



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CON  
ACTIVIDAD CICLOOXIGENASA (COX) DE *Leishmania mexicana*.**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA:**

**M. en C. LUIS ALBERTO ESTRADA FIGUEROA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA TALAMÁS ROHANA**

**MÉXICO D.F.**

**AGOSTO, 2015**

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Patricia Talamás Rohana, en el laboratorio 9 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría de la Dra. Rosa María del Ángel, el Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, del departamento de Infctómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV, el Dr. José Tapia Ramírez del departamento de Genética y Biología Celular del CINVESTAV, y el Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológicos (INDRE).

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por estimular el desarrollo de la ciencia en México, y por apoyar los estudios de doctorado del M. en C. Luis Alberto Estrada Figueroa, número de becario 204814.

Primero y como más importante, me gustaría agradecer a mi tutora de tesis, **Dra. Patricia Talamás Rohana** por su esfuerzo y dedicación.

Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación.

Ella ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico.

Para La Dra. Paty toda mi admiración y quedo en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis Doctoral.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Gracias a mis padres **Mario** y **Carmen** que han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

Gracias a mis hermanos **Irma**, **Rafael**, **Marco** y **Lucero** por su apoyo, por su cariño y por hacerme saber que siempre cuento con ustedes.

Gracias a **Janett** y a mi bebe **Mario Rafael** por darme un motivo más por el cual existir y seguir adelante.

Gracias **Amairani**, **María**, **Giovani**, **Diego**, **Bryan**, **Erik** y **Santiago** por hacer más grande y más feliz a mi familia.

Gracias a mis amigos del departamento de infectómica **Alberto**, **Rous**, **Anita**, **José Alfredo**, **Rosario**, **Julio**, **Luigui**, **Mayra**, **Alfredo**, **Francisco**, **Paty**, **Maylin**, **Nancy**, **Jenny**, **Alejandro** y **Jorge** por su amistad y apoyo durante mi estancia en el CINVESTAV.

Gracias a mis amigos y compañeros de los laboratorios 7 y 9 **Belem**, **Enrique**, **Asael**, **Carlos Orosio**, **Lidia Bailón** por su apoyo técnico y amistad; a **Verónica Ivonne Ramírez**, por su apoyo en todos los sentidos, consejos, observaciones y positivismo que permitieron finalizar con este trabajo.

Gracias a las secretarias **Martha Aguilar** e **Irma Miranda** por el apoyo técnico y amistad.

Gracias a los **Doctores** titulares del departamento de infectómica y patogénesis molecular por el apoyo y amistad que me brindaron.

Gracias a los **amigos** y **compañeros** que no figuran en la lista. A todos...  
Gracias.

## RESUMEN.

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la proteína responsable de la producción de prostanoídes entre los que se encuentra la prostaglandina E2 (PGE2), el se considera como un modulador de la respuesta inmune, ya que regula el sistema inmune al inhibir la producción de citocinas Th1 y promover la producción de citocinas Th2. Muchos parásitos regulan la respuesta inmune del hospedero a través de los efectos de la PGE2; sin embargo en parásitos solo se ha descrito una proteína con actividad COX, la alfa actinina de *Entamoeba histolytica*. Se ha reportado la producción de prostanoídes en algunas especies de *Leishmania* pero no las enzimas responsables de su producción. Para identificar a la proteína responsable de la actividad COX en *Leishmania mexicana*, examinamos extractos totales de promastigotes de *Leishmania mexicana* para su actividad COX; después las muestras con actividad COX fueron sujetas a una purificación en una columna de intercambio iónico y precipitación con sulfato de amonio; los eluidos con actividad COX se analizaron por SDS-PAGE y Westernblot utilizando un anticuerpo policlonal anti COX-2 de ratón. Los resultados mostraron que en muestras con actividad enzimática el anticuerpo anti COX-2 de ratón reconocía una banda de aproximadamente 66 kDa. Las bandas reconocidas por el anticuerpo policlonal fueron sujetas a espectrometría de masas y los resultados mostraron que varios péptidos de las bandas purificadas por dos métodos diferentes y que fueron reconocidas por el anticuerpo anti COX-2 de ratón correspondieron con la proteasa de superficie gp63 de *Leishmania*. gp63 de *Leishmania* se purificó por medio de una columna de afinidad con concanavalina A y después sujeta a inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo policlonal comercial anti-gp63; la muestra inmunoprecipitada fue analizada por su actividad COX mostrando que el inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-gp63 tenía actividad COX, confirmando que gp63 es la molécula responsable de la actividad COX en promastigotes de *L. mexicana*.

## ABSTRACT.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a protein responsible of prostanoids production, such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), considered as an immune response modulator, since it regulates the immune system to inhibit Th1 and to promote Th2 cytokines production. Many parasites modulate the host immune response through the effects of PGE<sub>2</sub>; however so far in parasites, only one protein with COX activity has been described, the  $\alpha$ -actinin of *Entamoeba histolytica*. Prostanoids production has been reported in some species of *Leishmania* but not the enzymes responsible of their production. To identify the protein responsible of COX activity in *Leishmania mexicana*, we examined total extracts of promastigotes of *L. mexicana* for COX activity; then, samples with COX activity were subjected to ion exchange column purification and precipitation with ammonium sulphate and eluates with activity were analyzed by SDS-PAGE and Western blot using an anti-mouse COX-2 polyclonal antibody. Results showed that in those samples with enzymatic activity, where the anti-mouse COX-2 polyclonal antibody recognized a protein with an approximate molecular weight of 66 kDa. Bands recognized by the antibody were subjected to mass spectrometry analysis and the results showed that several peptides from the bands purified by two different methods, and that were recognized by the anti-mouse COX-2 polyclonal antibody corresponded to the *Leishmania* gp63 surface protease. *Leishmania* gp63 was purified by a Concanavalin A (Con-A) affinity column and then subjected to immunoprecipitation using a commercial anti-*Leishmania* gp63 polyclonal antibody; the immunoprecipitated sample was analyzed for COX activity showing that the immunoprecipitate with anti-gp63 antibody has COX activity, confirming that gp63 is molecule responsible of COX activity in promastigotes of *L. mexicana*.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	1
CICLO DE VIDA .....	4
MOLÉCULAS DE SUPERFICIE Y MOLÉCULAS SECRETADAS POR EL PARÁSITO .....	6
INTERACCIÓN INICIAL Y FAGOCITOSIS .....	8
INHIBICIÓN DE LAS FUNCIONES DEL MACRÓFAGO .....	10
PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES MICROBICIDAS .....	11
PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO .....	11
INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS .....	13
INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS INMUNOSUPRESORAS POR LA INFECCIÓN CON <i>Leishmania</i> .....	14
LAS PROSTAGLANDINAS COMO MODULADORES DE LA INMUNIDAD .....	16
CICLOOXIGENASAS .....	19
PROSTAGLANDINAS Y PARÁSITOS .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	27

HIPÓTESIS	.....	27
OBJETIVOS	.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS	.....	29
RESULTADOS	.....	36
DISCUSIÓN	.....	56
CONCLUSIÓN	.....	61
PERSPECTIVAS	.....	62
BIBLIOGRAFÍA	.....	63



## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
aa	Aminoácido
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
cPLC	Fosfolipasa C citosólica
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión a CRE
DEAE-Celulosa	Dietil-aminoetil-celulosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IgE	Inmunoglobulina E
IgG <sub>1</sub>	Inmunoglobulina G <sub>1</sub>
IL	Interleucina
IL-12R	Receptor del IL-12
INDO	Indometacina
INF- $\gamma$	Interferón gamma
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Linfocitos B
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MBD	Dominio de unión a membrana
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mL	Mililitros

mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
ng	Nanogramos
NK	Natural Killer
nm	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
NSAID	Drogas antiinflamatorias no esteroideas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PKC	Proteína cinasa C
PMN	Polimorfonucleares
PNC	Papel de nitrocelulosa

<b>LISTADO DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
FIGURA 1. Signos clínicos de la Leishmaniasis .....	2
FIGURA 2. Casos de Leishmaniasis en la República Mexicana .....	3
FIGURA 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ssp .....	5
FIGURA 4. Vía de la producción de prostaglandinas .....	16
FIGURA 5. Efecto de la prostaglandina E2 sobre células del sistema inmune .....	18
FIGURA 6. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de enzimas COX clásicas, y BLAST-P utilizando la secuencia de aminoácidos de una enzima tipo COX clásica ( <i>Mus musculus</i> ) sobre la base de datos de <i>Leishmania</i> ssp .....	37
FIGURA 7. SDS-PAGE y Western blot sobre muestras de <i>L. mexicana</i> , fraccionadas y purificadas por medio de DEAE Celulosa .....	39
Figura 8. Ensayo de actividad enzimática tipo COX sobre muestras de <i>L. mexicana</i> .....	39
FIGURA 9. Espectrometría de masas de la banda de aproximadamente 66 kDa que fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-COX-2 de ratón .....	40
FIGURA 10 Purificación de proteínas a partir de un extracto de <i>Leishmania mexicana</i> por medio de sulfato de amonio .....	42

FIGURA 11 Clonas que mostraron el reconocimiento de la proteína purificada .....	43
FIGURA 12 Microscopía de fluorescencia sobre parásitos de <i>Leishmania mexicana</i> utilizando las clonas B7, C5, C11, D12, F8 y G10 .....	44
FIGURA 13 Microscopía de fluorescencia sobre parásitos de <i>Giardia duodenalis</i> utilizando las clonas B7, C5, C11, D12, F8 y G10 .....	45-46
FIGURA 14 Microscopía de fluorescencia sobre parásitos de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando las clonas B7, C5, C11, D12 y F8 .....	47
FIGURA 15 Microscopía confocal sobre amastigotes y promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> utilizando la clona D12 .....	48-49
FIGURA 16 SDS-PAGE del inmunoprecipitado con el anticuerpo monoclonal D12 sobre una muestra purificada por medio de sulfato de amonio .....	50
FIGURA 17 Histograma de valores MASCOT para la proteína gp63 de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	51
FIGURA 18 Gp63 en diferentes organismos .....	53
FIGURA 19 Actividad COX sobre glicoproteínas de superficie de <i>L. mexicana</i> .....	54
FIGURA 20 Actividad COX sobre el inmunoprecipitado de gp63 de <i>L. mexicana</i> .....	55

## INTRODUCCIÓN.

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Leishmania*. Los parásitos de *Leishmania* son transmitidos por la picadura de una mosca de la arena hembra. Dicha enfermedad afecta la piel, las mucosas y las víceras del hombre y diversos animales. Su presencia está directamente vinculada a la pobreza, pero otros factores además de los ambientales y climáticos, influyen directamente en su epidemiología.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una de las grandes endemias, y es considerada una de las enfermedades infecciosas más importantes, para la cual no existe un control adecuado. Su prevalencia es de 12 millones de personas en todo el mundo, con otros 350 millones de personas en riesgo de infección. En México la enfermedad no es de notificación obligatoria, por lo que hay un subregistro nacional. Los estados del sureste mexicano son los más afectados por este padecimiento (Sosa Ávila Ediel Javier 2014).

