que la gran mayoría de estos participan directamente en la interacción temprana parásito-hospedador (Atayde y col., 2015; Castelli y col., 2019; Santarém y col., 2013).

Parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, despliegan mecanismos adaptativos que les permiten sobrevivir a los cambios impuestos por los medios donde se desarrollan (Cuervo y col., 2009). Recientes evidencias demuestran que la E/S de proteasas, específicamente representantes del clan de las CP, forma parte de estos mecanismos adaptativos dada su participación directa en los procesos de infección celular, migración, sobrevivencia y evasión de la respuesta inmune (Mottram y col., 2004; Silva-Almeida y col., 2012). Sin embargo, a pesar de los avances en la identificación y caracterización de proteínas presentes en los EP de *L. infantum* (Braga y col., 2014; DebRoy y col., 2010; Santarém y col., 2013), *L. donovani* (Silverman y col., 2008), *L. braziliensis* (Cuervo y col., 2009) y *L. mexicana* (Hassani y Olivier, 2013; Pérez–Gordones y col., 2016), aún falta por identificar y adjudicar función biológica a un gran número de ellas, incluyendo a CP en los morfotipos más representativos del parásito. Razón por la cual, se hace necesario continuar profundizando en la identificación y caracterización de CP contentivas del ED de las diferentes especies de *Leishmania*. El siguiente trabajo centró sus objetivos en la evaluación de la actividad CP presente en los ED de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, con el propósito de compararlos y

contribuir en la posible identificación de CP exclusivas para cada morfotipo, así como también evidenciar su posible relación con la virulencia del parásito.

Con la finalidad de evaluar posibles diferencias a nivel de la actividad CP entre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, se procedió a estandarizar las condiciones óptimas para la obtención de los EP de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21). Sobre la base de los resultados obtenidos se pudo evidenciar:

- Una cinética de crecimiento de *L. mexicana* típica, consecuente a las reportadas para este parásito bajo las mismas condiciones experimentales (figura 5) (Bates, 1994).
- Que los parámetros óptimos para el E/S de EP y análisis de la actividad CP en los ED son: título de parásitos 2×10^8 p/mL, tiempo de E/S 24 horas, cantidad de proteína a utilizar 20 µg, pH 5 y medio de reacción contentivo de 2 mM DTE (figuras 6, 7A y Tabla 5).

Estas evidencias permiten proponer al 6^{to} día de cultivo (144 horas), como el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (figura 5). Fase en la cual los parásitos procedentes de cultivos axénicos adquieren una morfología similar a la de parásitos encontrados en la probóscide del insecto vector (promastigote metacíclico infectivo), permitiendo con ello, una aproximación más cercana a las condiciones de infección *in vivo* (Giannini, 1974; Sacks, 1989). Trabajar con cultivos en esta fase de crecimiento permitió garantizar, con una mayor probabilidad, que los EP analizados correspondieron a los de promastigotes metacíclicos. Por lo cual, también fue utilizado como punto de partida para inducir la transformación *in vitro* a amastigotes-like (Hernández-Chinea, 2007). Cabe

destacar que los títulos y tiempos ensayados, corresponden a los reportados previamente en la literatura en estudios similares (Bates y Dwyer, 1987; Hassani y col., 2011; Pérez–Gordones y col., 2016; Santarém y col., 2013) y que el ED de amastigotes solo fue evaluado a pH ácido (pH 5) dado al ambiente donde se desarrolla este morfotipo del parásito (Mundodi y col., 2005).

En el presente trabajo se utilizó el modelo de amastigotes axénicos (*amastigotes-like*), cuya transformación *in vitro* fue inducida por cambios en el pH del medio (pH 5) y en la temperatura de incubación (32-34°C). La escogencia de este modelo, se realizó con base a que la purificación de amastigotes, a partir de lesiones de animales experimentales, suele ser un procedimiento largo, engorroso, de bajo rendimiento de recuperación y los protocolos establecidos no garantizan que estos estén libres de moléculas contaminantes de las células fagocíticas, pudiendo con ello, alterar el análisis de los EP realizados en este trabajo (Hernández-Chinea, 2007).

Por otra parte, es importante resaltar, que los parámetros óptimos establecidos (tabla 5), fueron los que proporcionaron el menor porcentaje de viabilidad (96%, ver tabla 4), sin embargo, aún se encontraban dentro del rango permitido para estudios de EP (Rashidi y col., 2018). La determinación de este parámetro en los cultivos, pre y post E/S, es importante a la hora de identificar las proteínas contentivas de los EP, dado que el análisis de estos a partir de cultivos con viabilidades inferiores al 95%, pueden contener niveles significativos de contaminantes provenientes del contenido citoplasmático de parásitos lisados (muertos), afectando con ello la identificación de proteínas exclusivas (Rashidi y col., 2018). A pesar de la importancia de trabajar con porcentajes de viabilidad

cercanos al 100%, en esta oportunidad fueron elegidas las condiciones que generaron el menor porcentaje de viabilidad (96%), dado que la concentración de proteínas obtenidas, bajo estas condiciones, fue mayor con respecto a los cultivos con inóculos iniciales y tiempos de E/S menores a 2×10^8 p/mL y 24 horas, respectivamente, garantizando que se trabajase dentro del rango de sensibilidad de los métodos experimentales aplicados en este trabajo (electroforesis en condiciones disociantes y zimogramas).

Establecidas las condiciones óptimas para la obtención de los EP de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, se procedió a su evaluación, mediante técnicas electroforéticas, con el objetivo de identificar y caracterizar parcialmente la actividad CP presente, en los ED de ambos morfotipos. Con base en los resultados obtenidos se pudo evidenciar:

- Un patrón proteico diferencial entre los EP evaluados con la aparente exclusividad de 10 y 7 bandas proteicas en los EP de promastigotes y amastigotes, respectivamente (figura 8).
- Un patrón de degradación CP diferencial entre los ED evaluados (figura 9).
- La presencia de 8 bandas de actividad en ambos ED evaluados en medio contentivo de poder reductor y en ausencia de cationes divalentes (figura 10, carriles 2 y 7).
- La inhibición total de 8 bandas de actividad presente en el ED de promastigotes en medio de reacción con poder reductor y ausente de cationes divalente, en contraste con la inhibición parcial de 4 de las 8

bandas de actividad presentes en el ED de amastigotes en presencia de los inhibidores leupeptina, iodoacetamida y E64 (figura 10, carriles 3-5 y 8-10).

