



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

INFECTÓMICA Y PATGÉNESIS MOLECULAR

**“Análisis de la expresión de glicosiltransferasas de *Leishmania mexicana* en interacción con colágena”**

T E S I S

Que presenta

**Gandhi Vázquez Martínez**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Director de Tesis: Dr. José Luis Rosales Encina**

Ciudad de México

Julio, 2017

Durante la realización de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro708460

## **Agradecimientos**

Al Dr. José Luis Rosales Encina, por permitirme estar en su grupo de investigación.

A la Dra. Patricia Talamás, al Dr. Mario Alberto Rodríguez y el Dr. Víctor Tsutsumi, por su asesoría en el presente trabajo.

A la Biól. Lidia Baylón, M. en C. Patricia Espíritu y al Téc. Enrique Martínez por el apoyo académico.

A mi familia, amigos y compañeros.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD .....	1
2.1. Leishmaniasis cutánea .....	1
2.2. Leishmaniasis difusa.....	2
2.3. Leishmaniasis mucocutánea .....	3
3. EPIDEMIOLOGÍA.....	3
4. TRATAMIENTO.....	4
5. CICLO DE VIDA .....	5
6. MOLÉCULAS DE SUPERFICIE Y VIRULENCIA .....	8
6.1. Lipofosfoglicano (LPG).....	8
6.2. Fosfolípidos de glicoinositol.....	9
6.3. Glicoproteínas con anclaje glicofosfatidilinositol (GPI) .....	10
6.4. Proteofosfoglicanos (PPG's) y fosfatasa ácida secretada (sAPS)	10
7. INTERACCIÓN EN EL HUÉSPED VERTEBRADO .....	11
7.1. Matriz extracelular.....	11
7.2. Interacción entre <i>Leishmania</i> y componentes de la matriz extracelular	12
8. GLICOSILTRANSFERASAS .....	14
8.1. Clasificación, estructura y funciones de las GT's.....	14
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
10. HIPÓTESIS .....	18
11. OBJETIVOS.....	18
12. METODOLOGÍA .....	19
12.1. Análisis <i>in silico</i> .....	19
12.2. Parásitos.....	19
12.2.1. Cultivos de promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	20
12.2.2. Cultivos de promastigotes de <i>L. mexicana</i> en interacción con	
colágena. ....	20

12.3. Ensayos de DotBlot .....	20
12.3.1. Tinción Ácido Periódico Schiff (PAS) .....	21
12.3.2. Tinción con Rojo de Rutenio .....	21
12.4. Purificación de DNA y RNA.....	21
12.5. PCR y RT-PCR.....	22
13. Resultados.....	24
13.1. Análisis <i>In silico</i> .....	24
13.1.1. Búsqueda de dominios DXD .....	25
13.1.2. Diseño de oligonucleótidos .....	27
13.2. Estandarización de muestras para ensayos de DotBlot.....	30
13.3. Análisis de la expresión de GT's .....	39
14. Discusión .....	48
15. Conclusiones.....	52
16. Bibliografía.....	53

## Resumen

El parásito protozoario obligado del género *Leishmania*, es el responsable de un gran espectro de enfermedades zoonóticas conocidas como leishmaniasis, infectando principalmente macrófagos de los tejidos del hospedero mediante la transmisión por un insecto vector díptero hematófago correspondiente a alguna especie de los géneros *Lutzomia* o *Flebotomus*. Este parásito presenta dos estadios en su ciclo de vida que le permiten sobrevivir a los distintos medios en los que se desarrolla; en el intestino medio y las glándulas salivales del vector, y en la matriz extracelular y los macrófagos dentro del mamífero hospedero. Se ha descrito que en el momento de la infección, los promastigotes de *Leishmania mexicana* interactúan con componentes de la matriz extracelular, principalmente con colágena de tipo I por medio de moléculas específicas. Esta interacción induce la secreción de una matriz cuyos componentes son glicoconjugados, lo cual sigue la inducción de la expresión de glicosiltransferasas (GT's) en esta etapa de la infección. Por lo que fue importante analizar la expresión de las GT's en promastigotes de *L. mexicana* cuando interactúan con colágena, e identificar aquellas que se activan con el fin estudiar su papel en la biología y virulencia del parásito, para diseñar estrategias para su inhibición. Para lo cual se realizaron estudios *in silico* para conocer aquellas secuencias que puedan pertenecer al grupo de las GT's y se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Además se determinaron los tiempos en los cuales hay una mayor expresión de glicoconjugados, presumiblemente sintetizados por las enzimas GT's en cultivos de promastigotes de *L. mexicana* en interacción con colágena. Finalmente se analizó la expresión génica de las GT's mediante RT-PCR punto final. Los resultados muestran que los promastigotes de *L. mexicana* en interacción con colágena, expresan y secretan glicoconjugados, y que 29 de las 38 secuencias identificadas se expresan cuando los promastigotes de *L. mexicana* interactúan con colágena durante 2 horas.

## Abstract

The obligate protozoan parasite of the genus *Leishmania*, is responsible of a large spectrum of zoonotic diseases known as leishmaniasis. There are at least 20 species of *Leishmania*, of which, 14 affect the human, mainly infecting macrophages of host tissues through the transmission by a hematophagous dipterous vector insect corresponding to different species of the genus *Lutzomia* or *Flebotomus*. This parasite presents two stages in its life cycle that allow it to survive inside different environments in which it develops; in the midgut and salivary glands of the vector, and in the extracellular matrix and macrophages within the mammal host. It has been described that at the time of infection, *Leishmania mexicana* promastigotes, interact with components of the extracellular matrix, mainly with type I collagen through specific molecules. This interaction induces the secretion of a matrix whose components are glycoconjugates, which follows the induction of the expression of glycosyltransferases (GT's) at this stage of infection. Therefore it was important to analyze the expression of the GT's in *L. mexicana* promastigotes when they interact with collagen, and to identify those that are activated in order to study their role in the biology and virulence of the parasite, in order to design strategies for its inhibition. For that, *in silico* studies were carried out to know those sequences that may belong to the GT group and to design oligonucleotides specific for each one. In addition, we determined the time in which there is a greater expression of glycoconjugates, presumably synthesized by GT's enzymes in cultures of *L. mexicana* promastigotes in interaction with collagen. Finally the gene expression of the GTs was analyzed by endpoint RT-PCR. Results show that *L. mexicana* promastigotes, in interaction with collagen, express and secrete glycoconjugates, and 29 of the 38 sequences identified are expressed when *L. mexicana* promastigotes interact with collagen during 2 hours.

## 1. INTRODUCCIÓN

El parásito protozoario obligado del género *Leishmania*, es el responsable de un gran espectro de enfermedades zoonóticas conocidas como leishmaniasis; al menos existen 20 especies de *Leishmania*, de las cuales 14 afectan al ser humano infectando principalmente macrófagos de los tejidos del hospedero mediante su transmisión por un insecto vector díptero hematófago correspondiente a alguna especie de los géneros *Lutzomia* o *Flebotomus* (1, 2)

El parásito presenta dos estadios en su ciclo de vida que le permiten sobrevivir a los medios distintos en los que se desarrolla; en el intestino medio y las glándulas salivares del vector y en la matriz extracelular y los macrófagos dentro del mamífero hospedero (1, 2).

La leishmaniasis es una enfermedad de alta prevalencia y es endémica en áreas tropicales, subtropicales y el sur de Europa, en regiones lluviosas de América, Asia y África y en zonas perturbadas por el ser humano (2).

## 2. FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Las manifestaciones clínicas son variables y están relacionadas con la especie infectante, y con la respuesta inmune del hospedero. Cuatro formas clínicas de la enfermedad se han descrito.

### 2.1. Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea (LC) es causada por diferentes especies del género *Leishmania* (*L. major*, *L. tropica*, en el viejo mundo y *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en el nuevo mundo). Las personas pueden ser portadoras de especies de *Leishmania* sin presentar síntomas; en los humanos, el periodo de incubación va de 1 a 2 semanas, pero puede extenderse hasta meses o incluso años. Dependiendo de la especie infectante, se pueden observar úlceras, nódulos lisos, placas planas o lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas. En la LC

la infección está limitada sólo a la piel y al sistema linfático, donde en casos muy raros puede ser el único signo de infección, puede influir en los tejidos más profundos o en las mucosas y estar caracterizada desde una a varias lesiones; el tipo de las lesiones, la eficacia del tratamiento y la rapidez de la cicatrización puede llevar de meses a años (1-3). La evaluación dermatoscópica puede ayudar a distinguir entre las lesiones propias de la enfermedad de otras lesiones clínicas similares, además del examen histológico, en donde se pueden observar claramente a los promastigotes de la especie infectante (1, 3). La LC, se puede curar en individuos inmunocompetentes (3, 4). Aunque la LC puede ser tratada para acelerar la curación, reducir cicatrices, y reducir el riesgo de enfermedad en mucosas, el tratamiento de la enfermedad es a menudo prolongado, esto si la identificación de la enfermedad es óptima; desafortunadamente, los parásitos son identificados sólo en un 70% de los casos. Para el tratamiento se utilizan por lo regular fármacos tópicos, sistémicos o intralesionales (3, 4).

## **2.2. Leishmaniasis difusa**

En la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) las lesiones se dispersan ampliamente por la piel, y generalmente se presentan cuando el huésped se encuentra en estado anérgico, con una pobre respuesta inmune (3-5). La enfermedad comienza con lesiones localizadas que poco a poco se diseminan por todo el cuerpo, donde las áreas que son más comúnmente afectadas son la cara, extremidades superiores e inferiores y la espalda. Las lesiones tienen bordes bien definidos, la ulceración es poco común, pero cuando están presentes, las úlceras son pequeñas y superficiales. Los nódulos aislados o agrupados en diversas morfologías pueden ser clínicamente indistinguibles de otras enfermedades infecciosas como lepra lepromatosa, sífilis o rinoescleroma, e incluso llegan a confundirse con la piel normal, por lo cual se realizan estudios dermatoscópicos observando atrofia de la epidermis y granulomas bien constituidos en la dermis (4, 5). La carga parasitaria en las lesiones presentes es abundante. En América Central es causada más comúnmente por *L. mexicana amazonensis* y, debido a que la LCD afecta principalmente en regiones endémicas, cuando ésta ocurre

fuera de la zona endémica, es importante conocer la historia clínica del paciente, tales como portador de HIV, en donde las infecciones oportunistas promueven un mal diagnóstico; viajes y picadura por alguna mosquita de la arena (3-5). Una evaluación microscópica de amastigotes en raspados realizados con agujas finas es el mejor método inicial para la diagnosis de LCD. El tratamiento es similar al de la LC, sin embargo, se acompaña con antimonios pentavalentes. Los tratamientos suelen ser largos y el antimonio suele ser tóxico (3-5).

### **2.3. Leishmaniasis mucocutánea**

La leishmaniasis mucocutánea (LM) generalmente está presente en zonas endémicas de *Leishmania*; en Latinoamérica, es producida por *L. braziliensis braziliensis* y, con menor frecuencia, por *L. panamensis* (5-7) Este tipo de leishmaniasis aparece después de algunos meses o hasta 10 años después de la cicatrización de la forma cutánea, la cual posiblemente pasó de manera desapercibida y en ocasiones se presenta cuando las lesiones cutáneas aún están presentes. Los signos iniciales son eritema y ulceraciones en los orificios nasales, seguidos por inflamación destructiva. Las lesiones en mucosa se inician en el septum nasal, raramente en el piso de la nariz y, en ocasiones se puede observar en vías aéreas superiores. Inicia con una perforación potencial, destrucción en la nariz y se puede extender hasta la faringe y la laringe (5-7). Al inicio, sólo se aprecia secreción de moco, luego se produce la inflamación de la mucosa que se vuelve eritematosa, edematosa y dolorosa, la lesión se profundiza y produce pericondritis. Si no hay tratamiento la enfermedad puede llevar a la muerte (8).

## **3. EPIDEMIOLOGÍA**

La leishmaniasis es una enfermedad de amplia distribución geográfica en el mundo y abarca desde zonas tropicales, subtropicales y áridas, la incidencia ha aumentado notablemente (hasta un 500%) en los últimos años según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) [WHO 2016].

Al año, se reportan 1.5 millones de nuevos casos de leishmaniasis, un millón de LC y 500,000 de LV, entre los cuales ocurren hasta 20,000 muertes anuales, siendo los países más afectados Afganistán, Argelia, Arabia Saudita, Irán, Sudán y Siria en el Viejo Mundo, y Brasil y Perú en el Nuevo Mundo (9-11). Las especies y subespecies del patógeno varían según la región. Especialmente en el viejo mundo ha habido un incremento en el número de infecciones, debido presumiblemente a la coinfección con VIH, lo que empeora significativamente el diagnóstico para ambas infecciones [WHO 2016, IDRE 2016]. La leishmaniasis se considera una de las enfermedades infecciosas más importantes, ya que no existe un control adecuado (9, 10). En México, la enfermedad no es de notificación obligatoria, por lo que no existe un registro oficial, sino un sub-registro nacional. Los estados del sureste mexicano son los más afectados por este padecimiento (12).

En México, entre el año 2006 y 2011, se realizó un perfil epidemiológico de leishmaniasis, analizando bases de datos de Egresos Hospitalarios del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), así como defunciones y los anuarios de morbilidad. Siendo el sureste de la República el más afectado; los estados reportados con mayor número de casos fueron Tabasco y Quintana Roo con una disminución en 2011, sin embargo, el estado con más porcentaje de mortalidad fue Chiapas con 41% de los casos, seguido por Tabasco con un 16%. El grupo de edad más afectado fue el de aquéllos que tenían entre 25 y 44 años y en su mayoría de sexo masculino, posiblemente por su actividad en el campo (11, 12).

#### **4. TRATAMIENTO**

La leishmaniasis es tratable, sin embargo, la terapia antileishmanial es un tema desconcertante debido principalmente a las variaciones clínicas de la enfermedad. Muy pocos fármacos contra la enfermedad se han ensayado en la clínica y pocas de las muchas combinaciones de especies, síndromes y regiones geográficas han sido estudiadas. Los fármacos más efectivos son potencialmente tóxicos y su

administración es aún más compleja. Tratamientos locales y sistémicos están disponibles (1, 5, 7).

El tratamiento para la leishmaniasis cutánea puede ser complicado debido a la rápida recuperación del paciente y el no poder identificar signos y síntomas de la enfermedad. Para muchos casos, la decisión acerca de cómo tratar al paciente implica una extrapolación de estudios para saber cuál es el tratamiento más relevante para el paciente en cuestión (13, 14).

La elección de la terapia es con base en la especie y subespecie de *Leishmania* y en el estado inmunológico del paciente. Con el objetivo de simplificar el tratamiento, las lesiones se clasifican en simples y complejas. Una lesión compleja debe cumplir con al menos uno de los siguientes criterios: están presentes más de tres lesiones de más de 4 mm de diámetro cada una, lesiones en áreas de la piel cosméticamente y funcionalmente delicadas (cara, articulaciones, zonas mucocutáneas), presentan linfagitis o linfadenitis, lesiones recalcitrantes. Para los pacientes con lesiones complejas, así como recurrentes, cutánea difusa o mucocutánea, debe realizarse un tratamiento sistémico; por otro lado, pacientes con lesiones simples pueden ser tratados sólo con métodos locales. Personas inmunodeprimidas son generalmente tratados sistémicamente (14).

## **5. CICLO DE VIDA**

*Leishmania* sp., completa su ciclo biológico usando dos huéspedes: el primero, principalmente silvestre, en el que *Leishmania* circula entre los reservorios naturales y mantiene el ciclo con la participación de los vectores propios de la zona endémica. En un segundo ciclo, los vectores infectados pueden infectar al hombre y a los animales domésticos. Se puede producir un tercer ciclo, en el que el propio enfermo con leishmaniasis se constituye en reservorio (13, 14).