La leishmaniasis consiste de cuatro síndromes clínicos (Fig. 1): leishmaniasis cutánea, leishmaniasis muco-cutánea (también conocida como espundia), leishmaniasis visceral (también conocida como kala-azar) y leishmaniasis dermal post-kala-azar. La leishmaniasis visceral es la forma más seria, en la cual el parásito sale del sitio de la inoculación y prolifera en el hígado, el bazo y la médula ósea; dando como resultado inmunosupresión y finalmente la muerte en la ausencia de tratamiento. En la leishmaniasis cutánea el parásito sigue en el sitio de inoculación y causa grandes ulceraciones localizadas. En la leishmaniasis muco-cutánea ocurre una destrucción crónica del tejido mucosal que se desarrolla a partir de la enfermedad cutánea en menos del 5% de los individuos afectados. La leishmaniasis dermal post-kala-azar se caracteriza por erupciones nodulares y es una complicación de la leishmaniasis visceral que se observa frecuentemente después del tratamiento (Chappuis, Sundar et al. 2007).

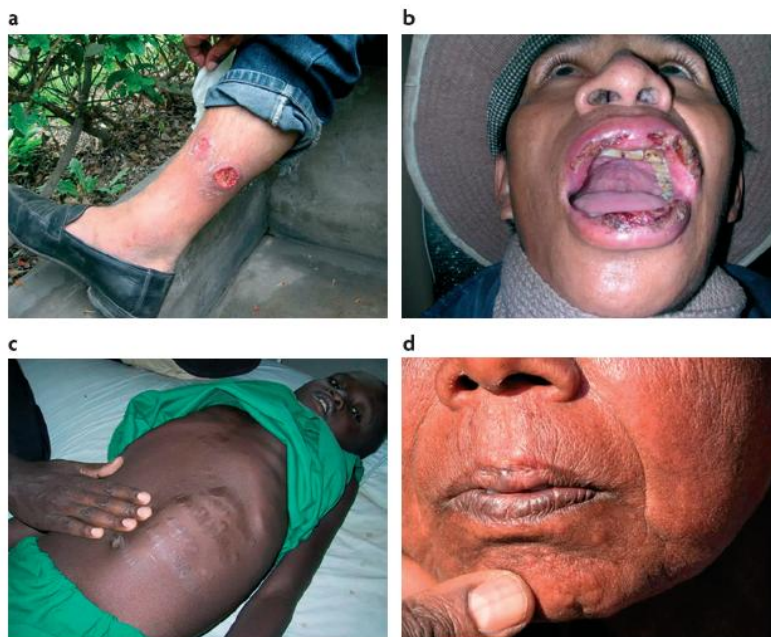


Figura 1. Signos clínicos de la *Leishmaniasis*. a) Un paciente de Perú con leishmaniasis cutánea. b) Un paciente de Bolivia con leishmaniasis mucosal. c) Un paciente de Uganda con leishmaniasis visceral. d) Un paciente de la India con leishmaniasis dermal post-kala-azar nodular (PKDL). Chappuis F., Sundar S., Hailu A., et al. 2007.

La mayoría de las muertes resultan de la forma de leishmaniasis visceral, causada por *L. donovani* o *L. chagasi*; 90% de los casos anuales son reportados en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudan. Las manifestaciones más comunes son lesiones cutáneas; 90% de los nuevos casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria, y son causadas principalmente por *L. major* y *L. mexicana*. Hasta el 2010 se ha estimado que más de 12 millones de individuos fueron infectados por varias especies de *Leishmania* en 88 países, con 1.5 a 2 millones de casos clínicos (World-Health-Organisation 2002; World Health Organization 2014).

Con 2 millones de nuevos casos reportados anualmente y 350 millones de personas en riesgo, la infección por el parásito *Leishmania* representa un importante problema de salud global para el cual no hay vacunas y las drogas que se utilizan son poco efectivas.

A nivel mundial, la transmisión a través del vector (mosca hembra de la arena) es el modo más común, pero existen otras formas de transmisión como la parenteral, congénita, sexual y ocupacional. En el Caribe mexicano la manifestación más común es la cutánea localizada, conocida también como “úlceras del chiclero” y representa el 99% de los casos nuevos en esta zona, donde el agente causal es *Leishmania mexicana*. El padecimiento se inicia con una pápula pequeña, eritomatosa e indolora, de crecimiento gradual, con infiltrado y úlcera central, fondo limpio sin secreción purulenta, con aspecto de tejido de granulación.

En México durante el periodo de 2006-2011 se reportaron 3,657 casos de Leishmaniasis (Sosa Ávila Ediel Javier 2014), 72% en el sexo masculino y 28% en el sexo femenino. Las entidades federativas con mayor número de casos fueron, Tabasco y Quintana Roo (Fig. 2).

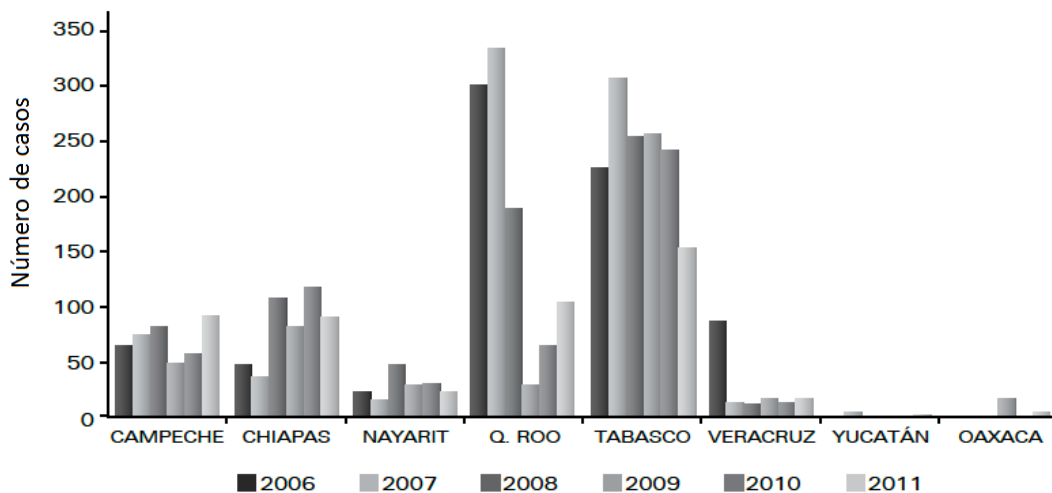


Figura 2. Casos de Leishmaniasis reportados en la República Mexicana en el periodo de 2006-2011. (Sosa Ávila et al 2014).

Los métodos de diagnóstico de la Leishmaniasis más empleados son el examen microscópico de una muestra biológica y posterior cultivo del parásito, detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o reacción de Montenegro; en el caso de leishmaniasis visceral se utiliza el aspirado de tejido esplénico, médula ósea o ganglio linfático, prueba de aglutinación directa, detección de antígeno en orina y PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Khan, Bhaskar et al. 2014; Okumura, Yamauchi et al. 2014).

Los tratamientos de primera elección para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis son las sales de antimonio pentavalente, como el antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime) y el estibogluconato de sodio (Pentostam) (McGwire and Satoskar 2014).

### **CICLO DE VIDA.**

Se reconocen dos etapas en el desarrollo de *Leishmania*: el promastigote y el amastigote. Los promastigotes que se encuentran dentro del vector tienen una forma alargada y un flagelo largo, y pueden ser clasificados como promastigotes procíclicos, los cuales se multiplican en el intestino del vector, o como promastigotes metacíclicos los cuales son la forma infectiva y se encuentran en la probóscide y parte anterior del intestino de la mosca donde no se divide.

El ciclo de vida de este parásito (Fig. 3) comienza cuando el vector inocular la etapa infectiva, los promastigotes, cuando se alimenta de la sangre del hospedero por medio de una picadura. Los promastigotes que entraron por la picadura del insecto son fagocitados por los macrófagos y dentro de ellos se transforman en amastigotes. Los amastigotes se multiplican en las células infectadas y afectan diferentes tejidos, dependiendo de la especie de *Leishmania*. Esto origina las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. El vector se infecta cuando se alimenta de sangre por medio de una picadura,



donde la sangre lleva macrófagos infectados con amastigotes. En el intestino medio del vector los parásitos se diferencian en promastigotes los cuales se multiplican y migran hacia la probóscide.

*Leishmania* es un patógeno intracelular obligado que infecta a las células hematopoyéticas del linaje monocito/macrófago, en las cuales penetra por fagocitosis. Se sabe que los macrófagos se especializan en la destrucción de patógenos y activan la respuesta inmune del hospedero, sin embargo *Leishmania* ha desarrollado mecanismos sofisticados para sobrevivir a la función normal del macrófago. Dentro de éstos se incluye la inhibición de la producción de agentes antimicrobianos como el óxido nítrico (NO), así como también la inhibición de muchas de las funciones del macrófago inducidas por citocinas necesarias para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva.