Estas evidencias sugieren un EP y un ED diferencial entre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* y la presencia de actividad CP diferencial entre ambos morfotipos, bajo las condiciones de estudio ensayadas, identificándose 8 posibles bandas de actividad en promastigotes y 4 en amastigotes, donde sus respectivos pesos moleculares y sensibilidad a inhibidores específicos de CP se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Actividad de posibles cisteín proteasas en el exodegradoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* y su sensibilidad a inhibidores

PM en P (kDa)	Sensibilidad			PM en AL (kDa)	Sensibilidad			Información del Inhibidor
	Leu.	Iod.	E64		Leu.	Iod.	E64	
200	▲	▲	▲	-	-	-	-	La leupeptina , inhibe de forma reversible, inhibidor competitivo de las cisteín, serín y treonin proteasas, imita el intermediario tetraédrico formado durante la hidrólisis del enlace peptídico (Beynon y Bond, 1989). Específicamente inhibe las CP tipo papaína (Kuramochi y col., 1979).
160	▲	▲	▲	-	-	-	-	
130	▲	▲	▲	-	-	-	-	
90	▲	▲	▲	-	-	-	-	
63	▲	▲	▲	-	-	-	-	
-	-	-	-	40	▲	▲	▲	La iodoacetamida , reacciona rápidamente con grupos sulfhidrilo como los de la cisteína, por lo que inhibe a todas las CP (Smythe, 1936).
31	▲	▲	▲	31	Δ	-	Δ	
23	▲	▲	▲	23	▲	▲	▲	El E64 , produce una alquilación irreversible del residuo de cisteína en el sitio activo de la enzima, por lo que inhibe a todas las CP (Hanada y col., 1978).
-	-	-	-	16	Δ	Δ	Δ	
10	▲	▲	▲	-	-	-	-	

▲: inhibición total; Δ: inhibición parcial; -: ausencia de inhibición

Análisis del EP de promastigotes de *L. mexicana* mediante espectrometría de masa, han permitido identificar varios tipos de CP (Hassani y col., 2011; Pérez–Gordones y col., 2016). Sin embargo, solo 3, la CPA, CPB y CPC, han sido ampliamente caracterizadas, ratificándoseles su papel como factores de virulencia

(Atayde y col., 2016; Denise y col., 2006; Frame y col., 2000). Las cuales, junto con sus funciones biológicas, se resumen en la tabla 7. Con base en los patrones de degradación diferencial, los pesos moleculares de las bandas de actividad y a la sensibilidad de estas actividades a los inhibidores de CP ensayados en este trabajo y con el apoyo de información existente sobre CP identificadas y caracterizadas en el EP de *L. mexicana* (tabla 7), fueron parcialmente identificadas las bandas de actividad observadas.

Tabla 7. Cisteín proteasas caracterizadas en los exoproteomas de *Leishmania mexicana*

CP	PM (kDa)	Clasificación	Estadio específico	Inhibidor	Función biológica
CPB	30 (Hassani y col., 2011)	Familia C1, cathepsina L, clan CA	P < A (Coombs, 1982; Myburgh y col., 2013)	Leu., Iod. y E64 (Pupkis y Coombs, 1984; Robertson y Coombs, 1990)	Participa en los procesos de virulencia e, influencia la respuesta Th1 y Th2 (Alexander y col., 1998).
CPC	30 (Hassani y col., 2011)	Familia C1, cathepsina B, clan CA	P < A (Coombs, 1982; Myburgh y col., 2013)		Genera resistencia a la muerte inducida por macrófagos, posee actividad inmunoreguladora e induce la expresión de TGF- β (Silva-Almeida y col., 2012).
CPA	30 (Hassani y col., 2011)	Familia C1, cathepsina L, clan CA	P < A (Coombs, 1982; Myburgh y col., 2013)		Participa en la interacción parásito-hospedador (Silva-Almeida y col., 2012).

En la figura 10, se observa que en presencia de EDTA, la actividad proteolítica total disminuye significativamente. Por lo cual, y a pesar de que nuestro objetivo se centra en la identificación de actividades tipo CP, se sugiere que las 4 bandas (con pesos moleculares relativos de 160, 130, 90 y 63 kDa) en el ED de promastigotes y las 7 bandas en el ED de amastigotes, señaladas con un triángulo (Δ), en las cuales disminuye significativamente sus actividades dependen de la presencia de cationes divalentes (posibles MP) y que la banda de intensa actividad y con peso molecular cercano a los 63 kDa, la cual disminuye

significativamente en ambos ED al eliminar los cationes divalentes presentes en el medio (en presencia de EDTA), corresponde a la Leishmaniosina o GP63, proteína de superficie más abundante y mejor caracterizada en todas las *Leishmania* sp. estudiadas hasta la fecha (Yao, 2010).

Con respecto a las posibles actividades CP, mostradas en la figura 10, podemos sugerir que las bandas de alto peso molecular presente en el ED de promastigotes (200, 160, 130, 90 y 63 kDa), son del tipo CP, dado que sus actividades no solo se mantienen en presencia de EDTA, es decir, no son dependientes de cationes divalentes, sino que también se inactivan completamente en presencia de los tres inhibidores ensayados. Hecho que no ocurre con las bandas de alto peso molecular (155, 110, 90 y 63 kDa) presentes en el ED de amastigotes, cuyas actividades se muestran insensibles ante la presencia de los inhibidores ensayados. Proponiéndose de esta manera, que las 4 bandas de actividad de alto peso en el ED de amastigotes no pertenezcan al clan de las CP sino que correspondan a MP que no fueron completamente inactivadas por la ausencia de Zn^{2+} . Lo que podría indicar que hay una mayor actividad MP en el ED de amastigotes que en promastigotes, hecho que se evidencia con los resultados obtenidos (figura 10 carriles 1, 2, 6 y 7). Sin embargo, para corroborar esta sugerencia es necesario profundizar en la caracterización de estas estudiando su comportamiento en presencia de inhibidores específicos de MP como fenantrolina (Santos y col., 2006). Cabe destacar, que específicamente las 4 bandas señaladas con un (Δ), en la figura 10, carril 2, estarían colocalizando con proteasas dependientes de cationes divalentes.