El ciclo comienza cuando el insecto vector, moscas de la arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomia* ingieren sangre de un vertebrado infectado para alimentarse y ésta contiene macrófagos infectados con amastigotes; los parásitos migran a través del tracto digestivo hasta llegar al intestino medio donde se da la

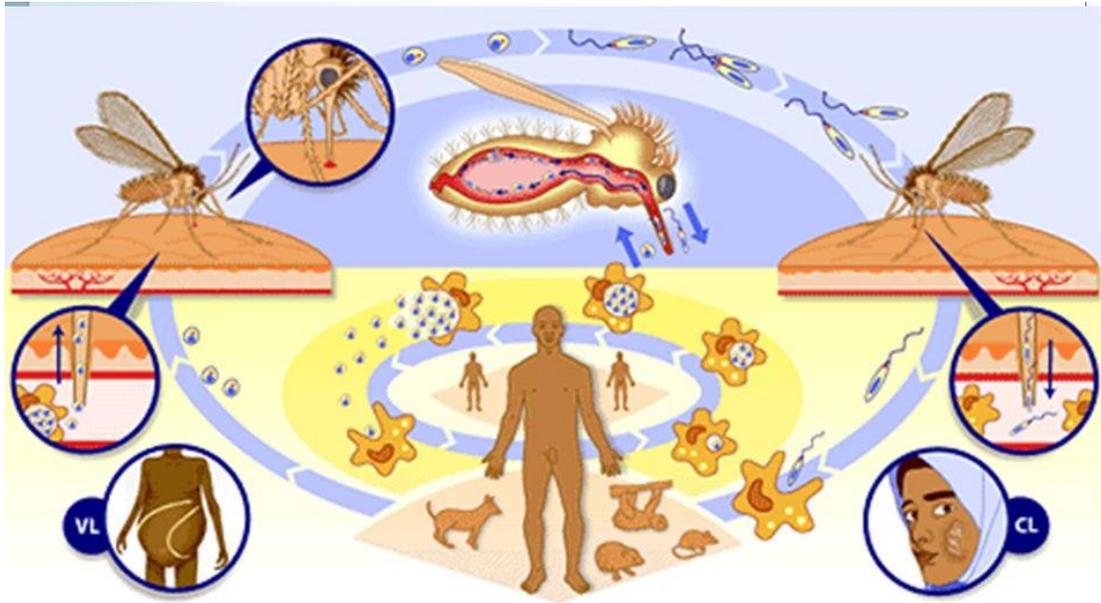
transformación del amastigote a promastigote, la cual ocurre entre las siguientes 24 – 48 horas. Una vez alcanzado el estadio de promastigote, éstos se reproducen activamente por fisión binaria longitudinal en el intestino del insecto, la reproducción comienza desde el lumen aunque algunos quedan adheridos a la pared mediante hemidesmosomas. La localización específica de los parásitos en el intestino varía según la especie y el hospedero.

Después de la replicación en el intestino, en un proceso llamado metaciclologénesis, los promastigotes eventualmente dejan de reproducirse y migran al esófago y a la faringe; en el tubo digestivo de la hembra del vector, los promastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte anterior, que es casi de igual tamaño que el cuerpo. El núcleo se localiza en el centro de la célula y el cinetoplasto entre el núcleo y la extremidad anterior somática; el rizonema parte del cinetoplasto y se continúa con el flagelo libre.

El vector hembra pica e inyecta entre 10 y 100 promastigotes presentes en la probóscide y penetran en la dermis, en los vectores excesivamente infectados, la probóscide permanece congestionada, lo que hace difícil la alimentación del insecto por lo que realiza diferentes picaduras y diferentes inoculaciones.

Cuando son inoculados en la piel, los promastigotes de *Leishmania* interactúan con células residentes, macrófagos, queratinocitos y células dendríticas. Los promastigotes son rápidamente fagocitados por los macrófagos de la dermis a través del mecanismo de activación de la vía del complemento y por vía de los receptores CR3, una vez fagocitados, eventualmente se transforman en amastigotes, primero se inicia la replicación del cinetoplasto, posteriormente el núcleo y finalmente el citoplasma. La cantidad de amastigotes puede llegar a los 200 lo que ocasiona la ruptura del macrófago. En los macrófagos infectados, los amastigotes se alojan en vacuolas parasitóforas ácidas; al igual que otros microorganismos, *Leishmania*, ha desarrollado mecanismos que evaden el ambiente hostil dentro de la vacuola, como el estallido microbicida oxidativo.

Los amastigotes libres infectan nuevas células del sistema fagocitario del hospedero. El ciclo se repite con una nueva picadura a un vertebrado infectado. (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Leishmania* sp., el insecto vector pica al mamífero vertebrado, los promastigotes activan señalizaciones que atraen a los macrófagos que los fagocitan y posteriormente, los promastigotes se transforman a amastigotes y se replican, una vez que se replican en las vacuolas parasitóforas, son expulsados del macrófago; el ciclo se repite cuando una mosquita pica y se infecta con amastigotes que se diferencian en promastigotes y migran hasta el intestino medio (Dolabela, 2014).

## 6. MOLÉCULAS DE SUPERFICIE Y VIRULENCIA

Para que *Leishmania* se pueda propagar el parásito debe evitar su destrucción, primero en el intestino del vector, donde el organismo podría ser susceptible a las enzimas digestivas y, después en la sangre del huésped vertebrado donde el parásito se encuentra en forma transitoria y estaría expuesto a la vía lítica del complemento, y por último en el fagolisosoma de los macrófagos donde sería vulnerable a las enzimas hidrolíticas y el estallido microbicida oxidativo (13-15). Los detalles moleculares de cómo este patógeno persevera con impunidad en condiciones hostiles, está empezando a ser comprendido. Los glicoconjugados de la superficie celular juegan un papel importante en la supervivencia del *Leishmania* a lo largo de su existencia (14, 15). Los promastigotes, sintetizan gran cantidad de fosfoglicanos ya sea, acoplados a la superficie celular a través del anclaje de fosfatidilinositol (como el lipofosfoglicano); o secretados como proteínas que contienen glicoconjugados (14-16).

### 6.1. Lipofosfoglicano (LPG)

El LPG es el principal glicoconjugado que se expresa en la superficie celular de los promastigotes, incluido el flagelo, y está organizado como un glicocalix filamentoso. Es una molécula que consiste de cuatro dominios: un ancla de lípidos fosfatidilinositol; un núcleo de fosfosacáridos; una región de sacáridos fosforilados repetidos (PG) y una estructura pequeña de oligosacáridos cap. El resto de PG de todos los LPG, comparten una misma columna vertebral que consiste en unidades de disacáridos repetidos (17,18).

La capa de LPG es una estructura especializada y diseñada para la sobrevivencia de las fases extracelulares del parásito (18, 19). Además del LPG, las unidades repetidas de PG son incorporados en otras moléculas, las cuales no solo forman parte de la superficie del parásito, sino que también se secretan como unidades repetidas polimerizadas o como proteínas enlazadas a PG (19). Las sustancias secretadas glicoconjugadas de tipo LPG, llamadas colectivamente factores de excreción, están presentes en todos los medios condicionados de parásitos de

*Leishmania* y se pueden organizar en categorías. Algunas de las moléculas que se pueden encontrar secretadas, son aquéllas que interactúan con albúmina, las cuales tienen una similitud con las moléculas de LPG que están en la superficie del parásito y se creó que la porción lipídica del LPG es la que interactúa con la sección hidrofóbica de la albúmina (17-19). Como segunda categoría, las unidades de sacáridos repetidos del LPG, comprenden una cadena de carbohidratos de una fosfatasa ácida secretada. La tercera categoría de sustancias es un fosfoglicano (exPG) que es idéntico al LPG, sólo que carece del ancla lipídica, el núcleo de fosfosacáridos y algunas unidades repetidas (18, 19).

Dada la estructura del LPG y su gran cantidad de dominios inusuales, se sugiere que podría tener más de una función que ayude al parásito a llevar a cabo procesos importantes dentro de su ciclo de vida (17-19).

La diferenciación y la multiplicación de los promastigotes se llevan a cabo en el intestino medio de los vectores, lugar en donde el LPG puede proteger a los promastigotes contra la actividad hidrolítica del intestino, así como la fijación al mismo y evitar que sean excretados (19-21). Entre el tiempo de inoculación e infección de los macrófagos, los promastigotes están expuestos a los efectos líticos de la vía del complemento, sin embargo, el LPG puede participar como un estimulador y controlador de la vía, al ser el aceptor molecular del componente C3, lo que lo hace resistente y evita la destrucción en esta fase de infección; además el LPG funge un papel importante en el acoplamiento a los macrófagos y a la internalización, debido a la conversión del componente C3 a C3b a través de la activación de la vía clásica y de la subsecuente unión mediada por CR1 y su posterior internalización (18, 20, 21).

## **6.2. Fosfolípidos de glicoinositol**

Los fosfolípidos de glicoinositol (GIPL's), aunque tienen bajo peso molecular, están presentes en diez veces más copias que aquéllos que presentan LPG; su estructura de anclaje encontrada en todos los eucariotas, está unida a una parte de glicerolípido que asegura el anclaje a la membrana celular (22, 23). Además la glicosilación de su residuo de manosa es dependiente de las especies de

*Leishmania* (19, 23, 24). Existen tres familias principales dependiendo de si la estructura de oligosacáridos es próxima a las proteínas GIP de anclaje (GIPL tipo 1) o cercanas al núcleo del LPG (GIPL tipo 2) o si el glicósido es un híbrido de los dos anteriores (GIPL tipo 3) (24). El número de copias permanece constante durante el ciclo de vida del parásito, siendo los GIPL los principales glicoconjugados de superficie en amastigotes. Los GIPL's pueden tener influencia variable en la sobrevivencia del parásito, dependiendo de la especie y/o del estadio del parásito (25).

### **6.3. Glicoproteínas con anclaje glicofosfatidilinositol (GPI)**

Dentro de esta categoría, se han estudiado dos glicoproteínas principales. La GP63, también llamada leishmanolisina, proteína de superficie de promastigote (PSP) o proteína de superficie principal (MSP); una proteasa que está mayormente presente en la membrana celular de la superficie del promastigote, mientras que en amastigotes se encuentra principalmente en la bolsa flagelar (25, 26). El papel de esta metaloproteasa no es claro ya que su accesibilidad es limitada debido al recubrimiento de los componentes del LPG; sin embargo es capaz de modificar los alrededores de la matriz extracelular permitiendo un mejor movimiento en los tejidos; confiere protección contra la lisis mediada por el complemento y participa en la internalización en los macrófagos (26). Por último, la GP46 o antígeno de superficie de promastigote (PSA), la cual está involucrada en el acoplamiento de los parásitos con los macrófagos y en su internalización (26, 27).

### **6.4. Proteofosfoglicanos (PPG's) y fosfatasas ácidas secretadas (sAPS)**

Estas dos proteínas son altamente glicosiladas pero en forma diferente a las glicosilaciones típicas ya que son fosfoglicosiladas y presentan entidades unidas a residuos de serina o treonina, un patrón desconocido en microorganismos pluricelulares (26, 27). Dentro del insecto vector, estas proteínas son muy eficientes en la protección contra enzimas digestivas (27, 28). Los proteofosfoglicanos pueden existir en diferentes formas: unidos a membrana

(mPPG), secretados (sPPG) o filamentosos (fPPg); la forma filamentosa juega un papel vital, el cual asegura protección dentro del insecto. Los amastigotes de *L. mexicana* carecen de LPG y sAPS produciendo complejos ramificados de PPG's que contribuyen a la expansión de las vacuolas parasitóforas en macrófagos (19, 28).

## **7. INTERACCIÓN EN EL HUÉSPED VERTEBRADO**

Los estudios de la interacción de *Leishmania* con el hospedero vertebrado, se han enfocado en la interacción de los promastigotes con sus objetivos celulares: macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y queratinocitos; sin embargo, en etapas tempranas de la infección y después de la picadura del insecto, los promastigotes pueden ser depositados en la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) de la dermis y en la sangre y las proteínas de la membrana basal antes de infectar a sus objetivos celulares.

### **7.1. Matriz extracelular**

La ECM es una red específica de biomoléculas que dan forma y atributos físicos a los tejidos, también actúa como un señalizador ambiental para las células que interaccionan con esta estructura (29, 30). La capa basal de la epidermis está acoplada a la membrana basal, la cual sobrepone a la capa del tejido tisular conocido como la dermis. La composición y la forma de la ECM influyen en el desarrollo celular, en la sobrevivencia, la diferenciación y la proliferación, así como en la migración celular y en la invasión de tejidos (29, 30). La colágena tipo I es el principal componente de la ECM de la piel y los fibroblastos son las células encargadas de su síntesis y organización (29-31). El otro componente importante, es la membrana basal, ésta se compone de laminina y colágena tipo IV, la cual separa a la dermis del tejido epitelial (30, 31).

Una vez que ocurre la picadura de la mosquita y, al haber daño, se activa la curación de la zona dañada, la cual requiere de la acción de fibroblastos, células inmunes, factores de crecimiento, citocinas y componentes de la matriz. Al

dañarse la estructura de la piel ocurre una ruptura de la dermis y capilares, se crea un “pool” sanguíneo que contiene componentes de la ECM del tejido, sangre y diferentes células (29, 30). El entorno de la herida atrae macrófagos, principales hospederos de *Leishmania* y neutrófilos, todo ocurre en una acción sincronizada por los promastigotes que involucra a las células inmunes y componentes de la ECM ya que son requeridas para el proceso de infección (31).

## **7.2. Interacción entre *Leishmania* y componentes de la matriz extracelular**

Estudios *in vitro*, demuestran la capacidad de *Leishmania* para acoplarse y moverse a través de los complejos de colágena I, dicho acoplamiento ocurre de manera dosis dependiente indicando la presencia de un receptor de superficie del parásito. Además, la invasión del parásito en colágena I lleva al remodelamiento de la misma posiblemente mediada por metalo y cisteína proteinasas (16, 19, 20). Una de las principales características de la EMC es su rigidez, la cual disminuye la migración de los promastigotes; esto indica que los parásitos necesitan secretar proteasas para descomponer los complejos de colágena rígida para facilitar la migración. Durante la fase crónica de la infección, la colágena tipo I es cambiada por colágena tipo III, lo que puede indicar la presencia de una matriz más suave que facilitaría la migración parasitaria. Por el contrario, una disminución de colágena tipo III lleva a la formación de una cicatriz y a la diferenciación de miofibroblastos (29, 30).

Los glicosaminoglicanos, componentes de la ECM de mamíferos, usualmente asociados con proteínas dan como resultado proteoglicanos que participan en la reparación del tejido, evitan la pérdida de agua y por consiguiente, previenen la compresión del tejido y regulan la migración y sobrevivencia celular (30, 31).

Los promastigotes también se unen a heparán sulfato y a heparina, presentes en las uniones epiteliales de la piel y la dermis. La complejidad de la ECM y el sitio de la picadura del vector complican la infección cuando se considera la formación de fibrosis mediada por fibroblastos, esto reduce la migración y la propagación de los promastigotes en la dermis (29, 31). A pesar de que se ha reportado la unión de *Leishmania* a una matriz de fibrina y fibrinógeno, posiblemente el mayor problema

sea el remodelamiento de la matriz de colágena por los fibroblastos debido a la estimulación del factor de crecimiento proveniente de los macrófagos (16, 30, 31). Se ha mostrado que los promastigotes migran en colágena tipo I antes de su internalización a los macrófagos, pero es más rápida la infección cuando los macrófagos están presentes. Posiblemente la secreción de citocinas puede ser quimiotáctica para *Leishmania* en modelos de invasión *in vitro* en colágena (16, 31).

Otra proteína de la ECM involucrada en la interacción con *Leishmania* es la fibronectina (FN), una glicoproteína adhesiva encontrada en la sangre y en los tejidos conectivos, y cuya expresión se incrementa en el tejido infectado por *Leishmania* en modelos murinos (30). Las proteínas de superficie de promastigotes y amastigotes, se unen a la fibronectina por medio del dominio de unión celular RGD, facilitando la captación de monocitos. Así mismo, la ECM presenta en la sangre el sistema plasminógeno-plasmina-fibrina (29, 30). El coágulo sanguíneo formado post-picadura, provee también una matriz provisional a los neutrófilos y macrófagos, por tanto, los promastigotes deben escapar de la red de fibrina y al mismo tiempo acercarse a sus células blanco (30).

Los promastigotes pueden unir también a la plasmina y al plasminógeno gracias a una enzima metabólica ubicua, la enolasa, secretada en vesículas exocíticas implicadas en la comunicación parásito-macrófago. Sin embargo las vesículas asociadas a plasminógeno pueden atrapar macrófagos, permitiendo a los parásitos moverse dentro de la dermis (30,-32).

Se ha demostrado que los promastigotes de *L. mexicana* se unen a colágena tipo I desnaturalizada y nativa, de manera específica y saturable, y tienen la capacidad de moverse y penetrar entre las fibras de un gel de colágena y en un corte de piel de ratón. Utilizando cromatografía de afinidad con columnas de colágena tipo I acoplada a sefarosa, se identificaron varias moléculas del parásito, y anticuerpos anti-proteínas de unión a colágena reconocieron principalmente las proteínas de 120 kDa y 18 kDa. Estos anticuerpos reconocieron antígenos en la superficie celular del parásito. Por otro lado, la unión de los promastigotes a la colágena induce la secreción de una gran cantidad de vesículas que se asocian con la

colágena desorganizada del exterior, y los parásitos secretan una matriz rica en glicoconjugados que se adhieren a colágena con alta afinidad y poseen una naturaleza muy hidrofóbica (32).