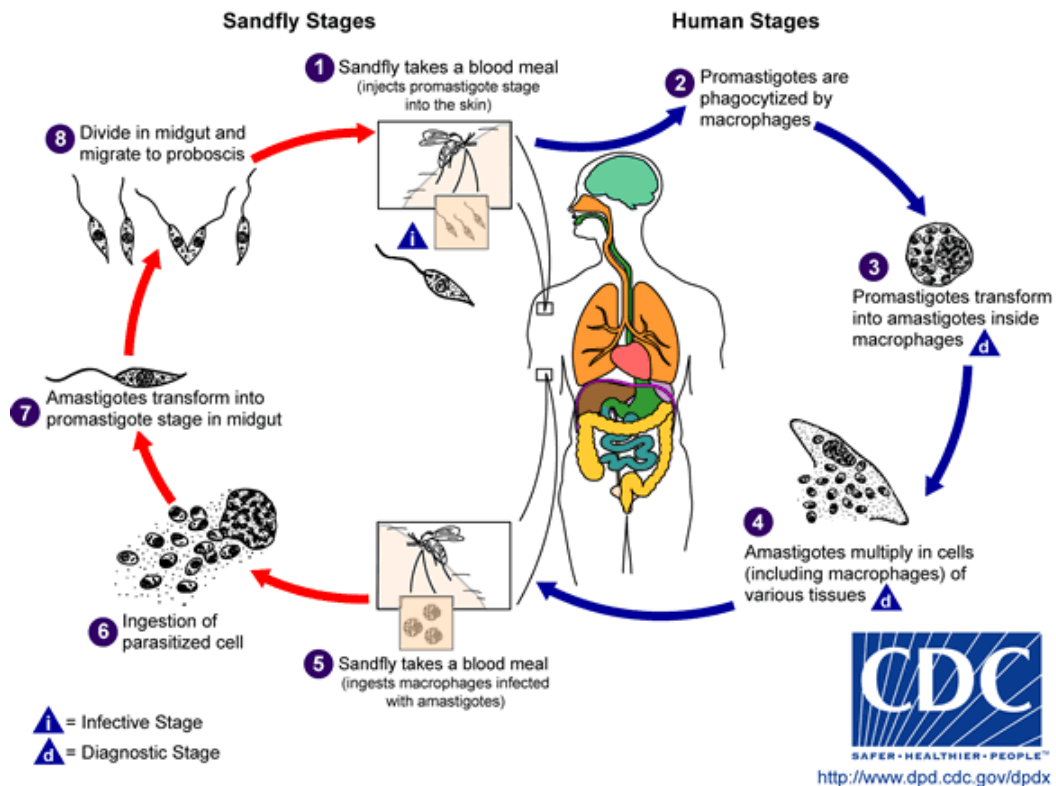


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* ssp. Tomado de: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

## **MOLÉCULAS DE SUPERFICIE Y MOLÉCULAS SECRETADAS POR EL PARÁSITO.**

Además de distinguirse por su morfología y localización, las etapas del desarrollo de los parásitos de *Leishmania* se distinguen por la composición de sus moléculas de superficie. Los promastigotes procíclicos están cubiertos por un grueso glicocalix de 7 nm de espesor. El glicocálix de los promastigotes metacíclicos es más grueso, siendo de 17 nm, y en los amastigotes está completamente ausente (Pimenta, Saraiva et al. 1991). La composición de este glicocalix comprende glicoproteínas y otras especies glicosiladas, las cuales están ancladas a la superficie de la membrana por un residuo glicosilfosfatidilinositol característico (GPI) (Ferguson 1997). La molécula de superficie predominante de los promastigotes es el lipofosfoglicano (LPG). Esta estructura varía entre las especies de *Leishmania*, pero está compuesta principalmente de unidades repetidas que consisten de un disacárido y un fosfato, unidos a la membrana por un ancla GPI. Las especies de *Leishmania* difieren marcadamente por la presencia de cadenas de glicanos, así como su composición y posición sobre la estructura del "core" del LPG. El LPG de *L. major*, por ejemplo, es muy ramificado, mientras que el de *L. donovani* no lo es (McConville, Schnur et al. 1995). Además, la estructura del LPG difiere entre los promastigotes procíclicos y metacíclicos, siendo significativamente más grande en la última y casi completamente ausente en los amastigotes (McConville, Turco et al. 1992). Se ha mostrado que el LPG tiene un importante papel en la sobrevivencia y modulación de la respuesta inmune, y las diferencias en la estructura y distribución del LPG son importantes para las diferentes propiedades de las diferentes etapas del desarrollo de *Leishmania*.

Otra molécula de superficie importante es la glicoproteína gp63 (proteasa de superficie del promastigote). Esta es una metaloproteasa dependiente de zinc, con un amplio rango de sustratos, los cuales incluyen: caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina, y fibrinógeno (McMaster, Morrison et al.

1994). Siendo 10 veces menos abundante que el LPG, gp63 se encuentra en toda la superficie del promastigote (McConville and Blackwell 1991). Al igual que el LPG, gp63 es regulada negativamente en la forma de amastigote (Schneider, Rosat et al. 1992).

La molécula de superficie más abundante del promastigote es la glicosilinositol fosfolípido (GIPL), una clase de glicolípidos unidos a GPI. Estas moléculas son 10 veces más abundantes que el LPG, pero su tamaño pequeño los mantiene muy cerca de la membrana del parásito; la función que tienen en la interacción con el huésped no es clara. En contraste al LPG, el cual es removido continuamente, GIPL tiene una vida media larga y se cree que tiene un papel protector en la superficie del promastigote (Proudfoot, O'Donnell et al. 1995).

La disponibilidad de la base de datos del genoma de *L. major* ha revelado la posible existencia de 65 cisteína peptidasas putativas; algunas de ellas con funciones claras en la sobrevivencia del parásito y en la progresión de la enfermedad, particularmente durante la infección con *L. mexicana* (Mottram, Coombs et al. 2004). Cerca del 50% de la actividad cisteína peptidasa se localiza dentro de los lisosomas del parásito, pero es poco probable que tenga un papel directo en la modulación de la señalización del macrófago (Ilg, Fuchs et al. 1994). Sin embargo también es claro que un número importante de cisteína peptidasas son liberadas después de la muerte del amastigote (Brooks, Tetley et al. 2000). Las proteasas liberadas pueden modular la actividad del macrófago, actuando directamente sobre la superficie celular del hospedero.

Esta lista está lejos de estar completa, y es probable que otras moléculas de superficie jueguen papeles importantes en aspectos de la modulación específica de la respuesta inmune del hospedero. En particular, los amastigotes expresan algunas metaloproteasas activadas por  $\beta$ -mercaptoetanol pobremente caracterizadas, las cuales son capaces de incorporar lípidos de membrana de la célula hospedera. Además otras

moléculas secretadas, tales como proteofosfoglicano y fosfatasas ácidas, han sido relacionadas en forma directa con la sobrevivencia y patogenicidad del parásito.

## **INTERACCIÓN INICIAL Y FAGOCITOSIS.**

Después de que los parásitos de *Leishmania* han sido inoculados por el vector, los promastigotes primero tienen que evadir la lisis mediada por el complemento hasta que son fagocitados por un macrófago. Los promastigotes procíclicos de *L. major* no pueden resistir la acción del complemento, mientras que la forma metacíclica, la cual está mejor capacitada para la transmisión al hospedero, puede evadir totalmente la lisis por el complemento (Puentes, Dwyer et al. 1989). Se ha mostrado que esta diferencia en la resistencia al complemento depende de las ramificaciones del LPG en la superficie del parásito. El LPG es más largo sobre la superficie de los promastigotes metacíclicos y se ha observado que evita la unión de las subunidades del complemento C5b-C9, las cuales desencadenan la lisis celular. Sin embargo, los promastigotes de *L. donovani* evitan la formación de la convertasa C5 a través de la fijación de la subunidad inactiva C3bi sobre sus superficies (Puentes, Dwyer et al. 1989). Se ha reportado que la glicoproteína de superficie gp63 protege a *L. amazonensis* y a *L. major* de la lisis celular a través de la conversión de C3b a C3bi, favoreciendo la opsonización e internalización del parásito (Brittingham, Morrison et al. 1995). También se ha propuesto que una proteína cinasa de *L. major* pudiera fosforilar miembros del sistema del complemento y dar como resultado la inactivación de la cascada (Hermoso, Fishelson et al. 1991).

Las moléculas de superficie del parásito también juegan un importante papel durante la unión al macrófago. La opsonización *in vivo* de promastigotes metacíclicos de *Leishmania* por C3b y C3bi permite la interacción con los receptores del complemento 1 y 3 (CR1 y CR3 respectivamente). Sin

embargo, ya que C3b es rápidamente convertido a C3bi por gp63, parece ser que el receptor más importante es CR3. La unión vía CR3 más que CR1 es una ventaja para el parásito ya que no accionará el estallido respiratorio durante la fagocitosis (Mosser and Edelson 1987). Los promastigotes también pueden unirse al macrófago vía el receptor manosa-fucosa, el cual se une a los residuos de manana del LPG (Blackwell, Ezekowitz et al. 1985). El LPG también puede interactuar con la proteína C reactiva (CRP), un producto inflamatorio temprano, lo cual conlleva a la fagocitosis vía el receptor CRP sin conducir a la activación del macrófago que se observa después de la fagocitosis mediada por el receptor CRP (Bodman-Smith, Mbuchi et al. 2002). Se ha identificado una molécula relacionada al ICAM, ICAML, que puede ser necesaria para la interacción entre el parásito y macrófagos murinos de la línea celular J774 (Chiang and Sefton 2001). Se ha reportado que el bloqueo de la proteína de superficie GIPL con anticuerpos específicos inhibe la unión de *L. major*. Los amastigotes también pueden ser internalizados en una forma dependiente del receptor Fc después de la opsonización con anticuerpos específicos. El gran número de receptores implicados sugiere un grado de redundancia entre las interacciones parásito-macrófago, aunque parece que son necesarias varias interacciones para la internalización (Brittingham, Chen et al. 1999).

Después de la unión al macrófago, los promastigotes de *Leishmania* son internalizados en el endosoma, el cual tiene un ambiente relativamente benigno para ellos. Así como los amastigotes, los promastigotes son vulnerables a la degradación por el ambiente ácido o hidrolítico del fagolisosoma. Sin embargo, ellos retardan la maduración del endosoma y evitan la fusión del endosoma con el fagosoma, un proceso dependiente de LPG (Desjardins and Descoteaux 1997). Este retardamiento se ha observado por la ausencia de marcadores endosomales tales como Rab7 y LAMP-1, y puede estar relacionado a la acumulación de F-actina dependiente de LPG (Holm, Tejle et al. 2001).

Otra estrategia de supervivencia usada por los parásitos de *Leishmania* es la inhibición de enzimas hidrolíticas y otras moléculas destructivas que son secretadas en el fagolisosoma. Se cree que dos moléculas de *Leishmania*, llamadas peroxidoxinas LcPxn1 y 2 (Barr and Gedamu 2003), y una superóxido dismutasa (Ghosh, Goswami et al. 2003) consumen derivados de nitrito e intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), los cuales son pequeñas moléculas microbicidas importantes. Además se ha evidenciado que el LPG puede promover la supervivencia del promastigote por la neutralización de ROI (Chan, Fujiwara et al. 1989). El LPG también puede proteger contra enzimas lisosomales, tal vez por su fuerte carga negativa y unidades repetidas de manosa-galactosa; la actividad proteolítica de la molécula de superficie gp63 es óptima al pH ácido encontrada en los fagolisosomas, lo que apoya que esta enzima tiene como blanco enzimas lisosomales (Seay, Heard et al. 1996). Sin embargo, esta función es cuestionable, ya que parásitos con mutaciones en los 6 genes de gp63 son capaces de sobrevivir, diferenciarse y replicarse dentro de los macrófagos (Joshi, Sacks et al. 1998).