Por otra parte, la banda de actividad de 31 kDa presente en ambos ED, la cual se activa únicamente en presencia de poder reductor (figura 7B, carril 2 y 6), pudiese corresponder a la colocación de las enzimas CPA y CPB. Estas proteasas han sido altamente caracterizadas (tabla 7), con pesos moleculares similares a los de la banda observada y que se expresan mayoritariamente en amastigotes (Coombs, 1982), hecho evidenciado en nuestros resultados (figura 7, carriles 2 y 6 y figura 10, carriles 2 y 7). Con respecto a la actividad de esta banda en presencia de leupeptina, iodoacetamida y E64 respectivamente, en el ED de promastigotes, esta fue completamente inactivada (figura 10, carriles 3, 4 y 5), consecuente con lo reportado respecto a la sensibilidad de la CPA y CPB a estos inhibidores (tabla 7). Sin embargo, en amastigotes la actividad solo fue parcialmente inhibida por parte de leupeptina y en menor porcentaje por E64, no observándose inhibición en presencia de iodoacetamida (figura 10 carriles 9 y 10). Dicho resultado permite sugerir posibles diferencias estructurales entre estas enzimas en ambos morfotipos, específicamente, diferencias a nivel del sitio catalítico, las cuales interfieren directamente en la interacción enzima-inhibidor. Sugerencia que se hace con base, a que los mecanismos inhibitorios de la iodoacetamida y E64, involucran una interacción irreversible con la cisteína catalítica (Pupkis y Coombs, 1984; Robertson y Coombs, 1990). Y como puede ser observado en la figura 10 carriles 9 y 10, la iodoacetamida no fue capaz de inhibir la actividad de la banda, mientras que el E64 pudo solo inhibir parcialmente, pero en menor proporción que la leupeptina, la cual, por su parte, es un inhibidor competitivo, poco selectivo y posiblemente los cambios estructurales sugeridos no sean críticos para su interacción con la enzima, dado que este puede interaccionar

diferencialmente (formar varios complejos enzima-inhibidor) con el sitio activo de las CP (Varughese y col., 1989).

Se hace interesante, profundizar en la caracterización de las enzimas responsables de esta actividad de 31 kDa en ambos morfotipos del parásito, a fin de poder esclarecer si esta sensibilidad diferencial a los inhibidores, sea consecuencia directa de cambios estructurales originados posiblemente por modificaciones pos-traduccionales en residuos aminoacídicos adyacentes al sitio catalítico en las enzimas presentes en el ED de amastigotes, o simplemente se deba a la presencia de otra proteasa, posiblemente tipo SP, que este colocalizando en el ED de amastigotes con la CPA y CPB, siendo esta sensible a la leupeptina, inhibidor competitivo de la cisteín, serín y treonin proteasas (Beynon y Bond, 1989) e insensible a la presencia de iodoacetamida y E64, inhibidores exclusivos de CP (Kuramochi y col., 1979; Hanada y col., 1978). Limitaciones de la técnica utilizada en este trabajo para el análisis de los ED, imposibilita dar respuestas claras sobre la sensibilidad diferencial de la banda de actividad de 31 kDa, presente en el ED de amastigotes, con respecto a los inhibidores ensayados. Sin embargo, si permite sugerirla como posible CP, dado a su dependencia a poder reductor, y proponerla como blanco para estudios posteriores, dado su comportamiento disímil con su contraparte en promastigotes. A pesar, que las CP descritas en *Leishmania* sp., específicamente las CPA y CPB, presentan comportamientos y estructuras similares a miembros de este clan descritos en eucariotas superiores, ligeras diferencias a nivel de sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, pueden interferir directamente en sus interacciones con inhibidores y/o drogas específicas (Hughes, 1994). De hecho, estas pequeñas

diferencias son potencialmente importantes, dado a que pueden ser utilizadas para el diseño de drogas que interaccionen únicamente con las proteasas del parásito sin afectar las del mamífero hospedador, permitiendo con ello controlar las enfermedades generadas por estos.

Finalmente, y con respecto a la banda de actividad de 31 kDa, cabe destacar la posibilidad que, en ambos ED, la enzima CPC, también colocalice con CPB y CPA, dado que esta presenta masa molecular similar (30 kDa) y ha sido identificada, por espectrometría de masa, en el EP de *L. mexicana* (Hassani y col., 2011), sin embargo, no es posible detectar su actividad en el sistema utilizado en este trabajo por la imposibilidad de la enzima de hidrolizar gelatina (Robertson y Coombs, 1990).