## **8. GLICOSILTRANSFERASAS**

La gran complejidad de varias estructuras de oligosacáridos encontrados en la naturaleza, se deriva de la acción ordenada de la formación y rompimiento de enlaces glicosídicos debido a la actividad de las glicosiltransferasas, glicosidasas, glican fosforilasas y polisacárido liasas. En comparación con las estrategias bien caracterizadas usadas por glicosidasas para la hidrólisis de los enlaces glicosídicos, el mecanismo de las glicosiltransferasas responsables de la formación del enlace glicosídico no está bien estudiado (33, 34).

Las glicosiltransferasas (GT's) son las enzimas responsables de crear la diversa y compleja variedad de oligosacáridos y glicoconjugados que se encuentran en la naturaleza. Las GT's catalizan la formación de enlaces glicosídicos entre un azúcar y su aceptor, el cual puede estar entre un amplio rango de biomoléculas, incluidas otros azúcares, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas pequeñas (33, 34).

### **8.1. Clasificación, estructura y funciones de las GT's**

Dos resultados estereoquímicos son posibles para las reacciones que resultan en la formación de un enlace glicosídico, en donde la configuración anomérica del producto puede ser retenida o invertida según el sustrato. Las familias de glicosiltransferasas se clasifican en función de su estructura, similitudes en la secuencia de aminoácidos y del resultado estereoquímico de las reacciones que catalizan. Existen registradas en bases de datos más de 12,000 secuencias conocidas y putativas que se clasifican en más de 100 familias de GT's, sin embargo aún no se conocen todas las secuencias y las familias van en aumento con el descubrimiento de nuevos genes que codifican GT's (34, 35).

Se han encontrado diferencias en el número y la función de las GT's entre familias; algunas familias comprenden un amplio número de secuencias de varios orígenes con diversas funciones. Por el contrario, otras familias son monofuncionales y contienen pocas secuencias (36). En el caso de las familias monoespecíficas, las secuencias similares se observan generalmente en todo el dominio catalítico, mientras que en las familias poliespecíficas, las secuencias están restringidas sólo a una porción del dominio catalítico. La predicción de la función y clasificación de cada GT puede causar problemas, debido a que existen secuencias muy parecidas que presentan diferente actividad catalítica (35, 36).

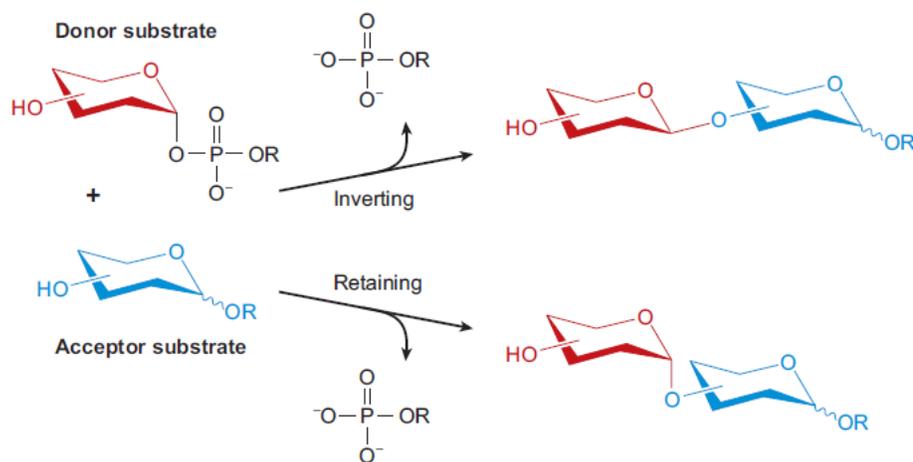
Las enzimas que catalizan la transferencia del grupo glicosilo se clasifican como de inversión o retención (35-37) (Figura 2). Al igual que la inversión de glucósido hidrolasas, la estrategia empleada para la inversión por las glicosiltransferasas es el de una reacción SN2 como desplazamiento directo. Un sitio activo de la cadena lateral sirve como un catalizador básico que desprotona al nucleófilo entrante del aceptor, facilitando el desplazamiento directo de tipo SN2 del fosfato activado del grupo saliente (37-39). Al igual que en las GT's de inversión, los mecanismos de las GT's de retención se comparan con las glicosidasas y se ha propuesto que el mecanismo es de doble desplazamiento que involucra a un enlace covalente intermedio glicosil-enzima demandando la existencia de un nucleófilo posicionado adecuadamente dentro del sitio activo (37, 38, 40).

Como se ha hecho para otras clases de enzimas, las GT's se clasifican con base en las similitudes en las secuencias de aminoácidos. Dos pliegues generales, llamados GT-A y GT-B se han identificado en todas las estructuras de las glicosiltransferasas nucleótido-dependientes (Figura 3), por lo que se prevé que cada una de las nuevas GT's que aún no están caracterizadas tengan uno de los dos pliegues, lo que indica que cada una de las glicosiltransferasas han evolucionado a partir de un pequeño número de "secuencias progenitoras" (40-42).

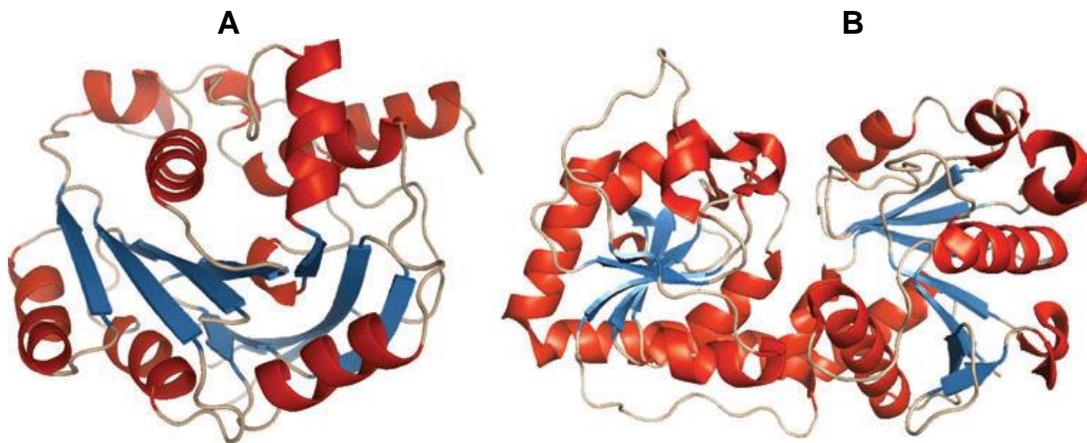
El pliegue descrito como GT-A consiste de una hoja  $\beta$  enrollada y abierta, rodeado de  $\alpha$  hélices, en ambos lados; la arquitectura general del pliegue GT-A es un reminiscente de dos pliegues continuos tipo Rossmann, típicos de proteínas de

unión a nucleótidos; dos dominios  $\beta/\alpha/\beta$  fuertemente asociados, los tamaños de los cuales varían, se apoyan estrechamente, dando lugar a la formación de una hoja  $\beta$  continua central. Se encontró que el pliegue general de esta proteína era homóloga a la de la glucógeno fosforilasa, y ahora, debido a que se han observado nuevas glicosiltransferasas, el pliegue encontrado se ha denominado GT-B. Al igual que el pliegue GT-A, la arquitectura de las enzimas GT-B se compone de dos dominios  $\beta/\alpha/\beta$  tipo Rossmann; sin embargo, en este caso, los dos dominios se asocian con menor fuerza y se encuentran uno frente a otro con el sitio activo dentro de la hendidura resultante (43-45).

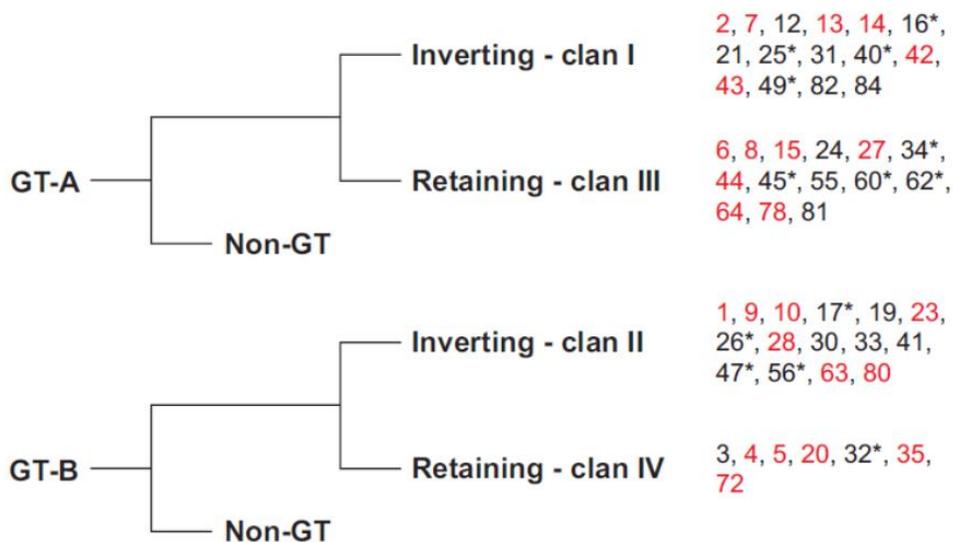
A la fecha se ha propuesto la clasificación de las GT's mostrada en la figura 4. Las familias están clasificadas en clanes de acuerdo a su estructura y actividad. Miembros de 12 familias no incluidas adoptan un plegamiento propuesto como GT-C, y con las restantes 26 familias no se ha esclarecido su estructura 3D (43-45).



**Figura 2.** Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de grupo glicosil, ya sea con inversión o retención de la estereoquímica anomérica con respecto al azúcar donante (48).



**Figura 3.** Pliegues generales de las glicosiltransferasas, A) Pliegue GT-A representado por la enzima de inversión SpsA de *Bacillus subtilis*, y (B) el pliegue GT-B, por la glicosiltransferasa  $\beta$  del bacteriófago T4 (48).



**Figura 4.** Clasificación de las glicosiltransferasas, propuestas por Coutinho, Las familias se clasifican en clanes sobre la base de su pliegue y actividad. Familias que tienen miembros con estructuras en 3-D se indican en rojo. Las familias restantes son los que predijeron ya sea el pliegue GT-A o el pliegue GT-B (48).

## 9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito que en el momento de la infección los promastigotes de *Leishmania mexicana* interactúan con componentes de la matriz extracelular, principalmente con colágena tipo I por medio de moléculas específicas. Esta interacción induce la secreción de una matriz cuyos componentes son glicoconjugados hidrofóbicos con afinidad a colágena, lo cual sigue la activación de glicosiltransferasas en esta etapa de la infección. Por lo que es importante analizar la expresión de las glicosiltransferasas en promastigotes de *L. mexicana* cuando interactúan con colágena.

## 10. HIPÓTESIS

La interacción de los promastigotes de *Leishmania mexicana* con colágena induce la expresión de glicosiltransferasas.

## 11. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Analizar la expresión de glicosiltransferasas en promastigotes de *Leishmania mexicana* en interacción con colágena.

### Objetivos particulares

- Analizar *in silico* el genoma de *Leishmania mexicana* para la identificación de genes que codifiquen para glicosiltransferasas.
- Determinar la presencia de glicoconjugados asociados a los promastigotes y secretados, cuando éstos se cultivan con colágena.
- Estudiar la expresión de las glicosiltransferasas en los promastigotes de *Leishmania mexicana* en interacción con colágena.

## 12. METODOLOGÍA

### 12.1. Análisis *in silico*

Se identificaron las proteínas de familias de glicosiltransferasas de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 y de *Leishmania infantum* JPCM5 en la base de datos CAZy.org. Posteriormente se obtuvieron en formato FASTA cada una de las secuencias tanto de la proteína como de su respectivo gen. Utilizando como sonda a cada una de las secuencias de proteínas registradas para ambas especies de *Leishmania*, se buscaron mediante análisis BLAST en la base de datos TryTripDB 0.9, en el genoma de *L. mexicana* a cada una de las posibles familias de GT's. En la misma base de datos se analizaron los genomas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, y tres cepas diferentes de *Trypanosoma cruzi*.

El alineamiento de secuencias de PTPLMW de distintas especies se realizó con el programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

Para el diseño de oligonucleótidos específicos para cada gen de *L. mexicana* que codifica para GT's, se utilizó el programa NCBI-Primer-Blast tomando en cuenta los criterios principales para el diseño de cada par de oligonucleótidos; tamaño, cantidad de C-G, temperatura de alineamiento, evitar la auto-complementariedad. Además se diseñaron oligonucleótidos para genes que codifican para las proteínas que se expresan en promastigotes (cisteína proteinasa y proteína de la red paraflagelar), amastigotes (cisteína proteinasa y amastina) y en ambos estadios, (actina, GAPDH y  $\alpha$ -tubulina).

### 12.2. Parásitos

Se utilizó una cepa de *Leishmania mexicana* aislada de las lesiones de un paciente con leishmaniasis cutánea, donada por el Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales de México.

### **12.2.1. Cultivos de promastigotes de *L. mexicana*.**

Los promastigotes de *L. mexicana* se cultivaron axénicamente a 28 °C en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, con 10 ml de Medio RPMI- 1640 (GIBCO BRL NY USA), pH 7.4, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (100 µl penicilina y 50 mg/ml estreptomina). Cada 8 días se renovaron los cultivos dependiendo del crecimiento del parásito. Estos fueron cultivados y mantenidos a 28 °C hasta que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

### **12.2.2. Cultivos de promastigotes de *L. mexicana* en interacción con colágena.**

Se preparó gelatina comercial proveniente de piel de cerdo (gel strength 300, Type A) a una concentración de 1 mg/ml en agua desionizada, se incubó durante 20 minutos a 37 °C y posteriormente se esterilizó durante 20 minutos a 15 lb/pg<sup>2</sup>, se adicionaron 10 ml de gelatina a cajas Corning de 25 cm<sup>2</sup> y se dejaron en esterilidad durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se removió la solución de gelatina y se adicionó medio RPMI-1640 con SFB, posteriormente se inocularon 10 x 10<sup>6</sup> promastigotes de *L. mexicana* en cada caja.

### **12.3. Ensayos de DotBlot**

A diferentes tiempos post-inoculación se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos, las cuales se centrifugaron en microcentrífuga (centrifugue 5415 C eppendorf) a 2,500 rpm durante 5 min para separar al medio de cultivo (sobrenadante) y a los parásitos (pastilla). Una vez retirado el sobrenadante, los promastigotes se resuspendieron en 1 ml de PBS.

Para estandarizar los ensayos de dot-blot, se tomaron alícuotas del medio de cultivo de parásitos que interactuaron con colágena (10, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 µl) y se agregaron en pozos diferentes de la cámara Bio-Dot de 64 pozos (Bio-Rad, microfiltration apparatus) que previamente fue montada con membrana de nitrocelulosa sobre papel filtro Whatman. Posterior a la absorción del medio de

cada pozo, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron de dos formas distintas: tinción PAS y tinción con rojo de rutenio. Como control negativo, se utilizaron alícuotas en mismas cantidades sólo de medio sin parásitos.

#### **12.3.1. Tinción con Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

Para la tinción de PAS se utilizó el kit 395B (Sigma-Aldrich). La membrana de nitrocelulosa con las muestras absorbidas se lavó con agua desionizada, posteriormente se incubó durante 5 min en la solución de ácido periódico (1 g/dl) a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada. Después se adicionó el reactivo de Schiff y se incubó 15 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se retiró el reactivo y la membrana se lavó durante 5 min con agua común. Finalmente para contra-teñir, la membrana se incubó durante 90 seg en el reactivo de Gill y después se aclaró con agua.

#### **12.3.2. Tinción con Rojo de Rutenio**

La membrana de nitrocelulosa se incubó durante 24 h en la solución de Rojo de Rutenio (Invitrogen) 25 mg/l en KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7.5, después la membrana se lavó con agua desionizada durante 24 h.

La cuantificación del material absorbido y teñido con las dos metodologías se llevó a cabo en el programa GeneTools en donde los valores son medidos por diferencia en la intensidad de pixeles entre zonas teñidas de la membrana, no absorbidas y zonas con las muestras absorbidas.

#### **12.4. Purificación de DNA y RNA**

Para el aislamiento del DNA, se centrifugaron 25 ml del cultivo de promastigotes de *L. mexicana*, a 2000 rpm por 10 min a 4 °C, posteriormente se decantó el sobrenadante y se hicieron dos lavados con PBS en las condiciones ya mencionadas. La pastilla se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl pH 8.8 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0 y SDS 1%) y se agregó RNAsa a la suspensión, la

pastilla se incubó a 37 °C durante 5 h. Se adicionaron 10 mg/ml de proteinasa K y se dejó incubar durante 24 h a 42 °C.