## **INHIBICIÓN DE LAS FUNCIONES DEL MACRÓFAGO**

La internalización de *Leishmania* dentro de las células del hospedero le permite escapar a muchos mecanismos de respuesta inmune, sin embargo, también es necesario inhibir numerosas funciones del macrófago, particularmente aquéllas involucradas en la activación del macrófago, así como también la expresión de genes. Se han realizado estudios donde se mostró que el 37% de 245 genes del macrófago fueron reprimidos después de la infección con amastigotes *in vitro* (Buates and Matlashewski 2001).

Recientemente se ha encontrado que *Leishmania donovani* suprime la actividad microbicida del macrófago a través de la inducción selectiva proteínas supresoras de señalización de citosinas (SOCS) (Srivastav, Basu Ball et al. 2014).

## **PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES MICROBICIDAS.**

Dos tipos de moléculas microbicidas son reconocidas por su eficacia contra *Leishmania*: NO y ROI (Murray 1982; Liew, Millott et al. 1990). El NO es crítico para eliminar al parásito, ya que ratones carentes de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), no son capaces de controlar la infección, y los macrófagos de estos ratones son incapaces de eliminar promastigotes en cultivo. Macrófagos infectados o macrófagos incubados con las moléculas de superficie LPG o GIPL de *Leishmania* pierden la capacidad de inducir iNOS o generar NO en respuesta a interferón o LPS. Sin embargo se ha observado que el IFN y el LPG pueden actuar juntos para generar NO cuando se administran simultáneamente a macrófagos vírgenes (Proudfoot, O'Donnell et al. 1995; Proudfoot, Nikolaev et al. 1996). Esto sugiere que el contacto entre el parásito y el macrófago impide la respuesta del macrófago a una subsecuente exposición al IFN producido por células linfoides. La inhibición de la producción del óxido nítrico puede ser resultado de la producción de interleucina 10 o factor de crecimiento transformante, inactivación de la vía JAK/STAT, activación de fosfatasas de fosfotirosinas y producción de ceramidas.

Por su parte, ratones deficientes en ROI pueden controlar la infección, después de un periodo inicial de incremento en la susceptibilidad, indicando que ROI juega un papel menos importante en la eliminación del parásito. Sin embargo la generación de ROI también es inhibida por *L. donovani*. La inhibición parece ser dependiente de las moléculas de superficie LPG y gp63 (Sorensen, Hey et al. 1994; Descoteaux and Turco 1999).

## **PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO**

Además de reprimir las actividades microbicidas del macrófago hospedero, *Leishmania* inhibe la capacidad de la célula hospedera para presentar antígenos del parásito a otros componentes del sistema inmune. Macrófagos

infectados con promastigotes procíclicos son capaces de presentar inicialmente el antígeno LACK del parásito, pero éstos pierden dicha capacidad cuando el parásito llega a diferenciarse. Además macrófagos infectados con promastigotes metacíclicos presentan muy poco antígeno LACK y las células infectadas con amastigotes no lo presentan (Courret, Prina et al. 1999).

Algunos estudios han mostrado que *L. donovani* inhibe la presentación de antígeno al reprimir la expresión del gen del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MHC) de manera basal y después de la estimulación con IFN- $\gamma$ ; mientras que macrófagos infectados con *L. amazonensis* mostraron niveles normales de MHC de clase II. La presentación de antígeno puede ser inhibida en este caso por interferencia con la carga de antígenos dentro de las moléculas del MHC de clase II o por el secuestro de la molécula MHC de clase II del fagolisosoma. Concordando con la localización fagosomal de *Leishmania*, el MHC de clase II parece ser más importante que el de clase I para la resistencia. Ratones deficientes en el MHC de clase I son resistentes a la infección con *L. major*, pero ratones deficientes en el MHC de clase II son susceptibles (Locksley, Reiner et al. 1993; Huber, Timms et al. 1998).

La presentación de antígeno depende de la comunicación celular a través de moléculas coestimuladoras tales como B7/CD28 y CD40/CD40L. Se ha demostrado que macrófagos infectados con *L. donovani* no pueden expresar B7-1 en respuesta a la estimulación con LPS y que este proceso de inactivación es dependiente de prostaglandina. Se ha observado que la inhibición de la unión de CD40 con CD40L es la responsable de la ausencia de iNOS y actividades microbicidas de los macrófagos y que la resolución de la infección causada por *L. major* depende de la unión de CD40 con CD40L (Campbell, Owendale et al. 1996; Heinzl, Rerko et al. 1998). Estudios recientes sugieren que la señalización dependiente de p38 disparada por la interacción de CD40 está alterada en macrófagos infectados, y esto puede



conducir a una disminución en la expresión de iNOS. En contraste, la represión de la expresión del gen del MHC de clase II parece involucrar un mecanismo independiente de AMP cíclico (Kwan, McMaster et al. 1992).

## **INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.**

*Leishmania* evita la activación de una respuesta inmune específica al inhibir la producción de ciertas citocinas, particularmente aquéllas involucradas en la respuesta inflamatoria (IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ]) o en la activación de los linfocitos T (IL-12). Se ha reportado que la secreción de IL-1 $\beta$  inducida por LPS puede ser inhibida en macrófagos expuestos a LPG o en macrófagos infectados con *L. donovani* (Reiner, Ng et al. 1987; Reiner, Ng et al. 1990). También se ha observado que *L. major* induce la transcripción de IL-1 $\alpha$ , aunque ello no se refleja en un incremento en su secreción. Interesantemente, la inducción de IL-1 $\alpha$  parece ser dependiente de Myd88, sugiriendo un papel para los receptores Toll-like. Aunado a lo anterior la producción de TNF- $\alpha$  también se reduce en macrófagos tratados con LPS (Descoteaux and Matlashewski 1989). Estudios *in vivo* han mostrado claramente que citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) así como varias quimiocinas, una familia de citocinas responsables del reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la infección, fueron inducidas en las etapas tempranas de la infección con *L. donovani* y *L. major* (Matte, Maion et al. 2001). Promastigotes de *L. major* mostraron ser mejores activadores de eventos proinflamatorios que los de *L. donovani*, ya que generan un gran reclutamiento de células inflamatorias. Esto puede reflejar las diferentes patologías causadas por las dos cepas. Además, ambas especies reclutan una población heteróloga de células inflamatorias, que incluyen neutrófilos y monocitos macrófagos (Matte, Maion et al. 2001). La IL-12 juega un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune celular. Es esencial para la activación de los linfocitos T y la subsecuente secreción de

IFN- $\gamma$  conduciendo a la activación del macrófago y producción de moléculas microbicidas. Por todo esto, no es sorprendente que *Leishmania* haya desarrollado la capacidad para inhibir la producción de IL-12. Esto se ha mostrado *in vitro* para promastigotes de *L. donovani* y *L. major*, amastigotes de *L. mexicana* y la porción fosfoglicano del LPG. También ha sido reportada la inhibición de IL-12 en ratones infectados con *L. major* (Belkaid, Butcher et al. 1998).

### **INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS INMUNOSUPRESORAS POR LA INFECCIÓN CON *LEISHMANIA*.**

Además de la inhibición de las funciones del macrófago, los parásitos de *Leishmania* pueden inducir la producción y secreción de varias moléculas de señalización inmunosupresoras, tal es el caso de los metabolitos del ácido araquidónico y las citocinas TGF- $\beta$  e IL-10, las cuales afectan directa o indirectamente a diferentes tipos celulares y distorsionan la respuesta inmune normal favoreciendo la sobrevivencia del parásito. La producción de TGF- $\beta$  es inducida por varias especies de *Leishmania* tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la secreción de TGF- $\beta$  correlaciona con la expresión retardada de iNOS y una actividad reducida de las células NK en los nódulos linfáticos. Se ha demostrado que *L. chagasi* induce la producción de TGF- $\beta$  en el ambiente inmediato del macrófago infectado y esto puede permitir la inhibición local de la respuesta inmune (Gantt, Schultz-Cherry et al. 2003). Interesantemente, el incremento en la producción de TGF- $\beta$  parece no ser resultado del incremento de la expresión del gen, sino del corte de pro-TGF- $\beta$  por las cisteína proteasas de los amastigotes para producir TGF- $\beta$  activo.

IL-10 es otra citocina anti-inflamatoria producida *in vitro* por macrófagos infectados con *Leishmania*, aparentemente vía la interacción con el receptor Fc $\gamma$ . Esta producción puede ser la responsable de la supresión de la actividad microbicida del macrófago que involucra al NO, producción de

varias citocinas (IL-1, IL-12, y TNF) y expresión de moléculas coestimuladoras tales como B7-1/2. La importancia *in vivo* se ilustró por la observación de que ratones transgénicos que expresan en forma constitutiva IL-10 no son capaces de controlar la infección por *Leishmania* (Kane and Mosser 2000).

Se ha observado también que los macrófagos infectados con *Leishmania* generan prostaglandina E<sub>2</sub> favoreciendo la sobrevivencia del parásito y la progresión de la enfermedad (Farrell and Kirkpatrick 1987). Se ha reportado que este metabolito del ácido araquidónico causa la inhibición de la proliferación del macrófago y también suprime la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 e intermediarios de oxígeno. Un estudio reciente reportó que la inducción de PGE<sub>2</sub> en macrófagos infectados con *L. donovani* depende de la expresión de la ciclooxigenasa 2 y activación de la vía PKC. Interesantemente, un estudio ha correlacionado el incremento de la enfermedad visceral de *L. donovani* en ratones mal nutridos con el incremento en la producción de PGE<sub>2</sub> en los nódulos linfáticos.

Se ha reportado también que macrófagos de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* producen altos niveles de PGE<sub>2</sub> y que lo hacen vía inducción de COX-2 en las etapas tempranas de la infección (Arrieta 2005). Posteriormente se analizó cual era la vía probable por la cual se inducía la expresión de COX-2 y se encontró que ERK 1/2, p38 y JNK se relacionaban con la expresión de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub> en macrófagos infectados con *L. mexicana* (Martínez 2007). Recientemente se reportó que *L. mexicana* posee una actividad tipo ciclooxigenasa que es capaz de generar PGH<sub>2</sub> a partir de AA, el cual es el precursor de las prostaglandinas de la serie 2 (Diaz 2007). Estos resultados nos indican que la producción de PGE<sub>2</sub> es muy importante ya que tiene funciones inmunomoduladoras que le permiten al parásito evadir la respuesta inmune.

## LAS PROSTAGLANDINAS COMO MODULADORES DE LA INMUNIDAD.

Las prostaglandinas son moléculas lipídicas pequeñas que regulan numerosos procesos en el cuerpo, tales como la función del riñón, la agregación plaquetaria, la liberación de neurotransmisores y la modulación de la función inmune. La producción de prostaglandinas comienza con la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos de la membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub> en respuesta a estímulos inflamatorios. El ácido araquidónico es convertido a PGH<sub>2</sub> por las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. COX-1 (Fig. 4) se expresa constitutivamente en muchos tejidos del cuerpo y actúa para mantener los procesos homeostáticos, como la secreción de moco. COX-2, por el contrario, es una enzima inducible y está involucrada primordialmente en la regulación de la inflamación (Smith, Meade et al. 1994).