Por otra parte, aunque no existen referencias de proteasas caracterizadas en el ED de *L. mexicana* con pesos moleculares inferiores a los 30 kDa, podemos sugerir que las actividades de 23, 16 y 10 kDa, presentes en el ED de promastigotes, también son del tipo CP. Sugerencia que se hace dado que dichas actividades se: activan en presencia de poder reductor (figura 7B, carril 2), se mantienen en presencia de EDTA en el medio (figura 10, carril 2) y son inactivadas completamente en presencia de los tres inhibidores ensayados. Por su parte, la banda de actividad de 10 kDa, observada únicamente en el ED de promastigotes, presenta un comportamiento particular, activándose únicamente en presencia del agente reductor y de EDTA (figura 10, carril 2) e inactivándose completamente por los inhibidores ensayados. Este comportamiento sugiere que dicha actividad CP es modulada por cationes divalentes. Evidencias preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el catión inhibitorio es el Zn^{+2} presente en el medio de

reacción (Pérez–Gordones y col., 2017). Sugerencia que se apoya en el hecho de que los iones metálicos de la serie IIB como el Zn^{+2} , Cd^{+2} y Hg^{+2} , son conocidos por regular varias actividades enzimáticas e interacciones proteicas, como consecuencia de la interferencia del metal con residuos de cisteína, debido a su alta afinidad a los grupos tiol (Franco y col., 1999). Razón por la cual posiblemente en presencia de EDTA, el cual presenta una mayor afinidad y por tanto mayor poder quelante por Zn^{+2} que por Ca^{+2} y Mg^{+2} , está CP de 10 kDa, previamente inhibida (figura 10 carril 1), se activa (figura 10 carril 2) (Koh y col., 1996; Waters y col., 2001). Comportamientos similares al de la banda de actividad de 10 kDa han sido evidenciados en CP de *Entamoeba histolytica* (Franco y col., 1999), en la catepsina B de bovino (Lockwood, 2004) y en la caspasas-3 de humanos (Franco y col., 1999; Lockwood, 2004; Perry y col., 1997). Esta última, responsable de patologías asociadas con la apoptosis y blanco de drogas específicas empleadas en el tratamiento de la enfermedad que genera, las cuales han sido diseñadas con base en la sensibilidad de esta al Zn^{2+} (Perry y col., 1997). Sería interesante profundizar en la caracterización de esta actividad de bajo peso molecular y compararla con la actividad de la caspasa-3 de humanos, a fin de realizar ensayos que permitan conocer si las drogas usadas contra esta proteasa de humanos, también pudiesen tener un efecto sobre su actividad y poder estudiar sus potencialidades como drogas anti-*Leishmania* (Pérez–Gordones y col., 2017).

Con respecto a las actividades de peso molecular (40, 23 y 16 kDa) presentes en el ED de amastigotes, también se sugieren del tipo CP, dado que, son dependientes de poder reductor y los inhibidores ensayados disminuyen de forma significativa sus actividades. Donde las bandas de 40 y 16 kDa, son

parcialmente inhibidas mientras que la banda de 23 kDa es inhibida completamente por los tres inhibidores ensayados. Esta última presenta un comportamiento similar, a pesar de presentar una menor actividad, que la banda de 23 kDa presente en el ED de promastigote, posiblemente corresponda a la misma CP, pero esta presenta mayor expresión o se E/S en mayor proporción en promastigotes.

Por otra parte, cabe destacar la posibilidad que las bandas de actividad de pesos moleculares ligeramente disímiles entre el ED de promastigotes y el de amastigotes (pesos moleculares cercanos), las cuales hemos sugeridos como proteasas diferentes, correspondan a proteasas precursoras del ED de amastigotes (Robertson y Coombs, 1992). Posiblemente la presencia de estas proteasas precursoras en promastigotes sean parte de estrategias de infección usadas por el parásito, las cuales sufren modificaciones a través de mecanismos autocatalíticos, lo que conlleva a que estas se observen consecuentemente como bandas de actividad de menor peso en ED de amastigotes (Robertson y Coombs, 1992).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten demostrar no solo la existencia de actividad CP en el ED de promastigotes (8 bandas) y amastigotes (4 bandas) de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21), sino que corroboran una actividad diferencial entre ambos morfotipos. Apoyando, con ello, la posibilidad de que la expresión y E/S de CP, pueda ser una estrategia por parte del parásito para sobrevivir a los cambios impuestos por los ambientes donde se desarrolla (Mottram y col., 2004). La tabla 8, resume la identificación parcial de las bandas de actividad tipo CP, observadas en ambos ED, en este trabajo, indicando en la

misma, cuales se considera que deben ser estudiadas a mayor profundidad de acuerdo a su alta potencialidad como posible blanco para el diseño de drogas y/o diagnóstico. Sugerencias que se hacen con base en sus comportamientos exclusivos en los ED analizados.

Profundizar en la identificación y caracterización de las CP sugeridas en la tabla 7, a fin de conocer sus funciones biológicas, expresión morfotipo específica, y sus homologías con proteasas presentes en eucariotas superiores, podría establecerlas como posibles blancos de droga o de diagnóstico. Particularmente, sugerimos profundizar en el estudio de las bandas de actividad aparentemente exclusivas de cada morfotipo, como la banda de 10 y 40 kDa presentes en los ED de promastigotes y amastigotes respectivamente, dado que pudiesen estar involucradas directamente en el proceso de infección, en el caso de las presentes en el ED de promastigotes, como en el mantenimiento del parásito dentro de la vacuola fagolisosomal, en el caso de amastigotes. Para ello, sugerimos como próximo paso la purificación y caracterización de las enzimas responsables de estas actividades.

Tabla 8. Resumen de cisteín proteasas identificadas en el exodegradoma de *Leishmania mexicana* cepa BEL21

PM (kDa)	Evidencia que la señalan como CP	Tipo de CP	Potencialidad
ED de Promastigotes			
200	• Activas en medio con poder reductor y ausencia de cationes divalentes • Inhibidas por leupeptina, iodoacetamida y E64	Desconocido	-
160		Desconocido	-
130		Desconocido	-
90		Desconocido	-
63		Desconocido	-
31	• Solo se activa en medio con poder reductor • Inhibida por leupeptina, iodoacetamida y E64	CPA y CPB (colocalización)	Alta
23	• Solo se activa en medio con poder reductor • Inhibida por leupeptina, iodoacetamida y E64	Desconocido	-
10	• Actividad modulada por cationes divalentes (Zn^{2+}) • Inhibida por leupeptina, iodoacetamida y E64 • Banda de actividad exclusiva en el ED de promastigotes bajo las condiciones de estudio establecidas	Tipo catepsina y/o caspasa	Alta
ED de Amastigotes			
40	• Solo se activa en medio con poder reductor • Inhibida por leupeptina, iodoacetamida y E64 • Banda de actividad exclusiva en el ED de amastigotes bajo las condiciones de estudio establecidas	Desconocido	Alta
31	• Solo se activa en medio con poder reductor • Inhibida parcialmente por leupeptina y E64	CPA y CPB (colocalización)	Alta
23	• Solo se activa en medio con poder reductor • Inhibida por leupeptina, iodoacetamida y E64	Desconocido	-
16	• Inhibida parcialmente por leupeptina y E64 • Banda de actividad exclusiva en el ED de amastigotes bajo las condiciones de estudio establecidas	Desconocido	Alta