Se agregaron volúmenes iguales de Tris-HCl y fenol saturado pH 8.0 y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min (Eppendorf centrifuge 5415 C), después se removió la fase acuosa; en seguida se adicionaron volúmenes iguales de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1:1 a la fase acuosa, se mezcló y centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y se removió la fase acuosa; posteriormente se agregaron volúmenes iguales en proporción 24:1 de cloroformo y alcohol isoamílico a la fase acuosa, se mezcló y se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 10 min, y se removió la fase acuosa. A la fase acuosa, se le agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló suavemente y se centrifugó a 14,000 por 10 min; finalmente el DNA se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

El RNA se purificó a partir de promastigotes crecidos en medio normal y de promastigotes interaccionados con colágena.

Los promastigotes obtenidos por centrifugación a 2500 rpm durante 5 min se lavaron con PBS y a la pastilla se le adicionaron 500 µl de Trizol, se incubó por 5 min a temperatura ambiente (TA), posteriormente se agregaron 100 µl de cloroformo y se mezcló en vortex por 1 min, la mezcla se incubó por 3 min a TA y se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min a 4 °C; después, la fase acuosa (transparente) la cual contiene al RNA, se separó y se transfirió a un tubo Eppendorf estéril. A esta fase, se le agregaron 250 µl de isopropanol y la mezcla se incubó durante 10 min a TA, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se secó en esterilidad y se resuspendió en agua DEPC (5 µl), finalmente se incubó por 10 min a 60 °C.

## **12.5. PCR y RT-PCR**

Se realizaron ensayos de PCR para estandarizar las condiciones a utilizar (temperatura de alineamiento y concentración de MgCl<sub>2</sub>) con los oligonucleótidos

diseñados para cada gen que codifica para las diferentes secuencias de las familias de glicosiltransferasas. Para cada una de las reacciones se utilizaron condiciones similares, en un tubo estéril se añadió 1 µl de DNA genómico, 1 µl de la mezcla de dNTPs, 1 µl de enzima Taq polimerasa, buffer 10 X 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1-3 mM, 0.5 µl de oligonucleótido “forward” y 0.5 µl de oligonucleótido “reverse”, la mezcla se llevó a 25 µl totales con agua estéril. La reacción de PCR consistió en:

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	35
Alineamiento	XX °C*	30 seg	35
Elongación	72 °C	1 min	35
Elongación final	72°C	7 min	1

\* La temperatura de alineamiento varió para cada par de oligonucleótidos.

Para la reacción de RT-PCR, se sintetizó el cDNA. Brevemente en un tubo limpio y estéril eppendorf de 200 µl, se adicionaron 1 µl de Oligo dT, de 1 a 5 µg de RNA total extraído mediante el método de Trizol y se llevó a 12 µl con agua DEPC estéril. La mezcla se calentó 10 min a 70 °C y después se colocó en hielo rápidamente durante 2 min. Inmediatamente, se agregaron 4 µl de amortiguador de primera cadena 5x, 2 µl de DDT 0.1 M, 1 µl de mezcla de dNTPs 10 mM y se incubó por 2 min a 42 °C. Posteriormente se adicionó 1 µl de enzima SuperScript II, se incubó por 50 min a 42 °C y finalmente se inactivó la reacción por 15 min a 70 °C, las muestras se almacenaron a -70 °C. El cDNA sintetizado se utilizó en la reacción de PCR en las condiciones establecidas para cada par de oligonucleótidos.

### 13. Resultados.

#### 13.1. Análisis *In silico*

El análisis del genoma de *Leishmania mexicana* reveló la presencia de genes que codifican para 38 glicosiltransferasas distribuidas en 16 familias (TABLA 1), 9 de las cuales tienen una GT, 3 tienen 2 GT's, 2 tiene 4 GT's, 1 tiene 7 GT's y 1 tiene 8 GT's.

**TABLA 1. Glicosiltransferasas de *Leishmania mexicana***

Familia	Número de acceso en TriTryp DB
GT1	LmxM.29.0530
GT2	LmxM.36.0220
GT4	LmxM.16.0950 LmxM.33.2420, LmxM.32.1670 LmxM.34.5250 LmxM.30.1885 LmxM.30.1870 LmxM.30.1880
GT11	LmxM.01.0100
GT22	LmxM.12.0140 LmxM.36.1200
GT24	LmxM.08_29.2110
GT25	LmxM.13.0930 LmxM.36.3450
GT40	LmxM.31.3990 LmxM.26.0550 LmxM.25.0010 LmxM.32.0300
GT50	LmxM.29.2030
GT58	LmxM.36.2040
GT60	LmxM.17.1020 LmxM.02.0240
GT66	LmxM.34.1150 LmxM.34.1130 LmxM.34.1160 LmxM.34.1140
GT67	LmxM.07.1170 LmxM.30.3190 LmxM.36.0010 LmxM.25.2460 LmxM.02.0200 LmxM.02.0160 LmxM.02.0170 LmxM.02.0230
GT76	LmxM.18.0960



```

TcCLB.506581.10      VDFVCGTRYGAGVAIDGDWPIHRRVISWGARVLRARPLTPLSDPMSGFFGLPKEVFQRGVR
TcCLB.508169.60      VDFVCGTRYGAGVAIDGDWPIHRRVISWGARVLRARPLTPLSDPMSGFFGLRKEVFQRGAR
Tc_MARK_8468         VDFVCGTRYGAGVAIDGDWPIHRRVISWGARVLRARPLTPLSDPMSGFFGLRKEVFQRGVR
                      *:*****.*: :  : ** **:*:*****:*:****.*****.: . **:* .

LBRM2903_350008400  EVNSIGYKIALELFVKCRVQRFAEAVNFHFSIRTYGESKLTGKVI FNYLQHLALYLFKVG
LbrM.35.0300         EVNSIGYKIALELFVKCRVQRFAEAVNFHFSIRTYGESKLTGKVI FNYLQHLALYLFKVG
LmjF.36.0220        EVNSIGYKIALELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVILHYLEHLYALYLFKLG
LMJSD75_360007300   EVNSIGYKIALELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVILHYLEHLYALYLFKLG
LMJLV39_360007500   EVNSIGYKIALELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVILHYLEHLYALYLFKLG
LTRL590_360007400   EVNSIGYKIALELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVILHYLEHLYSLYLFKLG
LdBPK_360240.1      EVNSIGYKIALELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVI FHYLEHLYALYLFKLG
LinJ.36.0240        EVNSIGYKIALELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVI FHYLEHLYALYLFKLG
LmxM.36.0220        EVNSIGYKIGLELFVKCRVQCFFEEVGFNFATRITYGESKLTGKVILHYLEHLYALYLFKLG
TCDM_01225          DLSPIGYKIALEIFVKCHVQKYEEVGFNFATRMVGESKLTGRVI IHYLKHLRALYLYAFG
TCSYLVIO_009939     DLSPIGYKIALEIFVKCHVQKYEEVGFNFATRMVGESKLTGRVI IHYLKHLRALYLYAFG
TcCLB.506581.10     DLSPIGYKIALEIFVKCHVQKYEEVGFNFATRIVGESKLTGRVI IHYLKHLRALYLYAFG
TcCLB.508169.60     DLSPIGYKIALEIFVKCRVQKYEEVGFNFATRMVGESKLTGRVI IHYLKHLRALYLYAFG
Tc_MARK_8468        ELSPIGYKIALEIFVKCRVQNYEEVGFNFATRMVGESKLTGKVI IHYLKHLRALYLYAFG
                      :..*****.**:*:***:* : **.*:* * *****:*:***:* :***: .*

LBRM2903_350008400  PLFYALLAVTVMFALYLVVFLYHSLF
LbrM.35.0300         PLFYALLAVTVMFALYLVVFLYHSLF
LmjF.36.0220        RLFYV FVVAVLFAIYLLAFLYHSLF
LMJSD75_360007300   RLFYV FVVAVLFAIYLLAFLYHSLF
LMJLV39_360007500   RLFYV FVVAVLFAIYLLAFLYHSLF
LTRL590_360007400   RLFYV FVVAVMFAMYLVAFLYHSLF
LdBPK_360240.1      RLFYV FVVAVMFAMYLVAFLYHSLF
LinJ.36.0240        RLFYV FVVAVMFAMYLVAFLYHSLF
LmxM.36.0220        RLFYV FVVAVMFAYLLAFLYHSLF
TCDM_01225          KWILLVPLLMIFIFFWAVKQVV----
TCSYLVIO_009939     KWILLVPLLMIFIFFWAVKQVV----
TcCLB.506581.10     KWILLVPLLMIFIFFWAVKQVV----
TcCLB.508169.60     KWILLIPLVMIFIFFWAVKQVV----
Tc_MARK_8468        KWVLLIPLVMIFIFLWAVKQFF----
                      .
                      : : : : .

```

**Figura 5.** Identificación del dominio DXD. Alineamiento mediante el programa ClustalW de las secuencias de proteínas de la familia 2 de glicosiltransferasas de los parásitos *L. braziliensis* (LBRM, LbrM), *L. major* (LmjF, LMJSD, LMJLV), *L. tarentolae* (LTRL), *L. donovani* (LdBPK), *L. infantum* (LinJ), *L. mexicana* (LmxM), *T. cruzi* (TCDM, TCSYLVIO, TcCLB, Tc\_MARK).

Este tipo de alineamiento se llevó a cabo con los miembros de cada una de las diferentes familias de GT's con el fin de identificar el dominio DXD y poder predecir la estructura que conforma a cada una de las enzimas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

**TABLA 2. Glicosiltransferasas y dominio DXD.**

<b>Dominio DXD</b>	<b>Sin dominio DXD</b>
<b>GT2, GT4, GT24, GT40, GT50, GT60, GT66, GT67</b>	<b>GT1, GT11, GT22, GT25, GT58, GT76, GT79, GTNC</b>

### 13.1.2. Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de realizar los estudios de expresión de las GT's de los promastigotes en interacción con colágena, era de importancia llevar a cabo un diseño óptimo de oligonucleótidos que fueran específicos para cada una de las proteínas a analizar. Para ello se utilizó el programa Primer-Blast-NCBI, el cual realiza una búsqueda en el banco de datos GenBank de aquellas secuencias de DNA que puedan ser amplificadas con el par de oligonucleótidos diseñados. De esta manera se seleccionan aquellos oligonucleótidos que sean específicos para amplificar la secuencia de DNA blanco. Cada par de oligonucleótidos se diseñó con base en las características apropiadas para un correcto funcionamiento, además de que se emplearon todas las secuencias que se identificaron en primera instancia (TABLA 3).

**TABLA 3. Oligonucleótidos para en estudio de la expresión de las GT's**

<b>FAMILIA</b>	<b>PROTEÍNA</b>		<b>OLIGONUCLEÓTIDOS</b>	<b>PRODUCTO (pb)</b>
GT1	LmxM.29.0530	F	GGACGTGCTGCTCACAAATG	724
		R	GAGATCCAGCTGGTGGTCAG	
GT2	LmxM.36.0220	F	GGGTTTCAACGTGAGCATGG	304
		R	GGACATGGGATCGGAAAGGG	
GT4	LmxM.16.0950	F	GTGAGAGTGTCGGACCACAG	902
		R	CACAAGTCCGAAGGGCTCAT	
	LmxM.34.5250	F	GGGAGGTGAGCCACACTAAC	570
		R	CAGCGAGGTACTCTAGCAGC	
	LmxM.33.2420	F	GAAGCCGCTAATGCTGGTCATC	530
		R	GATGCCCTCAGCCAACAACCTTC	

	LmxM.32.1670	F R	CTCGCGAAAACACCGTTCTG GCCCTGGTTCAAACCCCTCT	371
	LmxM.30.1870	F R	CTACGGGATCGGTGTGATGG CTGGCGAGATCTCCTCAAGC	992
	LmxM.30.1880	F R	CAACGATTTCCCGACCCAC CGCAACACGTCATCAGACAG	445
	LmxM.30.1885	F R	CAAGTGTGTGGTCTCAACCGC GAATAGCGACGTGTCAAGAGTG	725
GT11	LmxM.01.0100	F R	CAAGTACAAGGGTGCCGTGA AGTATCCACCCAGGGCAGTA	282
GT22	LmxM.12.0160	F R	GCCTCCTGTTCTTCCCTGAC GGGAAGCGATACCACTCTCG	436
	LmxM.36.1200	F R	GTCGCTCTTCTTCCCTGCTGT CCAGGTGCCTATAGTGCTGG	854
GT24	LmxM.08_29.211 0	F R	CCGTAGTGGATCCTTCGTCG CCTGCAGCTGGTAGTATCCG	543
GT25	LmxM.13.0930	F R	CACCAATTCTCCCGCCAGTTC GGGCTTCTTCTGGACGTCTG	368
	LmxM.36.3450	F R	GAACTTCTCTCCTCTGGCGAC CGTTGCTCACCTTACCCAGAG	353
GT40	LmxM.26.0550	F R	CACAACGACGTGCGTTTCTTG CATAGAAAAGCCTTGCGGCAC	643
	LmxM.25.0010	F R	GCGACCGTAGGGTTCTTTGA AGCGAACAGCAAAGTCCAGT	454
	LmxM.31.3990	F R	CAGATGACGGACGCTATCCC GTCACAGTCGCCACGTAGTTC	646
	LmxM.32.0300	F R	CGGACCGGATTAGGTACAGC CGGCTTGGCGTTAAGCATAAC	356
GT50	LmxM.29.2030	F R	TGTGCTACGCCTCATGGAAG CGTAGTGGTTCTGTCCCTCG	303
GT58	LmxM.36.2040	F R	GCTACTCTATCGCCGTGTCC GAAGAAAAGTGAGCAGCGTGGA	499
GT60	LmxM.02.0240	F R	CATGACGAAGAGCGCGAAAAG CCGACGAGCGGGTGTAAATA	674
	LmxM.17.1020	F R	CTGGGATCTCTACGGACCTG CTTCGTCCCTCGCCTTCACG	392
GT66	LmxM.34.1130	F R	GCCGACTACGTCCCTCATCTG GCTGCGTTCATGTACTCCT	489
	LmxM.34.1140	F R	GTCGACGACTACTATGCGGG AGTTGGTGTTTTGGTGTGCC	724
	LmxM.34.1150	F R	GCCGACTACGTCCCTCATCTG TCCGGATATCTTCTTCGCCTC	504

	LmxM.34.1160	F R	GGTCGTTTCTTCACGTGTGC CAGATGAGGACGTAGTCGGC	799
GT67	LmxM.25.2460	F R	GAGGAGGCCCGTCTATCTCAG GTCCGTTGAAGGTATGCCCATC	498
	LmxM.02.0160	F R	CTGCCCCGATTTTCATCAGGAGG GCGCGATCCACCCAGTAGTC	467
	LmxM.02.0170	F R	GATCCTGTGGCTGGAGTACG GCTCGACCCTCTTGTGTA CTT	847
	LmxM.02.0200	F R	GTGCCTGCTCATGGATATGG CTGTCCACTCATCGGCCGTAT	766
	LmxM.02.0230	F R	CTCACGACGGTGACTTTGGA GGCCCCGTATCTTCATCCTG	428
	LmxM.07.1170	F R	CCACGAAAAAGAAAATGGGTATGC GCTTCTTTGGGCAGAACCTC	543
	LmxM.36.0010	F R	CGTCGATGCGGTTGTTGGAG CGCCCGTAAAGTTGTTCTCG	606
	LmxM.30.3190	F R	CGATGCGATCTCTTGGGGTG GCTTGTCAGCCATGTAGCAC	548
GT76	LmxM.18.0960	F R	CATTCACCTGCGCTGGATTTTC GTTCTGAGGTTTGCCCATGCTG	514
GT79	LmxM.33.0510	F R	CTGACGGAAATGACCAGGCTG CGACCAGGAGTGGTGCTATC	305
GTNC	LmxM.02.0330	F R	GTACAATGCCCATGCTGTCTG GCCTCTCTGGAGGGGTAGAG	421

Además del diseño de oligonucleótidos para cada una de las GT's, se diseñaron por la misma vía, oligonucleótidos para genes que codifican proteínas constitutivas en ambos estadios de *L. mexicana* (TABLA 4), con el fin de utilizarlos como control en los experimentos de expresión.