Las sintasas de prostaglandinas específicas de célula convierten el PGH<sub>2</sub> en una serie de prostaglandinas que incluyen PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>.

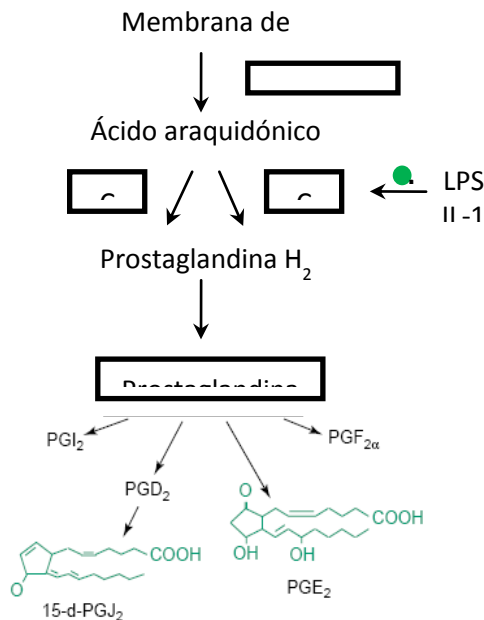


Figura 4. Vía de la producción de prostaglandinas. El ácido araquidónico es liberado de la membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) producen prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) a partir del ácido araquidónico. PGH<sub>2</sub> actúa en la síntesis de prostaglandinas para producir PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>. (Harris et al., 2002).

Una de las prostaglandinas mejor conocidas y más estudiadas es la PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>2</sub> es producida por muchas células del cuerpo, las cuales incluyen: fibroblastos, macrófagos y algunos tipos de células malignas y ejercen su acción por la unión a uno de cuatro tipos de receptores (EP1, EP2, EP3 y EP4). En el ratón, el subtipo EP3 consiste de tres diferentes isoformas, llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Recientemente varios reportes han documentado la expresión de receptores EP funcionales (EP1, EP3 y EP4) sobre las membranas nucleares de las células. Los receptores son funcionales porque ellos pueden modular la transcripción, como por ejemplo: el gen que codifica la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) (Bhattacharya, Peri et al. 1999).

La PGE<sub>2</sub> tiene diversos efectos sobre la regulación y actividad de las células del sistema inmune (Fig. 5), en células T modula la proliferación, apoptosis y producción de citocinas. La inhibición de la proliferación de las células T por la PGE<sub>2</sub> esta bien establecida y actualmente se esta estudiando el mecanismo de inhibición. Se ha reportado que la inhibición de la proliferación se debe en parte a la inhibición de la síntesis de poliamina (Ruggeri, Nicocia et al. 2000). También se ha encontrado que la PGE<sub>2</sub> inhibe la liberación de calcio intracelular (Choudhry, Hockberger et al. 1999) y la actividad de la proteína tirosina cinasa p59 (fyn) (Choudhry, Ahmed et al. 1999); ambos efectos pudieran ser los responsables de la disminución en la proliferación. Interesantemente, los receptores EP también han sido implicados en la inhibición de la proliferación debido a una disminución en la secreción de interleucina-2 (IL-2).

La PGE<sub>2</sub> juega un importante papel en el desarrollo y actividad de las células B. La PGE<sub>2</sub> suprime la proliferación de células B inmaduras, pero no tiene efecto sobre células B maduras. La PGE<sub>2</sub> también es un potente inductor de la apoptosis de células B inmaduras, pero no induce la muerte de células B maduras. La PGE<sub>2</sub> regula la actividad de células B maduras por la inhibición de ciertos eventos de activación.

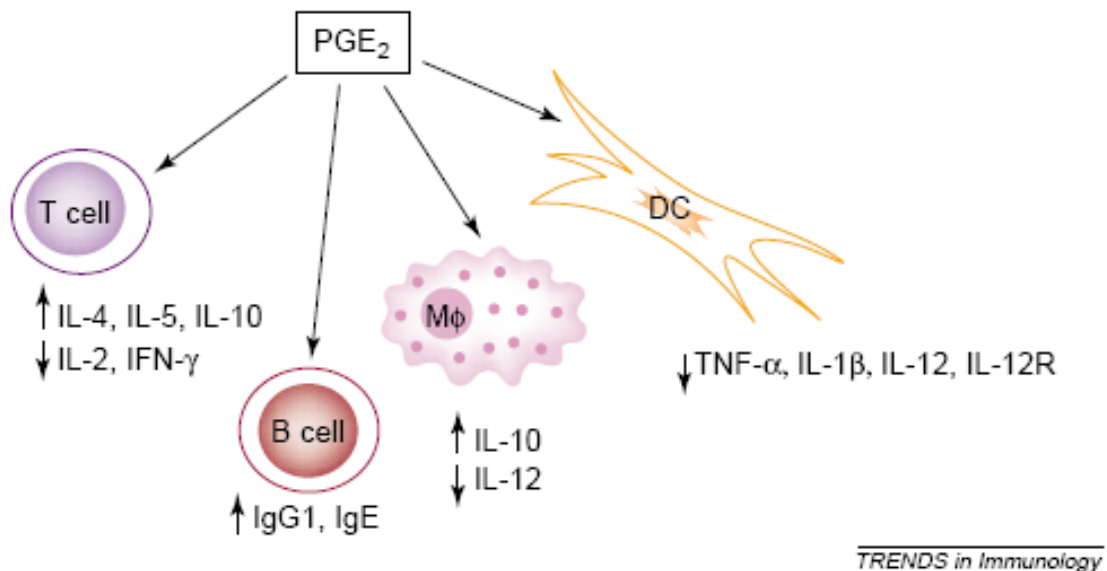


Figura 5. La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) aumenta la producción de citocinas del tipo Th2. La PGE<sub>2</sub> actúa sobre las células T para aumentar la producción de interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-10, pero inhibe la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Sobre las células B, la PGE<sub>2</sub> estimula el cambio de isotipo para inducir la producción de IgG1 e IgE. La prostaglandina E<sub>2</sub> actúa sobre células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas, para inducir la expresión de IL-10 e inhibir la expresión de IL-12 y el receptor de IL-12, factor de necrosis tumoral alfa e IL-1 $\beta$ . Todo esto resulta en el aumento de la respuesta de linfocitos Th2 y la inhibición de la respuesta Th1 por la PGE<sub>2</sub>. (Harris et al 2002).

Células B activadas con LPS e IL-4 y tratadas con PGE<sub>2</sub> pierden la capacidad de agrandarse y se inhibe la expresión de MHCII y FcERII. La PGE<sub>2</sub> estimula la producción de IgG1 e IgE en células B estimuladas con LPS e IL-4 por un mecanismo dependiente de cAMP. Esta inducción de la expresión de IgE e IgG1 por la prostaglandina E<sub>2</sub> apoya la teoría de que la PGE<sub>2</sub> actúa predominantemente para inducir respuestas del tipo Th2 (Harris, Padilla et al. 2002).

## **CICLOOXIGENASAS.**

Las ciclooxigenasas (COXs) las cuales también se conocen como prostaglandinas H<sub>2</sub> sintetasas (EC1.14.99.1) son enzimas unidas a membrana que catalizan la biosíntesis de prostanoïdes. Los prostanoïdes son miembros de un gran grupo de bioactivos, compuestos oxigenados C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub> que derivan de ácidos grasos poliinsaturados ω<sub>3</sub> (n-3) ω<sub>6</sub> (n-6). En mamíferos el ácido araquidónico (AA; 20:4 n-6) es el principal precursor prostanoïde. COX convierte el ácido araquidónico a PGG<sub>2</sub>, el cual se reduce a través de una peroxidasa para formar PGH<sub>2</sub>. La reacción de COX es el blanco de la aspirina, ibuprofeno, y otras drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs). Muchas evidencias sugieren que las isoenzimas tienen un rol directo en muchas patologías humanas. Estas incluyen: trombosis, inflamación, dolor y fiebre, varios cánceres, y desordenes neurológicos como el Alzheimer y el Parkinson.

En 1971, Sir John Vane reportó que la aspirina, el salicilato y la indometacina inhiben la síntesis de prostaglandinas en una manera dosis dependiente. Inicialmente se supuso que una sola enzima ciclooxigenasa era la responsable de producir prostaglandinas, las cuales a su vez son las responsables de una variedad de efectos que incluyen: dolor, inflamación, fiebre, agregación plaquetaria y citoprotección. Vane propuso que todos los NSAIDs inhiben COX y por lo tanto disminuyen la síntesis de prostaglandinas. Esta enzima COX fue purificada de vesículas seminales de cordero en 1976 y clonada por varios grupos en 1988. Se encontró que COX era una glicoproteína unida a la membrana que contenía un grupo hemo. Ésta fue más abundante en el retículo endoplásmico de células que producen prostanoïdes. Sus principales acciones son: (1) la ciclización del ácido araquidónico en el cual se adiciona un grupo 15-hidroperóxido a la forma PGG<sub>2</sub> (por tal motivo el nombre de ciclooxigenasa), y (2) reducción del grupo hidroperóxido naciente de la PGG<sub>2</sub> para formar el grupo hidroxilado, la PGH<sub>2</sub> (Smith 1986). También se ha encontrado que COX puede producir

prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) y otras prostaglandinas monoenoicas cuando está presente el ácido dihemo- $\gamma$ -linoléico en lugar del ácido araquidónico (Kirtland 1988).

En 1991, una segunda isoforma de COX fue descubierta y nombrada como COX-2. La enzima original (COX-1) y COX-2 son similares en estructura y actividad catalítica, pero se encontró que son diferentes genéticamente ya que el gen para COX-1 se encuentra mapeado en el cromosoma 9q32-q33.3 (Funk, Funk et al. 1991) y el gen para COX-2 en el cromosoma 1q25.2-q25.3 (Tay, Squire et al. 1994). COX-2, como COX-1, catalizan dos reacciones enzimáticas secuenciales (oxigenación y reducción del ácido araquidónico). Las dos funciones de la enzima COX ocurren en sitios distintos pero relacionados entre sí. El paso de oxigenación ocurre en un canal dentro de la molécula de COX, mientras que la reducción enzimática ocurre en el sitio que contiene el grupo hemo sobre la superficie de la molécula.