Corroborada la presencia de actividad CP en el ED de promastigotes de *L. mexicana* y su patrón de digestión diferencial con respecto al ED de amastigotes, se procedió a evaluar, mediante ensayos de infección *in vivo* y técnicas electroforéticas, la posible relación de este clan de proteasas con la virulencia del parásito. Con base en los resultados obtenidos se pudo evidenciar:

- Una cinética de crecimiento similar entre PV y PNA, manteniéndose el 6^{to} día, como tiempo de inicio de la E/S para la obtención del EP (figura 11).
- La atenuación de la virulencia en los PNA, sugerido por la ausencia de lesión en ensayos de infección *in vivo* y corroborado por dos técnicas diagnósticas (figura 12 y 13).
- Un patrón proteico diferencial entre los EP evaluados, con la aparente exclusividad de 4 y 3 bandas proteicas en los EP de PV y PNA (figura 14).
- Un patrón de degradación de gelatina diferencial entre los ED evaluados (figura 15).
- Una disminución en la actividad total en el ED de PNA (figura 15).
- La presencia de 2 bandas de actividad en el ED de PV y 1 en el de PNA dependientes de poder reductor (figura 15, carril 2 y 5).
- La presencia de 8 bandas de actividad en el ED de PV y 5 en PNA en medio contentivo de poder reductor (2 mM DTE) y en ausencia de cationes divalentes (2 mM EDTA) (figura 15, carril 3 y 6).

Estas evidencias permiten sugerir que el mantenimiento prolongado de parásitos en cultivos axénicos, confiere una menor semejanza con el parásito desarrollado en condiciones naturales, disminuyendo con ello su capacidad infectiva o virulencia (Moreira y col., 2012). En el presente trabajo, la atenuación natural de la virulencia de promastigotes de *L. mexicana*, con más de 30 repiques (PNA), se evaluó mediante ensayos de infección *in vivo*. La ausencia de lesión aparente en los animales inoculados con PNA, permite sugerir la disminución del grado de patogenicidad, no pudiéndose descartar del todo la pérdida total de la

virulencia, dado que el seguimiento solo se realizó por 80 días (figura 13). Sin embargo, dicha atenuación fue corroborada mediante la realización de dos pruebas diagnósticas. Una parasitológica por frotis por aposición, la cual es una prueba simple y rápida con una sensibilidad de alrededor del 60 y 65% (Rodríguez y col., 1994) y una molecular por PCR, método con alta sensibilidad y especificidad (Zerpa y col., 2002). Observándose, en ambos casos, la ausencia del material genético del parásito tanto en sangre como en tejido del miembro inoculado (figura 13).

Existen evidencias que relacionan la actividad CP con la atenuación de la virulencia, en promastigotes de *L. braziliensis* y en *L. amazonensis* (Moreira y col., 2012), sin embargo, la información con respecto a otras especies de *Leishmania*, responsables de las manifestaciones clínicas más comunes, es muy escasa. Sin mencionar que es mucho menor la información existente sobre la participación de las actividades de este clan con el mantenimiento del parásito en la vacuola fagolisosomal. Por tal motivo y con bases para sugerir la atenuación de la virulencia de los PNA de *L. mexicana*, se procedió a evaluar el EP y ED de estos parásitos, a fin de corroborar si la atenuación se relaciona con cambios a nivel de la actividad CP como ha sido sugerido en parásitos del género de *Leishmania* (Mottram y col., 2004).

Los resultados mostrados en las figuras 14 y 15A, evidencian variaciones a nivel del EP entre los PV y los PNA, así como una disminución significativa de la actividad del ED de estos últimos. Mostrándose adicionalmente, con respecto a la actividad CP, un patrón de degradación diferencial donde se destaca la ausencia en el ED de los PNA de las bandas de peso molecular 31, 23 y 10 KDa

previamente descritas el ED de PV (figura 15B), lo cual las propone como potenciales candidatas para estudios más profundos, a fin de determinar si estas actividades están implicadas directamente en la virulencia del parásito.

La ausencia de la banda de 31 kDa el ED de los PNA, la cual posiblemente corresponda a la colocalización de las CP, CPA y CPB, apoya las evidencias que estas enzimas desempeñan un papel crítico en la patogenicidad de estos parásitos (Myburgh y col., 2013), siendo por ello consideradas potenciales blancos farmacológicos y candidatas a vacunas (Coombs, 1982; Mottram y col., 2004; Silva-Almeida y col., 2012). Ensayos de silenciamiento génico o “*Knockout*” corroboran estos resultados, donde la ausencia de la CPA y/o CPB, reducen significativamente la aparición de lesiones en modelos murinos, así como la capacidad de los parásitos de modular el sistema inmunitario del hospedador e inducir su diferenciación a las formas metacíclica y/o a amastigote (Alexander y col., 1998; Myburgh y col., 2013; Williams y col., 2006). Estas evidencias, en conjunto con los resultados obtenidos pudiesen indicar que las CP, particularmente la CPA y CPB, están involucradas activamente en la virulencia de promastigotes de *L. mexicana*. Sin embargo, es necesario profundizar en la caracterización de estas 3 bandas de actividad ausentes en el ED de PNA, a fin de establecer cuál es la responsable de la atenuación de la virulencia o si esta condición es el resultado de la disminución de la expresión simultanea de varias proteasas.