**TABLA 4. Oligonucleótidos para el estudio de la expresión de genes constitutivos**

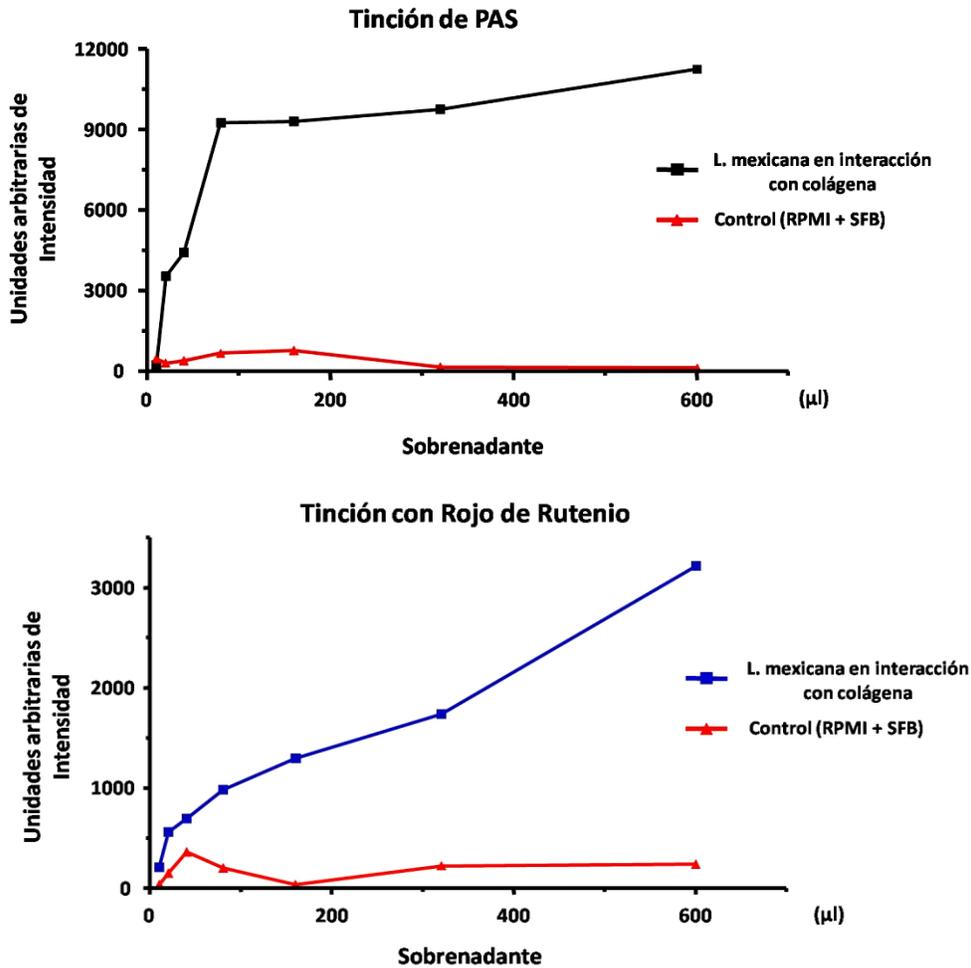
PROTEÍNA	ESTADIO	OLIGONUCLEÓTIDOS		PRODUCTO
Cysteine Peptidase	Promas	CYSPF	CATCGAGGACGGTATTGCATCG	621
		CYSPR	CATCACCTACCACGTTGCCTAC	
Paraflagellar rod protein 2C	Promas	PRM1F	CTCCCAGATTTCTCTCGCATC	755
		PRM1R	CAGTCTGCACAACAGTCACG	

Actin	Promas/ Amas	ACTNF ACTNR	CTTTCCGGAGATGGTGTATC CGCTCTTCTTCACCCACATT	263
GAPDH	Promas/ Amas	GPDHF GPDHR	GACCGCCGAAAGACGACACA GGCACACCGTTGAAGTCGGA	502
$\alpha$ -Tubulin	Promas/ Amas	ATBF ATBR	GAGGCCATCTACGACCTCAC CTTCGTCTTGATCGTCGCAAT	396
Cysteine Proteinase 2b	Amas	488F 488R	GCATTGGTAAACAGCTGAAC CATCAGGAGTCTCGAAGCAC	435
Amastin	Amas	AMSTF AMSTR	CCGAACAATAAGACTGCGAAC CGATGTTGATGATGTCCAGG	423

### 13.2. Estandarización de muestras para ensayos de Dot-blot

Para estandarizar los ensayos de dot-blot se utilizó la cámara Bio-Dot de 64 pozos utilizando varios volúmenes (10, 20, 40, 60, 80, 160, 320 y 600  $\mu$ l) del medio de cultivo de promastigotes interaccionados con la colágena durante 2 h, así como de los parásitos mantenidos en dichas condiciones.

Los resultados muestran que para la tinción con PAS, la Intensidad en donde se encontró mayor presencia de glicoconjugados fue a partir de los 80  $\mu$ l de medio de cultivo, y con Rojo de Rutenio la detección fue lineal aun a los 600  $\mu$ l (Figura 6). Con base en los resultados anteriores se decidió utilizar 120 $\mu$ l de muestra para los siguientes ensayos. Debido a que ambas tinciones presentan afinidades diferentes, las unidades de intensidad varían, de tal manera que en la cantidad seleccionada para los siguientes ensayos, no existe superposición de mediciones.

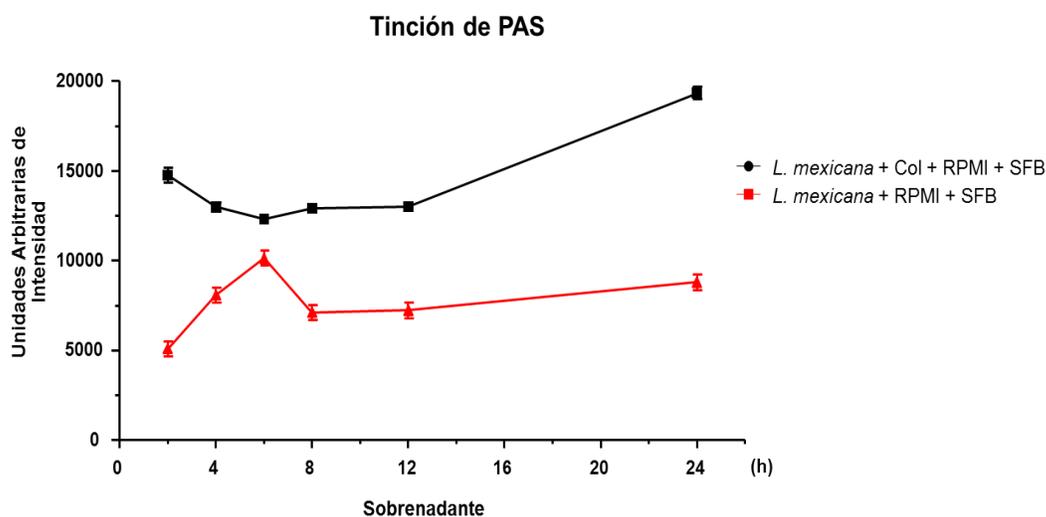


**Figura 6.** Estandarización de los ensayos de Dot-Blot. Diferentes volúmenes de medio de cultivo condicionado se ensayaron por Dot-Blot con tinción de PAS o tinción con Rojo de Rutenio. Hay que poner en *italicas* L. mexicana en las leyendas de ambas gráficas.

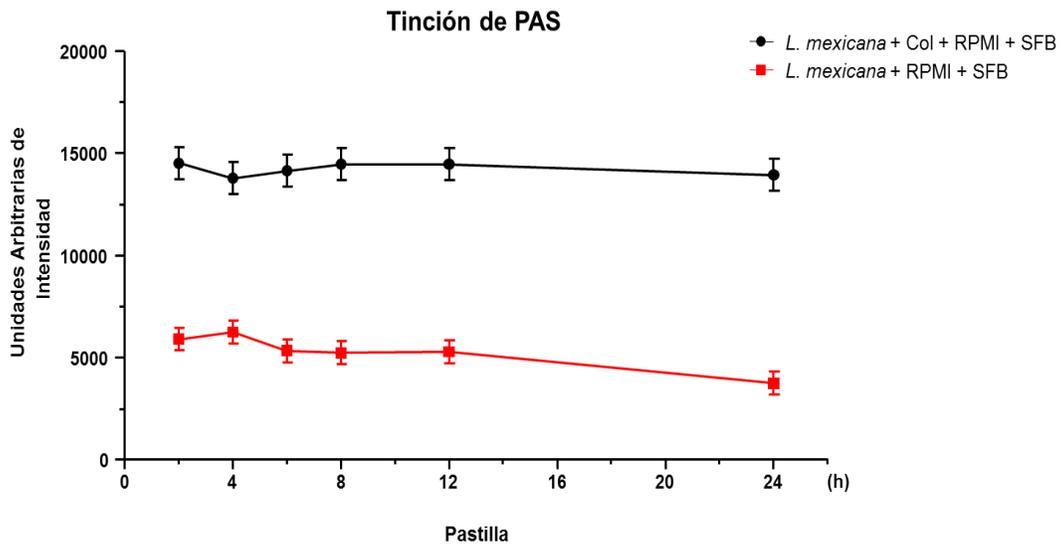
Una vez determinado el volumen óptimo, y utilizando los cultivos previamente descritos, se llevaron a cabo los ensayos para examinar la presencia de glicoconjugados excretados o presentes en los parásitos. Para ello, se obtuvieron muestras de las dos condiciones en las que fueron cultivados los parásitos desde las 2 y hasta las 24 h; en interacción con colágena (medio condicionado) y sin interactuar (medio normal), además de usar como controles a ambos medios sin la adición de parásitos.

Cuando se analizaron los glicoconjugados secretados por los parásitos, se observó que cuando los parásitos son cultivados en presencia de colágena éstos secretan más material teñido por PAS a todos los tiempos analizados, presentando un valor elevado al comienzo, es decir, a la 2 h de interacción y una ligera disminución de las 4 a las 8 h; sin embargo, una vez pasado ese valle de disminución, comienzan a aumentar de manera importante los glicoconjugados (Figura 7). La diferencia que existe entre el medio condicionado y aquél en el que los parásitos no tuvieron interacción con la colágena es significativa, esto después de realizar un análisis estadístico comparativo entre ambas condiciones en los mismos tiempos. Los parásitos que no estuvieron en contacto con colágena, presentan un aumento en la secreción de glicoconjugados entre las 2 y las 6 h para posteriormente disminuir de manera significativa.

Una misma cuantificación se realizó con los parásitos cultivados en las dos condiciones. Los promastigotes cultivados en presencia de colágena presentan mayor cantidad de glicoconjugados asociados desde las 2 h manteniéndose constante hasta las 24 h, presentando una diferencia significativa con aquéllos cultivados en condiciones normales (Figura 8).



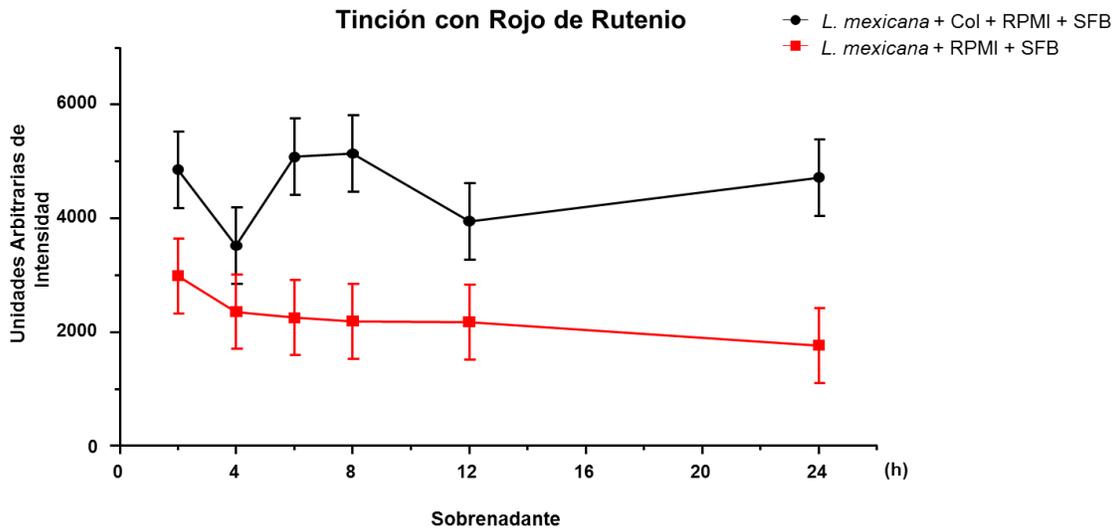
**Figura 7.** Secreción de glicoconjugados por promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de PAS).



**Figura 8.** Glicoconjugados asociados a los promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de PAS).

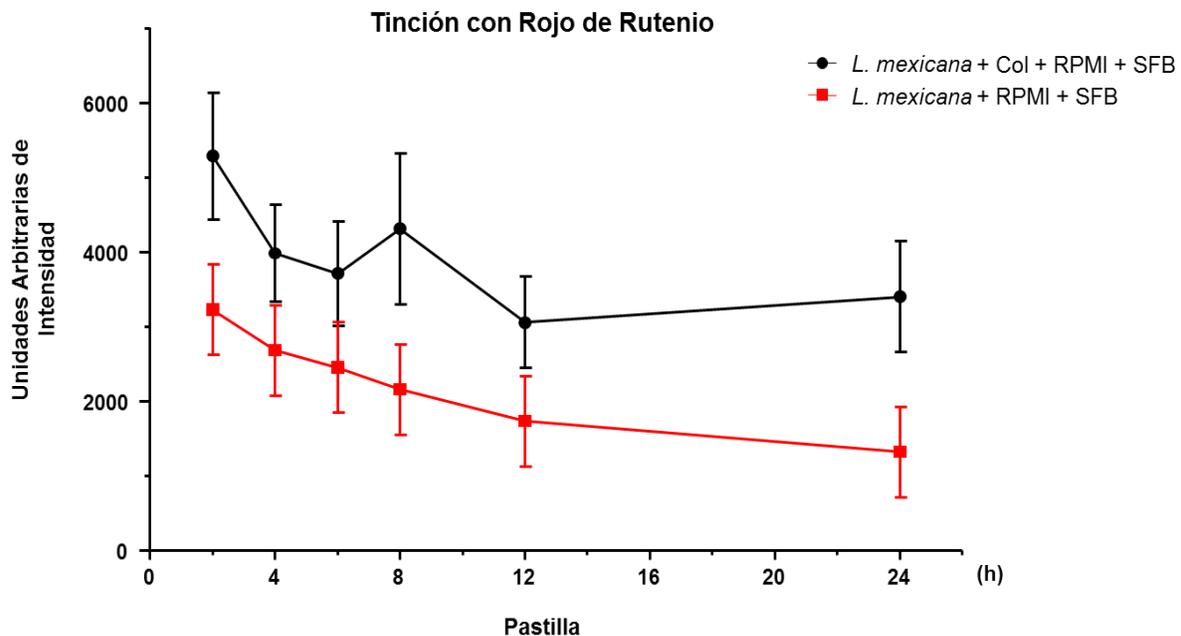
Después de observar el incremento importante en la secreción y presencia de glicoconjugados a partir de las 2 y hasta las 24 h en los promastigotes cultivados en presencia de colágena, se procedió a realizar los mismos ensayos excepto por la tinción, ya que se utilizó la tinción con Rojo de rutenio.

Los resultados con la tinción con Rojo de Rutenio mostraron que después de las 2 h se presenta un decremento en la secreción de glicoconjugados, sin embargo ésta vuelve a los niveles iniciales a las 6 h de interacción manteniéndose relativamente constante hasta las 24 h. Los glicoconjugados secretados por los promastigotes cultivados en condiciones normales presentan una ligera disminución a partir de las 2 h y se mantienen constantes hasta las 24 h (Figura 9).



**Figura 9.** Secreción de glicoconjugados por promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de Rojo de Rutenio).

Cuando se analizó la presencia de glicoconjugados asociados a los parásitos utilizando la tinción con Rojo de Rutenio, se detectó una disminución de los glicoconjugados a partir de las 2 hasta las 12 h en ambas condiciones de cultivo; sin embargo los promastigotes cultivados en presencia de colágena presentaron mayor cantidad de glicoconjugados (Figura 10).



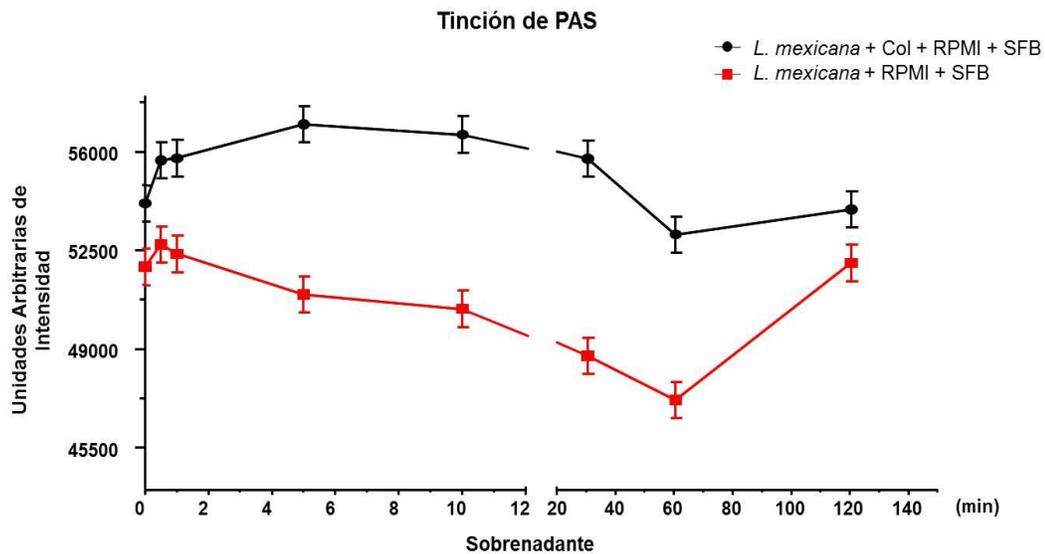
**Figura 10.** Glicoconjugados asociados a los promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de Rojo de Rutenio).