COX-1 y COX-2 tienen un peso molecular de 72 KDa y comparten un 61% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Una diferencia importante en la secuencia de nucleótidos de estas dos moléculas se localiza en sus regiones promotoras. La región promotora del gen COX-1 humano carece de una caja TATA o CAAT. Estas características llevan a COX-1 a ser una enzima constitutiva en la mayoría de las células. Por el contrario COX-2 tiene múltiples secuencias reguladoras transcripcionales en esta región promotora, las cuales incluyen una caja TATA, un motivo NF-IL6, dos sitios AP-2, tres sitios SP1, dos sitios NF- $\kappa$ B, un motivo CRE y una caja E (E-box). Por lo tanto, la expresión del gen de COX-2 puede ser inducida por múltiples citocinas y factores de crecimiento, vía la activación de proteínas reguladoras transcripcionales que actúan sobre esos sitios promotores. Así COX-2 parece ser la COX primaria que controla la síntesis de PGE<sub>2</sub> en respuesta a la inflamación.

Las estructuras cristalinas de COX-1 y COX-2 son casi idénticas. Cada isoenzima COX contiene 3 dominios principales: (1) un dominio EGF (factor



de crecimiento epidermal) en el N-terminal, un dominio de unión a membrana helicoidal (MBD), y (3) un gran dominio catalítico en el C-terminal (Luong, Miller et al. 1996). El dominio MBD contiene cuatro hélices, las cuales rodean la abertura donde los ácidos grasos (p.e., ácido araquidónico) y NSAIDs entran en el sitio activo de la ciclooxigenasa.

Aunque la aspirina y NSAIDs inhiben la actividad biosintética de ambas enzimas COX, sus acciones no son idénticas. La aspirina inhibe irreversiblemente el sitio activo de la ciclooxigenasa, pero no afecta la porción peroxidasa de la enzima. Interesantemente, la aspirina no solo inhibe a COX-2, sino que desvía esta actividad enzimática hacia la síntesis de precursores de lipoxina A<sub>4</sub>, un potente lípido antiinflamatorio. Por el contrario NSAIDs compite con el ácido araquidónico por los sitios activos de ambas enzimas COX. Los sitios activos de COX-1 y COX-2 son similares en estructura, pero difieren en tamaño. El sitio activo de COX-2 es grande, esto debido al reemplazo de isoleucina-434 de COX-1 con valina-434. La identificación de las diferencias entre los sitios activos permitió el desarrollo de inhibidores específicos de COX-2, los cuales encajan o caben en COX-2, pero son excluidos por COX-1. A pesar de las diferencias en el tamaño de los sitios activos, la Km de COX-1 y COX-2 para el ácido araquidónico es similar (Smith, DeWitt et al. 2000).

En 1998 Shitashige et al. mostraron que COX-1 y COX-2 utilizan preferencialmente diferentes fuentes de ácido araquidónico para sintetizar prostaglandinas. Mientras que COX-2 actúa sobre el ácido araquidónico cuando esta presente en concentraciones  $\leq 2.5 \mu\text{M}$ , ya que el ácido araquidónico producido de manera endógena es liberado a bajas concentraciones; COX-1 preferencialmente oxigena al ácido araquidónico cuando se encuentra en concentraciones  $< 10 \mu\text{M}$ .

Por lo tanto la presencia de COX-1 constitutiva puede ser la responsable de la generación de PGE<sub>2</sub> durante las fases tempranas de la inflamación, antes de la regulación positiva de COX-2. Así, las funciones de COX-1 y COX-2

pueden ser diferenciadas, no solo por su distribución celular o su respuesta a estímulos, sino también por sus propiedades cinéticas intrínsecas.

Morita et al. (1995) compararon la localización subcelular de COX-1 y COX-2. Detectando a COX-1 y COX-2 por inmunocitofluorescencia, observaron que ambas enzimas se localizan en el retículo endoplásmico y envoltura nuclear. Mientras que COX-1 se distribuyó de igual manera entre estos dos compartimentos, COX-2 se encontró concentrado dos veces más en la envoltura nuclear comparado con el retículo endoplásmico (Morita, Schindler et al. 1995). Por el contrario, Spencer et al. (1998) empleando microscopía electrónica así como Western blotting para COX-1 y COX-2 en fracciones subcelulares, concluyeron que COX-1 y COX-2 estaban presentes en proporciones similares en el retículo endoplásmico así como en el interior y exterior de la envoltura nuclear. Por lo tanto, las funciones independientes de estas dos enzimas pudieran no ser atribuidas a una diferencia en la localización subcelular de COX-1 y COX-2 (Spencer, Woods et al. 1998).

Aunque el acetaminofeno tiene un amplio uso como analgésico, su mecanismo de acción no es claro. Por una parte el acetaminofeno no inhibe a COX-1 ni a COX-2 en tejidos periféricos, y en 1972 Flower et al. propusieron que el acetaminofeno inhibía una molécula COX desconocida en el cerebro. Chandrasekharan (2002) aisló y clonó una variante de COX-1 canina. Esta molécula, la cual fue designada como COX-3 difiere de la COX-1 en que se incluye un intrón (intron 1) en el RNA mensajero y en la proteína expresada. La presencia del mRNA de COX-3 con un tamaño de aproximadamente 5.2 kb fue confirmado posteriormente en células humanas. COX-3 se encuentra en altas concentraciones en la corteza cerebral y en el corazón (Chandrasekharan, Dai et al. 2002). La regulación de la transcripción de COX-3 parece ser idéntica a la de COX-1. COX-3 es similar a COX-1 y COX-2 en términos de estructura y función enzimática. Sin embargo COX-3 parece tener una actividad enzimática más baja en comparación a COX-1 y COX-2, esto por la adición del intron 1. Interesantemente dosis terapéuticas

de acetaminofeno inhiben la acción de COX-3 *In vitro*. Así, COX-3 representa un candidato blanco para el mecanismo de acción del acetaminofeno en el SNC. Botting et al. (2005) demostraron que el acetaminofeno produce un efecto analgésico y antipirético en ratones por la inhibición de COX-3 en el cerebro y por lo tanto disminuyen los niveles de PGE<sub>2</sub> en el cerebro. Dos variantes de COX-1 fueron aisladas de cerebro canino y denominadas COX-1 parciales PCOX-1a y PCOX1b. PCOX-1a contiene el intron 1, pero carece de los exones 5-8 del mRNA de COX-1. PCOX-1a carece de la actividad ciclooxigenasa de COX-1. Variantes de COX-2 también han sido reportadas, pero no presentan actividad enzimática (Roos and Simmons 2005).

## **PROSTAGLANDINAS Y PARÁSITOS.**

Las prostaglandinas son moduladores potentes de procesos fisiológicos básicos en mamíferos y su papel ha sido estudiado ampliamente. Sin embargo, el descubrimiento de que los parásitos producen prostaglandinas, justo como los hospederos mamíferos, y que además poseen la maquinaria enzimática para la biosíntesis de prostaglandinas ha conducido a cambiar el paradigma en la comprensión del papel de las prostaglandinas durante la infección por parásitos.

Amebas del género *Acanthamoeba* y *Entamoeba histolytica* producen PGA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> (Alam 1986; Belley and Chadee 1995). Se cree que la PGA<sub>2</sub> es un osmoregulador intrínseco en ambos parásitos, mientras que la PGE<sub>2</sub> podría estar mediando la patogenicidad de *E. histolytica*. Este parásito estimula la producción de PGE<sub>2</sub> hepática, la cual induce inflamación y contribuye a la patogénesis del absceso hepático amibiano. Estudios en hámsteres han mostrado que la infección por *E. histolytica* durante el absceso hepático amibiano induce la expresión de COX-2 y por lo tanto, la generación de PGE<sub>2</sub> en células del sistema reticuloendotelial, el cual modula la respuesta inmune del hospedero (Sanchez-Ramirez, Ramirez-Gil et al.

2004). Se sabe que la PGE<sub>2</sub> regula negativamente la producción de IL-1, IL-2, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y *E. histolytica* estimula la generación de PGE<sub>2</sub> por los macrófagos.

El parásito protozoario *Toxoplasma gondii* vive dentro de los macrófagos y contribuye a las complicaciones clínicas de AIDS y pacientes inmunosuprimidos. Los taquizoítos de *T. gondii* producen PGE<sub>2</sub> (Daugochies and Joachim 2000). Se ha reportado que astrocitos infectados con *T. gondii* modulan negativamente la producción de óxido nítrico (NO). Estos efectos fueron dependientes de la producción de PGE<sub>2</sub> por los astrocitos y la secreción autocrina de la IL-10 por la microglia (Rozenfeld, Martinez et al. 2003).

La producción de PG's también ha sido reportada en kinetoplastidos. *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, especies de *Leishmania* y *Crithidia fasciculata* convierten el ácido araquidónico y PGH<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> por una vía que es insensible a los inhibidores de COX, como la indometacina y la aspirina. Se cree que las PG's producidas están involucradas en los síntomas clínicos, tales como fiebre, dolor de cabeza, inmunosupresión, etc. La infección por *T. cruzi* se caracteriza por inmunosupresión en la fase aguda, con una disminución en la respuesta linfoproliferativa a antígenos de *T. cruzi*. Las infecciones con *T. cruzi* se caracterizan también por la síntesis elevada de PGE<sub>2</sub> (Michelin, Silva et al. 2005). El descubrimiento de la producción de PG's en *T. cruzi* podría indicar un papel para las PG's derivadas de *T. cruzi* en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

Los humanos y algunas cepas de ratón infectados con *Leishmania* desarrollan síntomas inmunosupresivos. Se ha mostrado que lisados de promastigotes de *Leishmania* pueden producir PG's. Otros estudios han mostrado que la infección con *Leishmania* conduce al aumento en la producción de PGE<sub>2</sub> inducida por expresión de COX-2, en parte a través de una vía dependiente de la proteína cinasa C que favorece la persistencia y

progresión de *Leishmania* (Matte, Maion et al. 2001; Kabututu, Martin et al. 2003).

Las infecciones de helmintos parásitos a menudo están asociadas con una elevada producción de PG's por parte del hospedero, lo cual modula su respuesta y causa los síntomas de la infección. La producción de PG's podría representar el medio por el cual estos organismos modulan el sistema inmune del hospedero y establecen la infección.

Las etapas adulta y larvaria de *Schistosoma mansoni* excretan  $PGA_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  después de la incubación en un medio con ácido linoléico. *Schistosoma* puede inducir la producción de  $PGE_2$  e IL-10 por keratinocitos de humanos y de ratón (Ramaswamy, Kumar et al. 2000). Se ha indicado un papel para la  $PGE_2$  inducida por el parásito en la regulación negativa de la respuesta inmune del hospedero dependiente de IL-10 (Salafsky and Fusco 1987).