La purificación y caracterización, de las proteasas responsables de las actividades tipo CP identificadas en este trabajo, mediante técnicas cromatográficas y/o de espectrometría de masa, conferiría valiosa información

referente a su función biológica y a su homología con proteasas presentes en eucariotas superiores, con la cual se podría corroborar su potencialidad como blancos de drogas y de diagnóstico.

7. Conclusiones

Con base en el objetivo planteado se puede concluir que los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, bajo las condiciones experimentales establecidas en este trabajo, presentan una actividad cisteín proteasa diferencial, la cual se relaciona directamente con la virulencia del parásito.

En relación a los objetivos específicos planteados se concluye:

1. Las condiciones óptimas para la obtención de los exoproteomas de promastigotes y amastigotes y la evaluación de la actividad cisteín proteasa son:
 - Partir de cultivos con un título de 2×10^8 p/mL
 - Un tiempo de excreción/secreción de 24 horas
 - Analizar 20 μ g de proteínas
 - Utilizar un medio de reacción contentivo de poder reductor a pH 5.
2. Los exodegradomas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* presentan una actividad cisteín proteasa diferencial, siendo esta mayor en amastigotes, identificándose 8 y 4 bandas de actividad cisteín proteasa en los exodegradomas de promastigotes y amastigotes, respectivamente.
3. Una disminución de la actividad total y la ausencia de 3 bandas de actividad cisteín proteasa en el exodegradoma de promastigotes naturalmente atenuados de *Leishmania mexicana*, sugieren una relación directa entre la actividad cisteín proteasa y la disminución del grado de patogenicidad o virulencia de los parásitos.

8. Bibliografía

1. Alexander, J., Coombs, G., Mottram, J. 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. J Immunol.161: 6794-6801.
2. Ambit, A., Woods, K., Cull, B., Coombs, G., Mottram, J. 2011. Morphological Events during the Cell Cycle of *Leishmania major*. Eukaryot. Cell. 10: 1429-1438.
3. Atayde, V., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., Olivier, M. 2015. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. Cell reports. 13(5): 957-967.
4. Atayde, V., Hassani, K., da Silva Lira Filho, A., Borges, A., Adhikari, A., Martel, C., Olivier, M. 2016. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. Cellular Immunology. 309: 7-18.
5. Barrett, A. 1986. The classes of proteolytic enzymes. plant proteolytic enzymes. Exodegradoma. CRC Press: USA. 1-16.
6. Bates, P. 1994. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. Parasitology. 108(1): 1-9.
7. Bates, P., Dwyer, D. 1987. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. Molecular and biochemical parasitology. 26(3): 289-296.
8. Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G., Mottram, J. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. Int. J. for Parásitol, 37: 1063–1075.

9. Beverley, S. 2003. Genetic and genomic approaches to the analysis of *Leishmania* virulence. In Molecular Medical Parasitology. 111-122.
10. Beynon R., Bond, J. 1989. Proteolytic enzymes. IRL Press, Oxford.
11. Braga, M. S., Neves, L. X., Campos, J. M., Roatt, B. M., Soares, R., Braga, S., de Melo, R., Reis, A., Castro-Borges, W. 2014. Shotgun proteomics to unravel the complexity of the *Leishmania infantum* exoproteome and the relative abundance of its constituents. Mol Biochem Parasitol. 195(1): 43-53.
12. Burza, S., Croft, S., Boelaert, M. 2018. Leishmaniasis. The Lancet. 392(10151): 951-970.
13. Cameron, P., McGachy, A., Anderson, M., Paul, A., Coombs, G., Mottram, J., 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. J Immunol. 5: 3297-304.
14. Castelli, G., Bruno, F., Saieva, L., Alessandro, R., Galluzzi, L., Diotallevi, A., Vitale, F. 2019. Exosome secretion by *Leishmania infantum* modulate the chemotactic behavior and cytokinic expression creating an environment permissive for early infection. Experimental parasitology. 198: 39-45.
15. Castro, G., Zerpa R., Rondón, L. 2003. Leishmaniasis en la infancia. Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana. 31(6): 351-361.
16. Chang, K., Chaudhuri, G., Fong, D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Annu Rev Microbiol. 44:499-529.
17. Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C., Tacchini-Cottier, F. 2010. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. Journal of biomedicine & biotechnology. 719361.

18. Choudhury, R., Bhaumik, S., De, T., Chakraborti, T. 2009. Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. Mol. Cell. Biochem. 320: 1-14.
19. Coombs, G. 1982. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. Parasitology. 1: 149-55.
20. Corrales, R., Sereno, D., Mathieu-Daude F. 2010. Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58: 27-38.
21. Cuervo, P., De Jesus, J., Saboia-Vahia, L., Mendonça-Lima, L., Domont, G., Cupolillo, E. 2009. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. Journal of proteomics. 73(1): 79-92.
22. DebRoy, S., Keenan, A., Ueno, N., Jeronimo, S., Donelson, J., Wilson, M. 2010. *Leishmania infantum chagasi*: a genome-based approach to identification of excreted/secreted proteins. Exp. Parasitol. 126(4): 582-591.
23. Denise, H., Poot, J., Jiménez, M., Ambit, A., Herrmann, D., Vermeulen, A., Coombs, G., Mottram, J. 2006. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. BMC molecular biology. 7(1): 42.
24. Descoteaux, G., Matlashewski, S., Turco, 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. J Immunol. 149: 3008-3015.
25. Eresh, S., McCallum, S., Barker, D. 1994. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitology. 109(4): 423-433.