Los resultados anteriores, utilizando los dos métodos de tinción, indican que a las 2 h los promastigotes que interaccionan con la colágena tienen asociados y secretan gran cantidad de glicoconjugados, en comparación con aquéllos cultivados en condiciones normales. Debido a esto, era necesario conocer qué sucedía antes de las 2 h, por lo que se procedió a realizar ensayos de Dot-blot pero a distinto curso temporal.

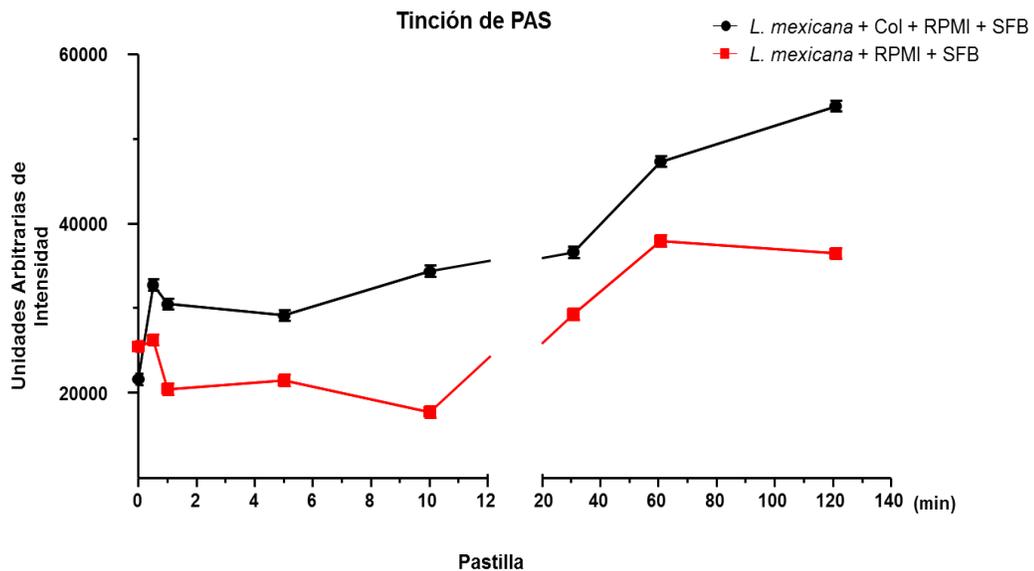
Al realizar el análisis de la secreción de glicoconjugados se detectó que los promastigotes los empiezan a secretar desde el mismo momento que interaccionan con la colágena (tiempo de 0 min), manteniéndose esta secreción hasta los 60 min, tiempo en el cual se presenta una ligera disminución en la secreción para después retomar o incrementar esta secreción. Los promastigotes cultivados en condiciones normales presentan valores de secreción inferiores a los

cultivados en presencia de la colágena, observándose una ligera disminución en la secreción durante los primeros minutos de cultivo, retomándose la secreción “normal” a las 2 h de cultivo (Figura 11).

De igual manera, se analizó la presencia de glicoconjugados asociados a los parásitos, teñidos por la misma técnica y en la misma frecuencia de tiempo. En esta ocasión, las unidades de intensidad comienzan en valores más bajos a los que se habían observado en los experimentos anteriores, sin embargo, los valores comienzan a incrementar de manera similar que en el sobrenadante, a partir de los 5 min. Pese a que los parásitos de cada condición tienen la misma tendencia de aumento, existen diferencias significativas en los glicoconjugados asociados entre los que interactuaron con colágena y los que no lo hicieron (Figura 12).



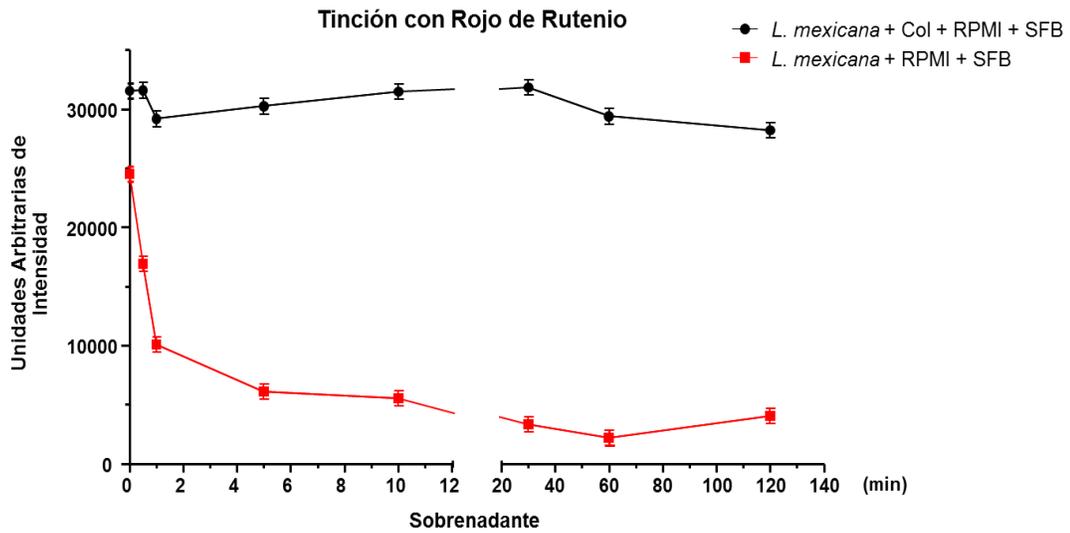
**Figura 11.** Secreción de glicoconjugados por promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de PAS).



**Figura 12.** Glicoconjugados asociados a los promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágeno (Tinción de PAS).

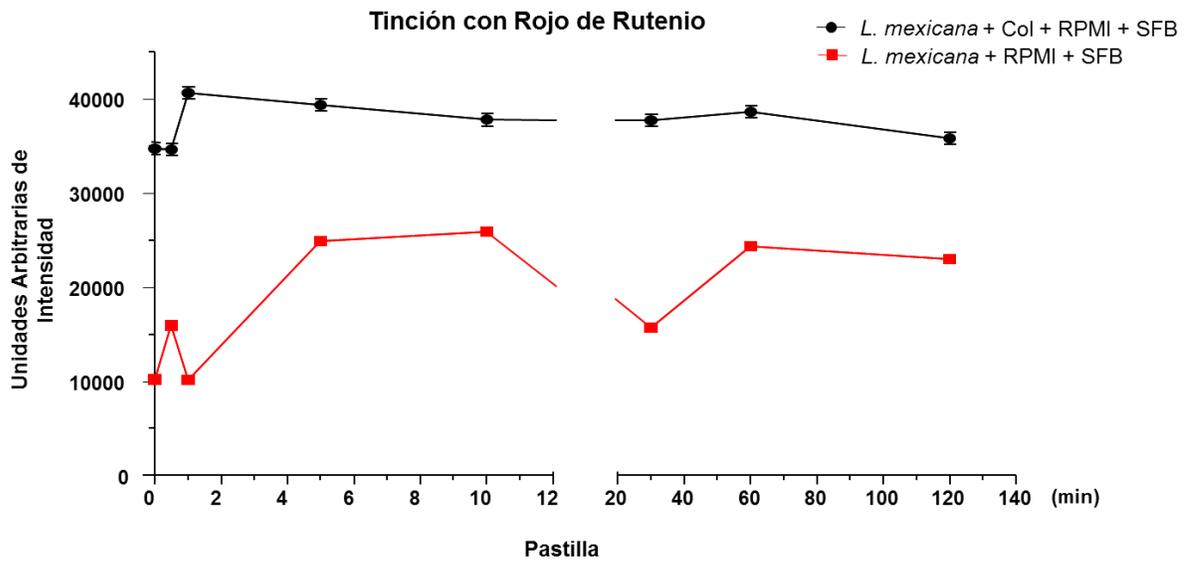
También se hicieron análisis de Dot-blot teñidos con Rojo de Rutenio, siguiendo el curso temporal y las condiciones previas (Figura 13).

En este caso, se puede observar una mayor diferencia en la secreción del material de interés, además de la tendencia de un ligero incremento a partir de los 5 hasta los 30 min y que disminuye para luego regresar a los valores que se encuentran a partir de las 2 h. En el caso de los parásitos que no tuvieron estímulo, la secreción de los glicoconjugados al medio tiende a disminuir de manera más rápida, a diferencia de lo notado en la tinción PAS, esto se debe principalmente a la cantidad de glicoconjugados que se detectan por cada método de tinción, sin embargo, al final del gráfico, se puede distinguir un incremento, que va acorde al valor inicial en los gráficos de tiempos posteriores.



**Figura 13.** Secreción de glicoconjugados por promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de Rojo de Rutenio).

Finalmente se analizó la presencia de glicoconjugados asociados a los parásitos teñidos con rojo de Rutenio, en donde a diferencia de la tinción PAS, es más estable la presencia de azúcares, sin embargo, el descenso en los valores se percibe a los 30 min de interacción, lo que ocurre en todos los casos (Figura 14). En el caso de aquéllos sin estímulo, se aprecia un aumento que parece ser el normal en tiempos cortos y posteriormente, los valores vuelven a disminuir. Contrario al gráfico de tinción de PAS, las tendencias son más lineares y de disminución al pasar los 30 min, sin embargo, las diferencias siguen siendo significativas.

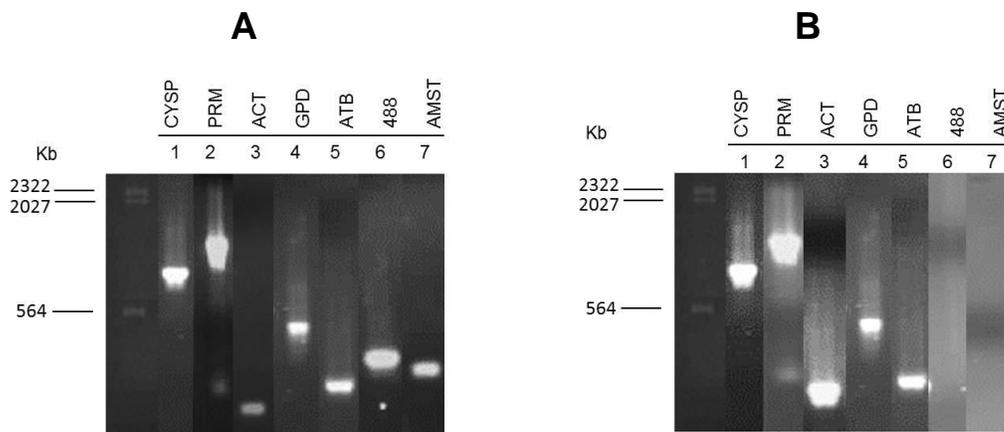


**Figura 14.** Glicoconjugados asociados a los promastigotes cultivados en presencia o ausencia de colágena (Tinción de Rojo de Rutenio).

### 13.3. Análisis de la expresión de GT's

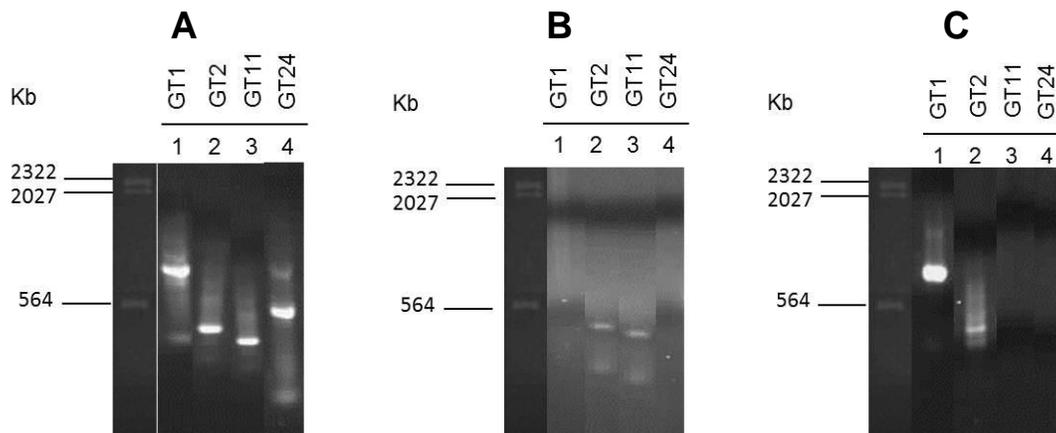
Con el fin de analizar la expresión de las GT's por RT-PCR se purificó el RNA de los promastigotes cultivados en condiciones normales y de aquéllos que interaccionaron con la colágena durante 2 h, tiempo en el cual se observó mayor secreción de glicoconjugados al medio de cultivo y asociados a los parásitos. El cDNA sintetizado a partir de estos RNAs se utilizó primero para corroborar la expresión de genes que se expresan en el estadio de promastigotes (Cisteína peptidasa y proteína paraflagelar 2C), y de genes constitutivos que se expresan en los estadios de promastigotes y de amastigotes (Actina, GAPDH y  $\alpha$ -tubulina). También se analizó la expresión de genes que se expresan solamente en el estadio de amastigotes (Cisteína proteinasa 2b y Amastina) con el fin de corroborar que el RNA purificado no estuviera contaminado con DNA genómico.

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 15, en donde se utilizó el cDNA obtenido de los promastigotes crecidos en condiciones normales, y se puede observar la expresión de los genes específicos de promastigotes y de los genes constitutivos, pero no de los genes específicos de amastigotes. Lo anterior indica que el RNA purificado de los promastigotes está libre de contaminación con DNA genómico. Para establecer las condiciones de PCR para cada par de oligonucleótidos se utilizó DNA genómico.



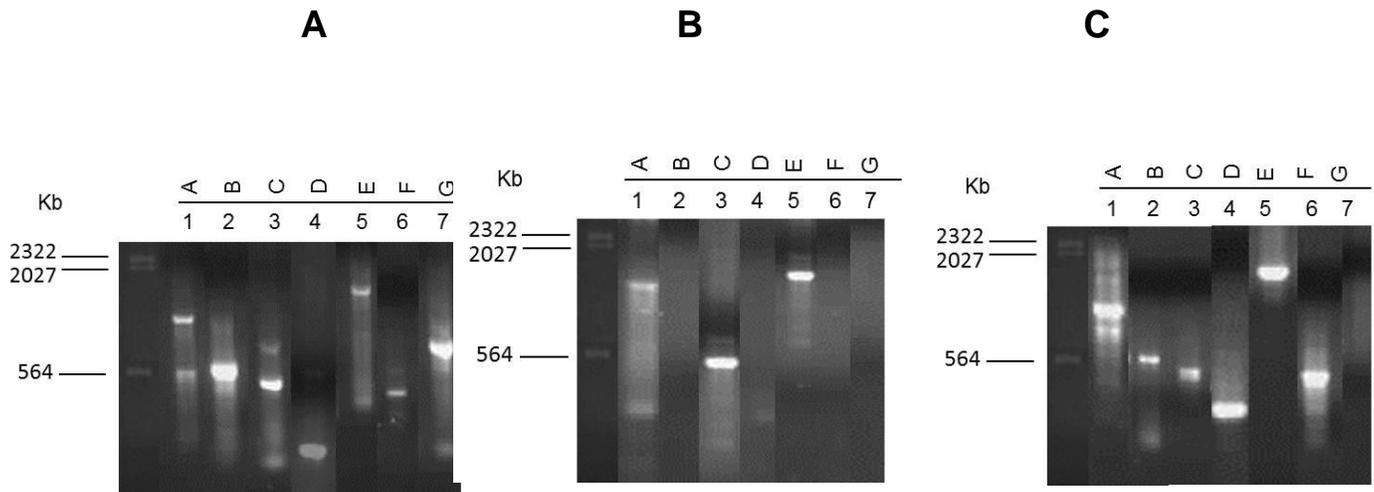
**Figura 15.** Análisis de la expresión de genes estadio específicos. Promastigotes (CYS y PRM), promastigotes/amastigotes (ACT, GPD y ATB) y amastigotes (488 y AMST). (A) PCR utilizando DNA genómico, (B) RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes.