*Ascaris lumbricoides* es el helminto intestinal más prevalente en los humanos, afectando aproximadamente 22% de la población mundial. La infección crónica con gusanos adultos puede conducir a una mal nutrición, especialmente en niños, donde la fase aguda involucra broncopneumonía alérgica, obstrucción intestinal, obstrucción del ducto biliar o pancreático y abscesos hepáticos. Se han detectado PG's en *A. lumbricoides* y *A. suum* y una PGH-E isomerasa, que convierte el  $PGH_2$  en  $PGE_2$  en *A. galli*, las cuales han sido purificadas y caracterizadas (Meyer, Muimo et al. 1996). Sin embargo, no ha sido posible aclarar el papel de las PG's derivadas de *Ascaris* ssp.

*Onchocerca volvulus* es el agente etiológico de la oncocercosis. El espectro de la infección de *O. volvulus* varía de microfilardermia asintomática, a menudo asociada con hiporespuestas inmunológicas, a enfermedades severas de piel y ojos incluyendo oncodermatitis y ceguera. El tiempo largo de sobrevivencia de los parásitos en sus hospederos a pesar de su

proximidad con células inflamatorias, indica que el parásito puede modular el sistema inmune del hospedero. *O. vulvulus* posee una glutatión (GSH) transferasa (Ov-GST1) que produce PGD<sub>2</sub> en la interface del parásito-hospedero (Sommer, Rickert et al. 2003). Es posible que esta enzima esté involucrada en la modulación del sistema inmune por contribuir a la producción de PGD<sub>2</sub>.

Por todo lo anterior, es claro que los parásitos tienen diversos mecanismos de sobrevivencia en sus hospederos mamíferos, que incluyen la producción de prostaglandinas o la estimulación de las células del hospedero para generar PG's o ambos. Además, recientemente se ha mostrado que la PGE<sub>2</sub> es importante en el control de la respuesta inmune al tener impacto sobre la expansión o función de las células reguladoras. Las PG's afectan al huésped de varias maneras, por tal motivo la producción de PG's por los parásitos podría estar involucrada en la patofisiología de las infecciones por parásitos.

## **JUSTIFICACIÓN**

Los parásitos tienen la capacidad para producir un amplio rango de moléculas que mimetizan acciones biológicas las cuales son benéficas para ellos. Algunos parásitos inducen la producción de eicosanoides incluyendo al metabolito del ácido araquidónico, PGE<sub>2</sub>, el cual es un potente regulador de la respuesta inmune. Se ha observado que macrófagos infectados con *Leishmania* generan prostaglandina E<sub>2</sub>, favoreciendo la sobrevivencia del parásito y la progresión de la enfermedad.

La posibilidad de que *Leishmania* posea una enzima tipo ciclooxigenasa abre posibilidades interesantes de estudio. La purificación de una enzima tipo ciclooxigenasa (COX-like) permitirá analizar la secuencia de la proteína, buscar dominios de interacción con otras proteínas, conocer su sitio activo, conocer su actividad enzimática y generar anticuerpos para conocer la localización de esta proteína, entre otras características. Todos estos datos en un futuro podrán servir para diseñar drogas específicas contra la proteína que impidan su acción y de esta manera tratar de eliminar la infección.

## **HIPÓTESIS**

La proteína COX-like de *Leishmania* posee características similares a la COX-2 de humano, como la actividad enzimática y se localiza en la membrana del parásito o cerca a ella.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- Purificar y caracterizar la proteína tipo COX de *Leishmania mexicana*

### **Objetivos Particulares:**

- Realizar un análisis bioinformático de la secuencia de la proteína tipo COX de *Leishmania mexicana*.
- Purificar la proteína tipo COX de *Leishmania mexicana*.
- Analizar la actividad enzimática de la proteína tipo COX de *L. mexicana*.
- Generar anticuerpos monoclonales contra la proteína tipo COX de *L. mexicana* para determinar la localización subcelular en promastigotes y amastigotes.
- Identificar por MALDI-TOF la identidad de la proteína tipo COX de *L. mexicana*.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Análisis de la secuencia de la proteína COX-like de *Leishmania mexicana*.**

La secuencia de aminoácidos de la proteína candidata para actividad COX proveniente de los resultados de MALDI-TOF fue sujeta a un análisis de BLAST-P utilizando el BLAST de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). El análisis del dominio de proteína se realizó usando la herramienta de investigación de la arquitectura modular simple ([smart.embl-heidel-berg.de](http://smart.embl-heidel-berg.de)) disponible vía EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). El alineamiento múltiple de secuencias de proteína se realizó en el programa Clustal W.

### **Parásitos y condiciones de cultivo.**

Se utilizaron promastigotes de la cepa de *L. mexicana* (MHOM/MX/84/ISSET GS), la cual se aisló en México de un paciente con leishmaniosis cutánea difusa y se mantuvieron a 26°C en medio RPMI-1640 (GIBCO BRL, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente descomplementado. Amastigotes recuperados de lesión se cultivaron a 26°C para dar lugar a la forma de promastigotes procíclicos, y a partir de éstos se generaron los promastigotes metacíclicos. El aislamiento de ácidos nucleicos y proteínas, se realizó a partir de cultivos de parásitos en fase log (aprox.  $1-2 \times 10^7$  células/ml), éstos se colectaron por centrifugación a 2100 xg por 15 min a 4°C. El paquete celular resultante se lavó 2 veces en PBS frío (PBS, fosfato de sodio 10 mM, NaCl 145 mM, pH 7.4) con centrifugación y finalmente se resuspendió en un amortiguador apropiado.

### **Obtención de extractos de promastigotes de *L. mexicana*.**

Los promastigotes se cosecharon al final de la fase logarítmica de crecimiento por centrifugación a 1 500 xg por 10 min a 4 °C, posteriormente se lavaron 2X con PBS pH 7.4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 19.9 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM, NaCl 136 mM y KCl 2.6 mM) a 4 °C. Los parásitos se sonicaron con 8 – 10 ciclos de 1 min cada vez, en amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, leupeptina 0.5 µg/mL, NEM 3 mM, aprotinina 0.5 µg/mL y benzamidina 1 mM) y la lisis completa se verificó al microscopio. El extracto total, se centrifugó a 12, 000 xg a 4 °C por 30 min y la pastilla se resuspendió en el amortiguador de lisis descrito previamente.

### **Purificación de la proteína con actividad COX.**

#### **Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Celulosa.**

Después de la lisis de los promastigotes y su posterior fraccionamiento por centrifugación, se separó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en amortiguador de lisis. El sobrenadante fue sometido a un proceso de purificación en una columna de DEAE-celulosa (Whatman® DE-52) previamente equilibrada con amortiguador de fosfato de sodio 20 mM pH 7.4; posteriormente la columna se lavó con el mismo amortiguador de equilibrio y se obtuvo la fracción de 20 mM o material no unido a la columna. Posteriormente, las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con un gradiente (20 -100 mM) de amortiguador de fosfato de sodio a pH 7.4.

#### **Sulfato de amonio.**

La fracción soluble resultante de la lisis de los promastigotes fue sometida a purificación con 10 % sulfato de amonio, dicha fracción fue llevada a un 10% de saturación con sulfato de amonio para posteriormente centrifugarla a 14

000 xg por 1 h, el sobrenadante fue separado del precipitado, donde dicho precipitado (10% de saturación con sulfato de amonio) se resuspendió en un amortiguador con un cocktail de inhibidores de proteasas que incluía: leupeptina 0.5 µg/mL, EDTA 2 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 0.5 µg/mL y NEM 3 mM. Posteriormente el sobrenadante saturado al 10% con sulfato de amonio se llevó a una saturación del 20% adicionando más sulfato de amonio (dependiendo del volumen a saturar, son los gramos de sulfato de amonio que se tienen que adicionar), la solución saturada a 20% se mantuvo en agitación ligera por 30 min, para después centrifugarla a 14 000 xg por 1 h, el sobrenadante se separó del precipitado, donde dicho precipitado (20% de saturación con sulfato de amonio) se resuspendió en el amortiguador con cocktail de inhibidores de proteasas (como se hizo anteriormente). El sobrenadante saturado al 20% con sulfato de amonio se llevó ahora a una saturación del 30% adicionando más sulfato de amonio, la solución se mantuvo en agitación ligera por 30 min, para después centrifugarla a 14 000 xg por 1 h, el sobrenadante se separó del precipitado, donde dicho precipitado (30% de saturación con sulfato de amonio) se resuspendió como se describió anteriormente. Se realizaron los mismos pasos anteriormente descritos para llevar la solución a 40-50% de saturación con sulfato de amonio de tal manera que se obtuviera un perfil protéico de purificación con sulfato de amonio desde 10 hasta un 50% de saturación.

### **Análisis de actividad enzimática**

Los ensayos de actividad COX se realizaron en placas de 96 pozos en un volumen final de 250 µL; formados por 50 µl de amortiguador Tris-HCl 100 mM y fenol 0.3 mM a pH 7.3, 50 µL de una solución de hematina porcina 0.12 µM en amortiguador de fosfato de sodio 100 mM a pH 7.5, 50 µL de la solución de enzima COX-2 de humano en concentraciones de 7.5-30 U/mL en concentración final para la curva estándar de actividad COX-2 (1 µg de

proteína COX-2 = 8 U) o 200 µg/mL de proteína de las fracciones colectadas (la cuantificación de proteína se realizó por el método de BIO-RAD DC) en amortiguador de fosfato de sodio 100 mM a pH 7.5; 50 µL de sustrato quimioluminiscente (Assay designs) a 4 °C y 50 µL de AA 100 µM. La reacción se midió inmediatamente después de agregar el AA en un Fluoroskan Ascent FL Thermo Labsystems a tiempos de integración de 5000 ms y la señal luminiscente se midió en Unidades de Luz Relativa (ULR). En todos los ensayos de actividad COX se preparó un blanco de reacción, el cual consistió en una mezcla de reacción con todos los reactivos excepto la enzima tipo COX-2 purificada o el extracto de promastigotes.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

La separación de las proteínas por electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10% (Garfin 1990; Garfin 2009). Los geles se teñeron con azul de Coomassie, y para desteñir el gel, éste se incubó con ácido acético al 5% en agitación constante, hasta que las proteínas se observaron en color azul sobre un fondo transparente. Réplicas de los geles anteriormente mencionados también se tiñeron con plata dada la alta sensibilidad ya que es capaz de detectar menos de 1 ng de proteína (Weiss, Weiland et al. 2009). La tinción de plata se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante del método de tinción de plata BIORAD.