26. Forestier, C., Gao, Q., Boons, G., 2014. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:193.
27. Frame, M., Mottram, J., Coombs, G. 2000. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology.* 121:367-377.
28. Franco, E., Araujo, R., Meza, I. 1999. Specific and Reversible Inhibition of *Entamoeba histolytica* Cysteine-Proteinase Activities by Zn^{+2} , Implications for Adhesion and Cell Damage. *Archives of Medical Research.* 30: 82-8.
29. Giannini, M. 1974. Effects of promastigotes growth phase, frequency of subcultures, and host age on promastigotes-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool.* 21: 521-7.
30. Gómez, M. y Olivier, M. 2010. Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction. *Sci.* 1: 314-318.
31. Grzonka, Z.; Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wiczerzak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, M., Jaskólski, M., Grubb, A. 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol.* 48:1-20.
32. Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry.* 42(3): 523-528.
33. Hassani, K., Antoniuk, E., Jardim, A. Olivier, M. 2011. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PloS One.* 6: 1-10.

34. Hassani, K., Olivier, M. 2013. Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. PLoS neglected tropical diseases. 7(5).
35. Hernández-Chinea, C. 2007. *Leishmania amazonensis*: humoral response to amastigote excreted antigens in murine Leishmaniasis. Exp. Parasitol. 116: 492-496.
36. Hernández-Montes, O., Monroy-Ostria, A., McCann, S., Barker, D. 1998. Identification of Mexican *Leishmania* species by analysis of PCR amplified DNA. Acta Tropica. 71(2): 139-153.
37. Hirst, S., Stapley, L. 2000. Parasitology: the dawn of a new millennium. Parasitology Today. 16(1): 1-3.
38. Hughes, A. 1994. Evolution of cysteine proteinases in eukaryotes. Mol Phylogenet Evol. 3 (4):310–21.
39. Ilg, T. 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. Parasitology Today.16: 489-497.
40. Jiménez, M., Guzmán, E., Pérez, M., Ortega, A., Acosta, K. 2012. Semillas de papaya contra la enfermedad de Chagas. Evaluación in vivo de su actividad antiprotozoaria hacia *Trypanosoma cruzi*. Fomix Campeche. 4(13): 39-43.
41. Joshi, M., Mallinson, D., Dwyer, D. 2004. The human pathogen *Leishmania donovani* secretes a histidine acid phosphatase activity that is resistant to proteolytic degradation. The Journal of eukaryotic microbiology. 51: 108-112.
42. Koh, J., Suh, S., Gwag, B., He, Y., Hsu, C., Choi, D. 1996. The Role of Zinc in Selective Neuronal Death After Transient Global Cerebral Ischemia. Science. 272(5264): 1013–1016.

43. Kumar, R., Engwerda, C. 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*. 3(3): e13.
44. Kuramochi, H., Nakata, H., Ishii, S. 1979. Mechanism of association of a specific aldehyde inhibitor, leupeptin, with bovine trypsin. *The Journal of Biochemistry*. 86(5): 1403-1410.
45. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T42. *Nature*. 227: 680-685.
46. Lockwood, T. 2004. Cys-His proteases are among the wired proteins of the cell. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 432: 12–24.
47. López-Otín, C., Overall, C. 2002. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature reviews Molecular cell biology*. 3(7): 509-519.
48. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265–275.
49. McKerrow, J., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M. 2006. Proteases in parasitic diseases. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 1: 497-536.
50. Moreira, D., Santarém, N., Loureiro, I., Tavares, J., Silva, A., Amorim, A., Ouaisi, A., Cordeiro-da-Silva, A., Silvestre R. 2012. Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(1): e1469.
51. Mottram, J., Brooks, D., Coombs, G. 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol*. 1: 455-460.
52. Mottram, J., Coombs, G., Alexander, J. 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol*. 7: 375–381.

53. Mundodi, V., Kucknoor, A., Gedamu, L. 2005. Role of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. BMC Molecular Biology. 6: 3.
54. Myburgh, E., Coombs, G., Mottram, J. 2013. *Leishmania* CPA, CPB and CPC Cysteine Proteases. Handbook of Proteolytic Enzymes. 1923–1928.
55. Nomenclatura Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology 1992. Enzyme Nomenclature. Academic Press, Florida, Estados Unidos.
56. Novinec, M., Lenarčič, B. 2013. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. Review Bio Mol Concepts. 4(3): 287.
57. Olivier, M., Gregory, D., Forget, G. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clinical microbiology reviews. 18(2): 293-305.
58. Organización Panamericana de la Salud [en línea]. Información general: Leishmaniasis. 2019. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=es [Consulta: 8 de febrero de 2020].
59. Organización Mundial de la Salud [en línea]. Notas descriptivas: enfermedades tropicales desatendidas. 2016. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> [Consulta: 8 de febrero de 2020].
60. Orué, A., Abreu, N., Martínez, C., Mendoza, A. 2008. Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* específica del subgénero *Leishmania*. Rev. de la Soc. Venezolana de Microbiol. 28:6-13.

61. Payares, G. 1981. Estudio de especificidades antigénicas entre promastigotes y amastigotes de la cepa LV-78 de *Leishmania mexicana amazonensis*. Tesis de Maestría, Universidad de Liverpool, Londres, Inglaterra.
62. Pérez–Gordones, M., Méndez, M., Vonasek, E., Romero, P., Hernández–Chinea, C. 2016. Proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*. MIBE. 8: 9–12.
63. Pérez–Gordones, M., Romero, P., Hernández–Chinea, C. 2012. Estudio de factores proteolíticos excretados por amastigotes de *Leishmania*. MIBE. 6: 9–12.
64. Pérez–Gordones, M., Romero, P., Hernández–Chinea, C. 2014. Análisis de la actividad proteolítica presente en el secretoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*. MIBE. 7: 9–12.
65. Pérez–Gordones, M., Romero, P., Hernández–Chinea, C. (mayo de 2017). Proteolytic activity in the exoproteome of *Leishmania mexicana* amastigotes. En J. Alvar (Presidencia), 6th World Congress on Leishmaniasis. Congreso llevado a cabo en Toledodegradomao, España.
66. Perry, D., Smyth, M., Stennicke, H., Salvesen, G., Duriez, P., Poirier, G., Hannun, Y. 1997. Zinc Is a Potent Inhibitor of the apoptotic protease, Caspase-3, a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 272: 18530-33.
67. Peysselon, F., Launay, G., Lisacek, F., Duclos, B., Ricard-Blum, S. 2013. Comparative analysis of *Leishmania* exoproteomes: Implication for host–pathogen interactions. BBA - Proteins and Proteomics. 12: 2653–2662.