Cuando se analizó la expresión de los miembros de las familias GT1, GT2, GT11 y GT24, que cuentan con 1 secuencia en cada una de ellas, se observó la expresión de forma basal en promastigotes sin estímulo de las enzimas GT2 y GT11, no así en la enzimas GT1 y GT24; sin embargo a las 2 h de interacción con la colágena, los promastigotes expresan la GT1 pero no la GT11. Por otro lado, los promastigotes expresan la GT2 en ambas condiciones y no expresan la GT24 (Figura 16).



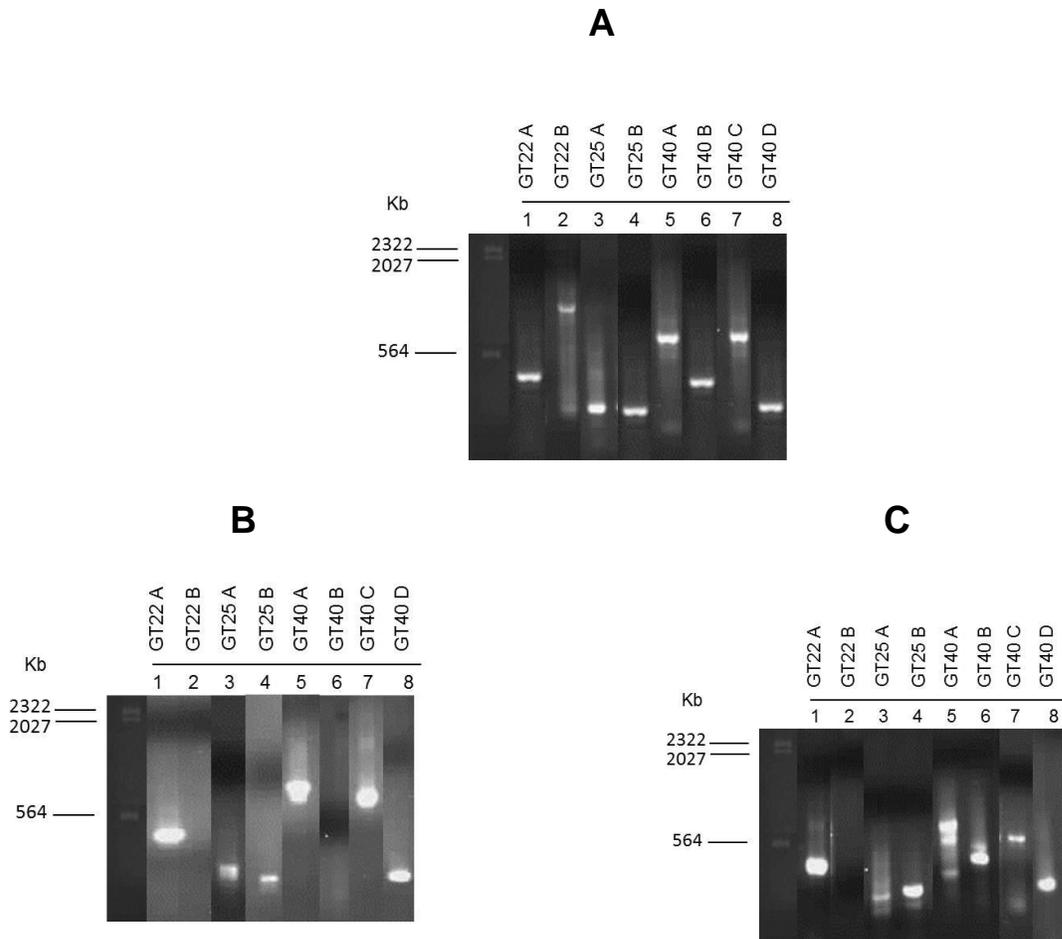
**Figura 16.** Expresión de las enzimas GT1, GT2, GT11 y GT24. (A) PCR utilizando DNA genómico. RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes cultivados en ausencia (B) o presencia de colágena (C).

Una de las familias de GT's que tiene un gran número de miembros es la GT4, la cual presenta 7 secuencias distintas numeradas de forma alfabética iniciando por la A. En forma basal se expresan las secuencias A, C y E, sin embargo, luego de ser estimulados los promastigotes, las secuencias B, D y F toman parte en la actividad enzimática de la familia. La única secuencia que permanece inactiva es la G (Figura 17).



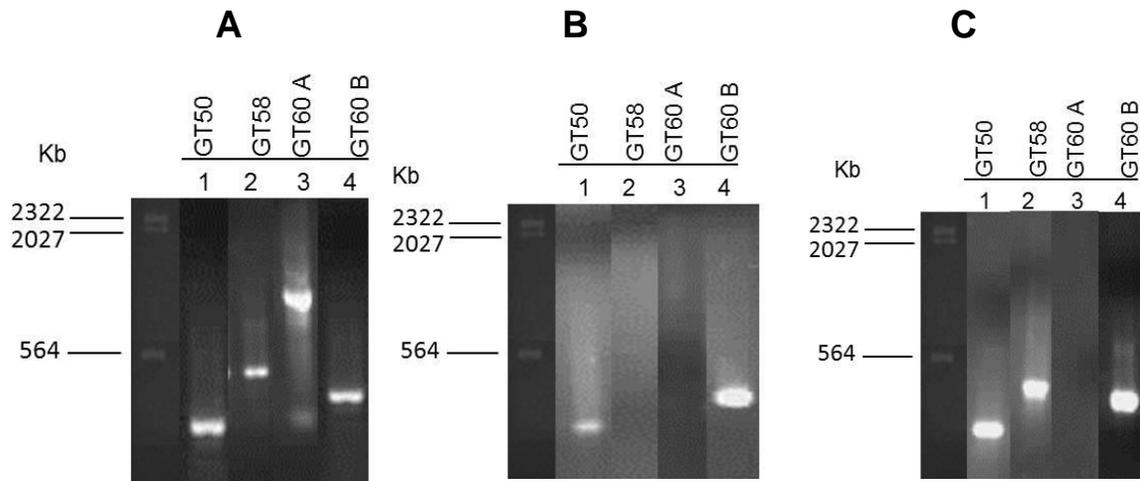
**Figura 17.** Expresión de los miembros de la familia GT4 (A, B, C, D, E, F y G). (A) PCR utilizando DNA genómico. RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes cultivados en ausencia (B) o presencia de colágena (C).

GT22 y GT25 son familias de glicosiltransferasas que tienen dos miembros y GT40 tiene 4 miembros. Para el caso de GT22, GT22A se expresa en ambas condiciones pero no GT22B; con respecto a GT25, GT25A y GT25B se expresan en ambas condiciones, y para GT40, en forma basal se expresan GT40A, GT40C y GT40D, y en los parásitos estimulados se expresan los cuatro miembros (Figura 18).



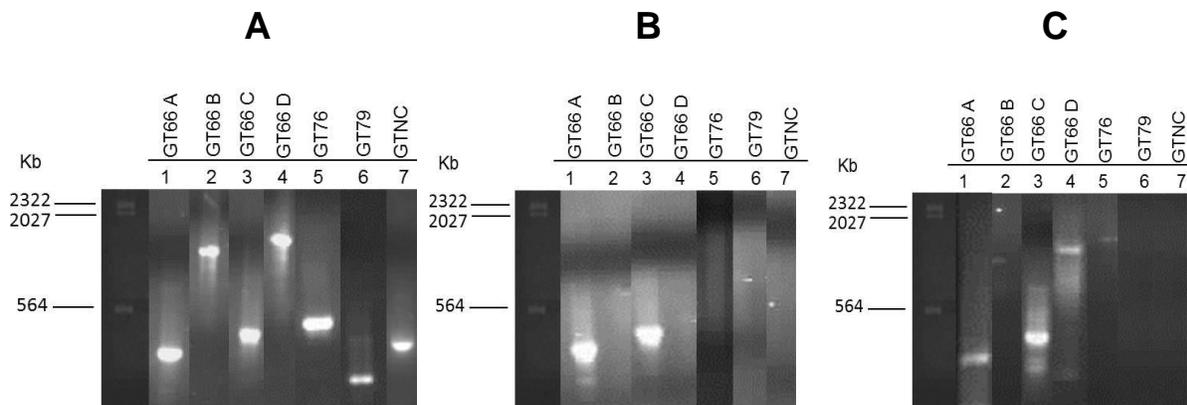
**Figura 18.** Expresión de los miembros de las familias GT22, GT25 y GT40. (A) PCR utilizando DNA genómico. RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes cultivados en ausencia (B) o presencia de colágena (C).

Al realizar el análisis de las familias GT50, GT58 y GT60, se encontró que sólo GT50 y GT60B son las secuencias que se encuentran expresadas de manera basal y GT60A no se expresa en ninguna condición, mientras que GT58 se expresa cuando los promastigotes interactúan con la colágena (Figura 19).



**Figura 19.** Expresión de los miembros de las familias GT50, GT58 y GT60. (A) PCR utilizando DNA genómico. RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes cultivados en ausencia (B) o presencia de colágena (C).

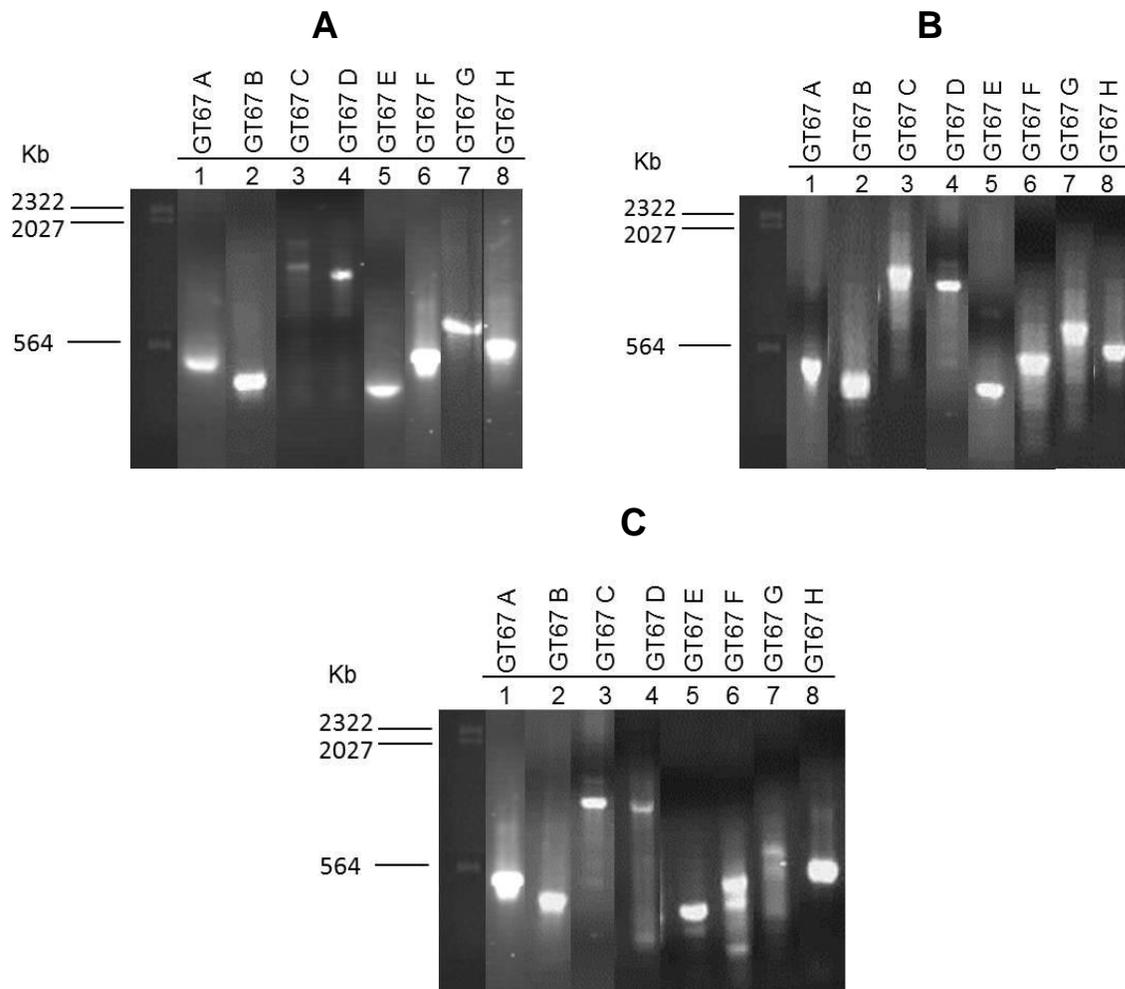
Una familia que presenta cuatro miembros es GT66, de los cuales de forma basal presentan actividad GT66A y GT66C, mientras que GT66D se expresa en los promastigotes interaccionados con la colágena y GT66B no se expresa en ninguna condición. También se analizó la expresión de GT76, GT79 y GTNC, encontrando que ninguna de éstas se expresa en las dos condiciones estudiadas (Figura 20).



**Figura 20.** Expresión de los miembros de las familias GT66, GT76, GT79 y GTNC. (A) PCR utilizando DNA genómico. RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes cultivados en ausencia (B) o presencia de colágena (C).

Finalmente, la familia de glicosiltransferasas más grande que se encontró en el genoma mediante los análisis previos, es la número 67, la cual cuenta con 8 secuencias que en estado basal se expresan todas y cada una; por lo que esto da pie a sugerir una dependencia de GT67 en el metabolismo de los promastigotes de *L. mexicana* (Figura 21).

Además es importante resaltar que cada secuencia es distinta en función, pero que en este caso en particular hay una actividad frecuente de todas, sugiriendo ya sea, una similitud de acción de todas o que cada una de las secuencias tenga un gran número de donadores o sustratos a utilizar. En el momento de analizar por RT-PCR a toda la familia poniendo en interacción a los promastigotes con colágena, no existe cambio alguno en la expresión de todas las secuencias de la familia, caso contrario a la mayoría de familias que presentan más de una secuencia donde ya sea que alguna fuera activada o inactivada.



**Figura 21.** Expresión de los miembros de la familia GT67. (A) PCR utilizando DNA genómico. RT-PCR a partir de RNA purificado de promastigotes cultivados en ausencia (B) o presencia de colágena (C).

Con lo anterior, se puede percibir un cambio claro en la actividad enzimática que presentan las GT's en promastigotes de *L. mexicana* cuando interaccionan con la colágena, ya sea activando o suprimiendo su expresión. Expresándose o inactivándose, las familias y las secuencias, no tienen una misma función, sin embargo se infiere una de las principales actividades en las que participa, como es la infección teniendo como primer contacto a la colágena del huésped vertebrado.

En la tabla 5 se muestra el resumen del análisis de la expresión de las GT's en los promastigotes cultivados en condiciones basales y en presencia de colágena.

**TABLA 5. Expresión de GT's en promastigotes en dos condiciones, estado basal y con 2 horas de interacción con colágena.**

GT	BASAL	COLÁGENA	GT	BASAL	COLÁGENA
GT1	-----	++++	GT50	++++	++++
GT2	++++	++++	GT58	-----	++++
GT4A	++++	++++	GT60A	-----	-----
GT4B	-----	++++	GT60B	++++	++++
GT4C	++++	++++	GT66A	++++	++++
GT4D	-----	++++	GT66B	-----	-----
GT4E	++++	++++	GT66C	++++	++++
GT4F	-----	++++	GT66D	-----	++++
GT4G	-----	-----	GT67A	++++	++++
GT11	++++	-----	GT67B	++++	++++
GT22A	++++	++++	GT67C	++++	++++
GT22B	-----	-----	GT67D	++++	++++
GT24	-----	-----	GT67E	++++	++++
GT25A	++++	++++	GT67F	++++	++++
GT25B	++++	++++	GT67G	++++	++++
GT40A	++++	++++	GT67H	++++	++++
GT40B	-----	++++	GT76	-----	-----
GT40C	++++	++++	GT79	-----	-----
GT40D	++++	++++	GTNC	-----	-----

## 14. Discusión

Las secuencias que se encontraron en el genoma de los promastigotes de *L. mexicana* presentan alta homología con las registradas en la base de datos para especies del mismo género, es decir, *L. braziliensis* y *L. infantum*. Además de comparar las secuencias para buscar en el genoma de *L. mexicana*, otras especies que comprenden el mismo género y que afectan al humano se integraron en la búsqueda, incluso, otros tripanosomátidos, como *T. cruzi*. El conocimiento bioinformático inicial resulta relevante para tener una base de la cual partir dependiendo de lo que se pretende buscar en ensayos posteriores; incluso para tener un conocimiento más amplio en el funcionamiento del organismo. A pesar de que las GT's no son sustrato-específicas, era de vital importancia conocer la expresión o no de dichas enzimas en un proceso específico, que es la interacción inicial del parásito con el hospedero vertebrado.

En el presente trabajo se localizaron 16 familias de GT's y con éstas nos dimos a la tarea de analizar y respaldar la información previa, en donde se encuentra cierto material excretado en promastigotes de *L. mexicana* cuando hay interacción con colágena (32, 46, 47). Dentro de las 16 familias de proteínas, hay algunas que cuentan con más de una secuencia de glicosiltransferasas, tal es el caso de familias importantes como GT40, GT66, GT67, entre otras. Algunas otras enzimas que están reportadas para especies del mismo género no se encuentran presentes en *L. mexicana*, la familia GT3 que está reportada en el genoma de *L. major* (48-50) o incluso, funciones que son propias de la transferencia de azúcares en patógenos tripanosomátidos. Ya que se analizaron mediante Blast y se compararon con el genoma del mismo grupo, entran en juego los parásitos del género *Trypanosoma* ya que cuentan con el respaldo de tener medios de infección, transmisión, patogenicidad e incluso ciclo de vida, si no similares, al menos sí muy parecidos y que pueden ayudar a dilucidar un campo que recién está en la etapa de experimentación como es el de la infección (47, 50-52).

Se había reportado que a las dos horas de interacción de los promastigotes de *L. mexicana*, éstos excretan una matriz rica en glicoconjugados, lo que sugería la activación de enzimas que tuvieran la capacidad de sintetizarlos. Además de aquellos que estaban siendo secretados por los parásitos, hay además otros que se encuentran en su superficie y que de manera basal en algún momento del ciclo celular éstos son secretados (16, 17). Para comprobarlo se realizaron ensayos de Dot-Blot en donde se robustece el hecho de que a las 2 h de interacción con la colágena efectivamente se encontraron glicoconjugados secretados por los promastigotes y asociados a éstos, lo que llevó a determinar ese tiempo para poder llevar a cabo experimentos para analizar la expresión de dichas enzimas.

Una diferencia importante que da como resultado valores variables entre tinciones, es el medio de acción de cada uno de los colorantes. El ácido periódico y los reactivos de Shiff y Gill de la tinción PAS, son inespecíficos y por ende, tiñen una gran gama de azúcares como proteoglicanos, mucopolisacáridos, glicolípidos, fosfoglicanos, etc.; mientras que el Rojo de Rutenio no es tan afín a una gran variedad de azúcares, sin embargo, actúa de manera importante en la fijación de glicoconjugados, además de que se ha observado que las moléculas de superficie del parásito, así como las moléculas que son secretadas son bien captadas por este tipo de colorante, siendo, además del LPG, las Fosfatasa Ácidas secretadas las segundas en cantidad secretada.

Al momento de observar el comportamiento mediante la expresión por técnicas de RT-PCR y con cDNA que fue aislado de promastigotes en interacción con colágena por dos horas, hay resultados notorios capaces de reforzar diversos estudios.

Una de las familias de GT's que tiene más de un miembro es la GT40, enzimas que ya han sido reportadas en el genoma de al menos tres especies del género *Leishmania* y tres más del género *Trypanosoma*, además que no se encuentran en ningún otro organismo que no sea del grupo de los tripanosomátidos (50, 53, 54). Una de las funciones de dicha familia, es la de galactofuranosiltransferasa, enzima importante para la síntesis de una de las moléculas más importantes de

diversos organismos, el LPG (53, 54). Además comparten función en la síntesis de proteofosfoglicanos, ambas moléculas, el LPG y los proteofosfoglicanos, no sólo son propias de la superficie de los parásitos, sino que también pueden ser secretadas (22, 23). En el análisis por RT-PCR se puede observar una expresión de todas las secuencias de la familia GT40, cuando los promastigotes interactúan con la colágena, siendo la GT40B específica de esta interacción. Lo anterior sugiere que dicha matriz secretada cuando el parásito interactúa con la dermis, contiene, además de moléculas de diverso peso molecular (32), a las moléculas que son secretadas, que se cree que participan en la evasión de respuestas inmunes, activar mecanismos de infección o agilizar el movimiento en el mínimo trayecto dentro de la matriz extracelular por parte de los parásitos (16, 26, 32).

Otro de los grupos de enzimas importantes en cuanto a la funcionalidad, es la familia GT66, la cual además de contar con un número de secuencias similares con la familia previa, se han reportado en genomas completos de tripanosomátidos, tales como *T. brucei* y *T. rangeli*, en donde se señala su importancia en la síntesis de moléculas que participan en la infección (51, 53, 55).

Una familia de GT's importante es la GT67, familia que fue localizada en los ensayos *in silico* solamente en el género *Leishmania*, y que no se encontraron diferencias en su expresión por los promastigotes cultivados en condiciones basales y en presencia de colágena (56-58). En la relación que existe con los parásitos patógenos de la misma especie, se ha reportado que en *L. major* se encuentran las mismas secuencias de la familia y que estas enzimas son importantes ya que participan en mecanismos de infección, de sobrevivencia y en la síntesis de moléculas de superficie (59,60).

En el caso de la GT4, es una familia que ha sido registrada en las bases de datos y que parece que se encuentra en una gran variedad de organismos (61), sin embargo, en el caso del organismo de interés en el presente trabajo, existen diferencias significativas al expresar seis de sus siete secuencias cuando ocurre la interacción con la colágena. Es necesario abundar más en la función de los

miembros de esta familia, ya que es difícil de prever cuál es el papel específico de dichas enzimas. Además hasta el momento no se hace alguna otra mención importante haciendo alusión a la funcionalidad, si bien tres de las ocho secuencias están funcionando de manera basal, no se puede quitar el dedo del renglón como objetivo de futuras investigaciones.

Se han descrito trabajos en donde deletan ciertas enzimas que son sustrato específicas y que dan pauta a suponer que se trata de una o algunas familias de GT; manosiltransferasa, dolicoltransferasa y galactofuranosiltransferasa, han sido depletadas del genoma de *L. mexicana* (58, 59). Sin embargo, los esfuerzos por obtener parásitos mutantes con virulencia disminuida o nula han sido fallidos, ya que una misma actividad enzimática puede ser llevada a cabo por diferentes enzimas (54).

El estudio de cada una de las familias de GT es exhaustivo y complejo, pero el entendimiento fragmentado de su funcionalidad y estructura, acompañado de la relación con aquellas características que son propias de los organismos a estudiar, ayuda en el avance del entendimiento de uno de los más grandes grupos de proteínas encargadas de sintetizar una gama abundante de compuestos, moléculas que actúan de formas completamente distintas, incluso en un mismo individuo.

## 15. Conclusiones

- *L. mexicana* posee 16 familias y 38 secuencias de glicosiltransferasas; 9 de las cuales tienen una GT, 3 tienen 2 GT's, 2 tiene 4 GT's, 1 tiene 7 GT's y 1 tiene 8 GT's.
- 25 secuencias de GT's presentan dominio de unión a metales en su estructura, lo que las clasifica como GT-A, 13 son pertenecientes al grupo GT-B.
- Promastigotes de *L. mexicana*, en interacción con colágena, expresan y secretan glicoconjugados.
- 10 de las 16 familias de GT's se expresan en promastigotes de *L. mexicana*.
- 29 de las 38 secuencias se expresan cuando los promastigotes de *L. mexicana* está en interacción con colágena durante 2 horas, por lo que la interacción con colágena, modula la expresión de algunas GT's.

## 16. Bibliografía

- [1] Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, 354(9185), 1191-1199. doi:10.1016/s0140-6736(98)10178-2
- [2] Von Stebut, E. (2015). Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(3), 191-200; quiz 201. doi:10.1111/ddg.12595
- [3] Sánchez, L. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, 14, 16.
- [4] Health, C. f. F. S. P. (2009). Leishmaniasis cutaneous and visceral.
- [5] Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol*, 73(6), 897-908; quiz 909-810. doi:10.1016/j.jaad.2014.08.051
- [6] Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J Am Acad Dermatol*, 73(6), 911-926; 927-918. doi:10.1016/j.jaad.2014.09.014
- [7] Hashiguchi, Y., Gomez, E. L., Kato, H., Martini, L. R., Velez, L. N., & Uezato, H. (2016). Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health*, 44, 2. doi:10.1186/s41182-016-0002-0
- [8] Smeeta, S. (2008). Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International J Dermatol*, 47, 8.
- [9] Sáenz, E. (2013). Leishmaniasis mucocutánea con presentación atípica: setenta años posprimoinfección. *Dermatol Perú*, 23, 5.
- [10] Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. (2016). Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*, 110(6), 247-260. doi:10.1080/20477724.2016.1232042

- [11] H. C. Maltezou, C. S., M. Mavrikou, P. Spyridis, C. Stavrinadis, Th. Karpathios, and D. A. Kafetzis<sup>1</sup>. (2000). Visceral Leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis*, 31, 5.
- [12] Sosa Ávila, E. (2014). Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México *enf inf microbiol*, 34, 5.
- [13] Mougneau, E. (2011). Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev*, 240, 10.
- [14] Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2011). The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol*, 79(3), 647-662. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x
- [15] Myler, P. (2008). *Leishmania* after the Genome 2007. Caister Academic Press. BioMed central, 306 pags.
- [16] de Menezes, J. P., Saraiva, E. M., & da Rocha-Azevedo, B. (2016). The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors*, 9, 264. doi:10.1186/s13071-016-1540-3
- [17] Forestier, C. L., Gao, Q., & Boons, G. J. (2014). *Leishmania* lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?, *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 193. doi:10.3389/fcimb.2014.00193
- [18] Alcolea, P., Alonso, A., Gómez, M., Sánchez, A., & Moreno, M. (2010). Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics*, 11, 31.
- [19] Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 9(6), 588-596. doi:10.3855/jidc.6833
- [20] Bates, P. (1995). The Lipophosphoglycan-associated molecules of *Leishmania*. *Parasitology Today*, 11, 3.

- [21] Sacks, D., Modi, G., Rowton, E., & Späth, G. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania* sand fly interactions. *PNAS*, 97, 5.
- [22] Salvatore, J., & Descoteaux, A. (1992). The PLG of *Leishmania* Parasites. *Ann Rev Parasitol*, 46, 29.
- [23] Ilg, T. (2000). PPGs of *Leishmania*. *Parasitology Today*. 16, 9.
- [24] Späth, G., Epstein, L., & Leader, B. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *PNAS*, 97, 6.
- [25] Funk, V., Thomas, J., & Kielland, S. (1996). A unique, terminally glucosylated oligo saccharide is a common feature on *Leishmania* cell surfaces. *Mol Biochem Parasitol*, 84, 15.
- [26] McGwire, B., Chang, K., & Engman, D. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect & Immun*, 71, 3. doi:10.1128/IAI.71.2.1008-1010.2003
- [27] Berrier, A. L., & Yamada, K. M. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol*, 213(3), 565-573. doi:10.1002/jcp.21237
- [28] Ryan, K., Garraway, L., Descoteaux, A., & Turco, S. (1993). Isolation of virulence genes directing GPI synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Genetics*, 90, 5.
- [29] Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S., & Beverley, S. (1995). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugated of *Leishmania* Science. *SCIENCE*, 269, 4.
- [30] Descoteaux, A., Ávila, H., Zhang, K., Turco, S., & Beverley, S. (2002). *Leishmania* PLG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO*, 21, 12.

- [31] Nelson, C. M., & Bissell, M. J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 287-309. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315
- [32] Xu, R., Boudreau, A., & Bissell, M. J. (2009). Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. *Can Metast Rev*, 28(1-2), 167-176. doi:10.1007/s10555-008-9178-z
- [33] Watt, F. M., & Fujiwara, H. (2011). Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(4). doi:10.1101/cshperspect.a005124
- [34] Lira, R., Rosales, E., & Argüello, C. (1997). *Leishmania mexicana*: Binding of promastigotes to type I collagen. *Exp Parasitol*, 85, 9.
- [35] Sansom, F., Ralton, J., Sernee, M., Cohen, A., & Hooker, D. (2014). Golgi-located NTPDase1 of *Leishmania major* is required for lipophosphoglycan elongation and normal lesion development whereas secreted NTPDase2 is dispensable for virulence. *Neglec Trop Dis*, 8(12), 12. doi:10.1371/journal.pntd
- [36] Dobson, D. E., Scholtes, L. D., Valdez, K. E., Sullivan, D. R., Mengeling, B. J., Cilmi, S., Beverley, S. M. (2003). Functional identification of galactosyltransferases (SCGs) required for species-specific modifications of the lipophosphoglycan adhesin controlling *Leishmania major*-sand fly interactions. *J Biol Chem*, 278(18), 15523-15531. doi:10.1074/jbc.M301568200
- [37] Campbell, J., Davies, G., & Bulone, V. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 326, 13.
- [38] Rodriguez, A., Tygat, H., & Windrerrickx, J. (2014). A network-based approach to identify substrate classes of bacterial glycosyltransferases. *Genomics*, 15, 21.

- [39] Gloster, T. M. (2014). Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Curr Opin Struct Biol*, 28, 131-141. doi:10.1016/j.sbi.2014.08.012
- [40] Yonekura-Sakakibara, K., & Hanada, K. (2011). An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant J*, 66(1), 182-193. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04493.x
- [41] Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., & Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 328(2), 307-317. doi:10.1016/s0022-2836(03)00307-3
- [42] Nishimura, Y., Shimono, N., Yoshimoto, T., Kamiguchi, H., & Nishikawa, Y. (2014). Cloning and transcriptional expression of mouse mannosyltransferase IV/V cDNA, which is involved in the synthesis of lipid-linked oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(3), 400-409. doi:10.1080/09168451.2014.890026
- [43] Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Gotoh, M., & Narimatsu, H. (2003). Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model. *Biochem Biophys Res Commun*, 310(2), 574-579. doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.031
- [44] Qasba, P., & Ramakrishnan, B. (año). X-Ray crystal structures of Glycosyltransferases. *Comprehensive Glicoscience*, 10.
- [45] Kapitonov, D., & Yu, R. (1998). Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiol*, 9, 18.
- [46] Wiederschain, G. Y. (2013). Glycobiology: progress, problems, and perspectives. *Biochemistry (Mosc)*, 78(7), 679-696. doi:10.1134/S0006297913070018
- [47] Liang, D. M., Liu, J. H., Wu, H., Wang, B. B., Zhu, H. J., & Qiao, J. J. (2015). Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development. *Chem Soc Rev*, 44(22), 8350-8374. doi:10.1039/c5cs00600g

- [48] Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 77, 521-555. doi:10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322
- [49] Mazola, Y., Chinea, G., & Musacchio, A. (2011). Integrating bioinformatics tools to handle glycosylation. *PLoS Comput Biol*, 7(12), e1002285. doi:10.1371/journal.pcbi.1002285
- [50] Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16(2), 29R-37R. doi:10.1093/glycob/cwj016
- [51] Sekar, A., Merritt, C., Baugh, L., Stuart, K., & Myler, P. J. (2014). Tb927.10.6900 encodes the glucosyltransferase involved in synthesis of base J in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 196(1), 9-11. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.07.005
- [52] Bullard, W., Lopes da Rosa-Spiegler, J., Liu, S., Wang, Y., & Sabatini, R. (2014). Identification of the glucosyltransferase that converts hydroxymethyluracil to base J in the trypanosomatid genome. *J Biol Chem*, 289(29), 20273-20282. doi:10.1074/jbc.M114.579821
- [53] Stoco, P. H., Aresi, C., Luckemeyer, D. D., Sperandio, M. M., Sincero, T. C., Steindel, M., Grisard, E. C. (2012). *Trypanosoma rangeli* expresses a beta-galactofuranosyl transferase. *Exp Parasitol*, 130(3), 246-252. doi:10.1016/j.exppara.2011.12.005
- [54] Zhang, K., & Beverley, S. M. (2010). Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 170(2), 55-64. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.12.004
- [55] Madnik, V., Shinde, S., & Singh, S. (2014). Molecular evolution of the enzymes involved in the sphingolipid metabolism of *Leishmania*: selection pressure in relation to functional divergence and conservation. *Evolutionary Biology*, 14, 8.

- [56] Sizova, O. V., Ross, A. J., Ivanova, I. A., Borodkin, V. S., Ferguson, M. A., & Nikolaev, A. V. (2011). Probing elongating and branching beta-D-galactosyltransferase activities in *Leishmania* parasites by making use of synthetic phosphoglycans. *ACS Chem Biol*, 6(6), 648-657. doi:10.1021/cb100416j
- [57] Ilgouts, S., Mullin, K., Southwell, B., & McConville, M. (1999). Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. *EMBO*, 18, 12.
- [58] Garami, A., Mehlert, A., & Ilg, T. (2001). Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants. *Mol Cell Biol*, 21(23), 8168-8183. doi:10.1128/MCB.21.23.8168-8183.2001
- [59] Ivens, A. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *SCIENCE*, 309, 15.
- [60] Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., . . . Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, 39(7), 839-847. doi:10.1038/ng2053