68. Pupkis, M., Coombs, G. 1984. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. Microbiology. 130(9): 2375-2383.
69. Rashidi, S., Kalantar, K., Rostamzadeh, D., Hatam, G. 2018. The Importance of Checking *Leishmania* Promastigotes Viability in the Proteomic analysis of Secretions. Turkiye Parazitol Derg. 42(4): 245-8.
70. Rawlings, N., Barrett, A, Bateman A. 2014. Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. Curr Protoc Bioinformatics. 48:1-33.
71. Rawlings, N., Barrett, A., Thomas, P., Huang, X., Bateman, A., Finn, R. 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Res. 46: D624-D632.
72. Robertson, C., Coombs, G. 1990. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. Molecular and biochemical parasitology. 42(2): 269-276.
73. Robertson, C., Coombs, G. 1992. Stage-specific proteinases of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. FEMS Microbiology Letters. 94(1-2): 127–132.
74. Rodríguez, N., De Lima, H., Aguilati, C., Rodriguez, A., Barker, D., Convit, J. 2002. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 96: S1/105-S1/109.

75. Rodríguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B. R., Convit, J. 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol. 32(9): 2246-2252.
76. Rogers, M., Bates, P. 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feed behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathogens. 3: 91.
77. Rogers, M., Kropf, P., Choi, B., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P., Muller, I. 2009. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. PLoS Pathogens. 5: e1000555.
78. Sacks, D. 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Experimental Parasitology. 69(1): 100–103.
79. Sagasti, J. 2017 Comportamiento biológico del aislado venezolano AM-16 de *Trypanosoma cruzi*: estudio de la colonización de la mucosa bucal y gástrica en el modelo murino. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
80. Sajid, M., McKerrow, J. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol. 1: 1-21.
81. Santarém, N., Racine, G., Silvestre, R., Cordeiro-da-Silva, A., Ouellette, M. 2013. Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. Journal of Proteomics. 84: 106-118.
82. Santarém, N., Silvestre, R., Tavares, J., Silva, M., Cabral, S., Maciel, J., Cordeiro-da-Silva, A. 2007. Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted antigens. Bio Med Research International. 2007.

83. Santos, A., Branquinha, M., D'Avila-Levy, C. 2006. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78: 687-714.
84. Schechter, I., Berger, A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27(2): 157-162.
85. Shakarian, A., Joshi, M., Yamage, M., Ellis, S., Debrabant, A., Dwyer, D. 2003. Members of a unique histidine acid phosphatase family are conserved amongst a group of primitive eukaryotic human pathogens. *Molecular and cellular biochemistry.* 245: 31-41.
86. Shapiro, H. 1988. *Practical Flow Cytometry.* John Wiley & Sons. Segunda edición, New York, Estados Unidos.
87. Shing, S., Sivakumar, R. 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49: 55-60.
88. Silva-Almeida, M., Pereira, B., Ribeiro-Guimarães, M., Alves, C. 2012. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & vectors.* 5(1): 160.
89. Silverman, J., Chan, S., Robinson, D., Dwyer, D., Nandan, D., Foster, L., Reiner, N. 2008. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome biology.* 9(2): R35.
90. Siqueira-Neto, J., Debnath, A., McCall, L., Bernatchez, J., Ndao, M., Red, S., Rosenthal, P. 2018. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 8: e0006512.

91. Smythe, C. 1936. The reaction of iodoacetate and of iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations. *J. biol. Chem.* 114(3): 601-612.
92. Stennicke, H., Salvesen, G. 1999. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death & Differentiation.* 6(11): 1054-1059.
93. Storer, A., Menard, R. 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 486–500.
94. Tavares, L., Plasencia, D., Romero, P., Pérez–Gordones, M. 2018. Caracterización *in silico* de proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*. *MIBE.* 9: 9–12.
95. Veras, P., Bezerra de Menezes, J. 2016. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. *Int. J. Mol. Sci.* 8:17.
96. Tonui, W., Mejia, J., Hochberg, L., Mbow, M., Ryan, J., Chan, A. 2004. Immunization with *Leishmania major* exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with *L. major*. *Infect. Immun.* 72: 5654-5661.
97. Varughese, K., Ahmexodegradoma, F., Carey, P., Hasnain, S., Huber, C., Store A. 1989. Crystal Structure of a Papain-E-64 Complex. *Biochemistry.* 28: 1330-1332.
98. Verma, S., Dixit, R., Pandey, K. 2016. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in pharmacology.* 7: 107.

99. Villa, G., Di Maggio, P., Berardi, M., Chelazzi, C., Caldini, A., De Gaudio, A., Valente, S. 2014. Role of hemodialysis with high cut-off membranes in a patient with a non-recognized leishmaniasis. *Blood purif.* 38(3-4): 239-24.
100. Waters, R., Bryden, N., Patterson, K., Veillon, C., Anderson, R. 2001. EDTA Chelation Effects on Urinary Losses of Cadmium, Calcium, Chromium, Cobalt, Copper, Lead, Magnesium, and Zinc. *Biological Trace Element Research.* 83(3): 207–221.
101. Williams, R., Tetley, L., Mottram, J., Coombs, G. 2006. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular microbiology.* 61(3): 655-674.
102. Yao, C. 2010. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all. *Infect. Immun.* 78: 22-31.
103. Zerpa, O., Borges, R., Loyo, N., Galindo, W., Belisario, D., Rodríguez, N., Convit, J. 2002. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. *Dermatología venezolana.* 40(4).
104. Zilberstein, D., Shapira, M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 48: 449-70.
105. Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D., Denny, P., Almeida, I., Beverley, S. 2003. Ether Phospholipids and Glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 278(45): 44708–44718.