### **Western blot anti-COX-like de *Leishmania***

Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron electrotransferidas a papel de nitrocelulosa (PNC). El PNC se bloqueó con leche al 5% en TBS-Tween 20 al 0.05% (TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavó 3X con TBS-T (10 min cada vez). Posteriormente, el PNC se incubó con el anticuerpo primario anti-COX, en una dilución 1:250 en TBS-T leche al

5% toda la noche a 4 °C en agitación constante; la membrana se lavó con TBS-T 3X (10 min c/u) y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a peroxidasa en una dilución 1:1000 en TBS-T leche al 5% en agitación constante. El filtro se lavó con TBS-T 3X (10 min c/u) y la(s) proteína(s) detectada(s) por los anticuerpos se revelaron por quimioluminiscencia.

Por otra parte también se realizó una electroforesis en 1 dimensión de las fracciones de extracto total solubilizado y purificado por medio de sulfato de amonio que presentaron actividad COX, de las cuales se realizaron inmunoblots contra la proteína COX-2, la cual ya localizada (la banda de interés), se escindió del gel para identificación de la misma por MALDI TOF.

### **Generación de Anticuerpos Monoclonales.**

El procedimiento para la generación de los anticuerpos monoclonales se realizó en las instalaciones del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), bajo la asesoría de la M. en C. Yolanda Medina Flores, el cual se describe a continuación:

Ratones hembra de la cepa BALB/c se inmunizaron intraperitonealmente con 200 µg de la proteína purificada al 20 % de saturación con sulfato de amonio proveniente de extractos totales de promastigotes de *Leishmania mexicana* en amortiguador de fosfatos (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monobásico 200 mM y Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dibásico 100 mM, pH 7.4), emulsificada con 200 µL de adyuvante de Freund completo en PBS, pH 7.4. Se realizaron 4 inmunizaciones más, 1 cada semana, las primeras 3 con 100 µg de la proteína purificada y adyuvante de Freund completo por vía intraperitoneal y la última con 200 µg de la proteína purificada y adyuvante de Freund incompleto por vía intravenosa (en la cola del ratón). Tres días después, las células del bazo de los ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma de acuerdo con Galfré y Milstein (Galfré and Milstein 1981). Aproximadamente 2.1 X 10<sup>8</sup> esplenocitos

se mezclaron con  $4.2 \times 10^7$  células de mieloma (Ag8) y se centrifugaron (10 min a 300 xg 20 °C). Posteriormente las células se lavaron con el medio de cultivo RPMI 1640 sin suero fetal bovino y se centrifugaron nuevamente a 400 xg en un tubo Falcon de 50 mL. Posteriormente se adicionó 1 mL de PEG (polietilenglicol) de manera lenta de tal modo que se consumiera en 1 min y se mezcló por pipeteo. A continuación las células con polietilenglicol se colocaron en baño maría a 37 °C por 1 min; se adicionaron 5 mL de RPMI sin suero fetal bovino de manera gradual (gota a gota), la suspensión se mezcló, se adicionó RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10% (v/v) hasta un volumen final de 50 mL, se mezcló muy ligeramente y se centrifugó (300 xg por 5 min). Las células sedimentadas se resuspendieron en RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10% y se colocaron en placas en un medio de selección de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Después de 11 días, los sobrenadantes de cultivos primarios se retaron con el antígeno (proteína reconocida por el anticuerpo anti COX-2 de ratón en muestras de *L. mexicana*) con el cual se inmunizaron los ratones. Los hibridomas más eficientes se hicieron crecer para posteriormente purificar los anticuerpos monoclonales.

### **Purificación de gp63**

Promastigotes de *Leishmania mexicana* en fase log se cosecharon por centrifugación (1110 rpm.) del medio de cultivo. Las células se lisaron en un amortiguador de unión a ConA 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.5 M, Triton X-100 5%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MnCl<sub>2</sub> 1 mM) por 30 min; el lisado se centrifugó a 3000 rpm. para preaclara, y posteriormente se adicionaron 500 µL de ConA sefarosa (4 mg/mL en amortiguador de unión a ConA) e inhibidores de proteasa (leupeptina 0.5 µg/mL, EDTA 2 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 0.5 µg/mL y NEM 3 mM). Las muestras se colocaron en agitación suave por 12 h a 4°C para su posterior lavado con amortiguador de

unión a ConA. Las proteínas glicosiladas se eluyeron con un amortiguador de elución (Methyl-D-manopyranoside 1 M en amortiguador de unión a ConA).

### **Ensayos de Inmunoprecipitación.**

Aproximadamente a 1 mL de la fracción purificada al 20% de saturación con SAS se le añadió 0.25 µg de IgG control, junto con 20 µL de la suspensión del conjugado de proteína A-agarosa (25% v/v) y se incubó por 30 min. Se sedimentaron las esferas de agarosa por centrifugación a 3000 rpm durante 30 seg a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga a 4 °C. Al sobrenadante se le añadió 10 µg del anticuerpo primario (anticuerpo D12 o anti-gp63 comercial) conjugado con agarosa y se incubó toda la noche a 4 °C en agitación ligera. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 30 seg y se recuperó el precipitado aspirando y desechando el sobrenadante de manera cuidadosa. El precipitado se lavó 3X con PBS pH 7.4 y a las muestras se le agregó 50 µL de amortiguador de muestra 2X (con betamercaptoetanol al 5%) para posteriormente procesar las muestras en una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%.

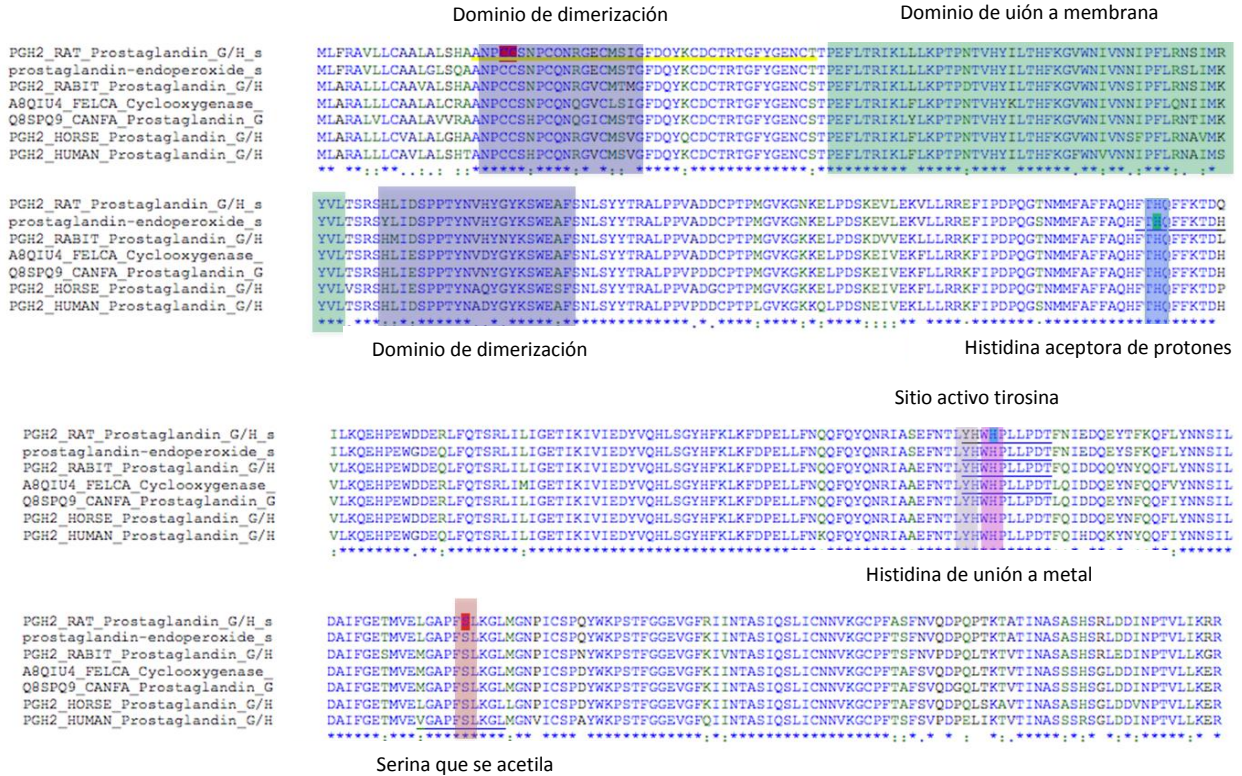
## RESULTADOS.

### **BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS TIPO COX EN *Leishmania*, POR MEDIO DE ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UNA COX CLÁSICA CONTRA LA BASE DE DATOS DE PROTEÍNAS DE *Leishmania*.**

Como se mencionó en la justificación, se cuenta con antecedentes que sugieren que el parásito *Leishmania* posee una proteína con actividad de ciclooxigenasa, por lo tanto el primer abordaje para tratar de identificar a esta proteína fue un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de COX clásicas (ratón, rata, perro, humano y caballo). Se reconocieron los dominios y residuos importantes para la actividad COX, los cuales comprenden dos dominios de dimerización, un dominio de unión a membrana, una histidina aceptora de protones, una histidina de unión a metal y una serina susceptible de acetilación (Fig 6A). Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la COX-2 de ratón (*Mus musculus*) para identificar los dominios y residuos importantes de COX-2 en la base de datos de proteínas de *Leishmania*. Los resultados mostraron muy baja similitud entre la secuencia de aminoácidos de la COX 2 de ratón (COX clásica) al compararla con la base de datos correspondiente a *Leishmania* (Fig. 6B). Ninguna de las proteínas que mostró mayor similitud contenía alguno de los dominios y/o residuos importantes para la actividad COX que caracterizan a las enzimas COX clásicas.



**A**



**B**

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]</a>	34.3	34.3	23%	0.66	23%	<a href="#">XP_003879168.1</a>
<a href="#">tyrosine phosphatase-like protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]</a>	32.0	32.0	6%	3.0	29%	<a href="#">XP_003871852.1</a>
<a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]</a>	32.0	32.0	10%	3.2	31%	<a href="#">XP_003873461.1</a>
<a href="#">tyrosine phosphatase-like protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]</a>	31.2	31.2	6%	4.9	29%	<a href="#">XP_001561763.1</a>
<a href="#">putative cyclosporin 16 [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]</a>	31.2	31.2	7%	5.2	34%	<a href="#">XP_001564018.1</a>
<a href="#">tyrosine phosphatase-like protein [Leishmania panamensis]</a>	31.2	31.2	6%	5.6	29%	<a href="#">AIN95403.1</a>
<a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]</a>	31.2	31.2	7%	6.0	34%	<a href="#">XP_001464903.1</a>
<a href="#">putative cyclosporin 16 [Leishmania major strain Friedlin]</a>	31.2	31.2	7%	6.0	34%	<a href="#">XP_001682494.1</a>
<a href="#">hypothetical protein, conserved [Leishmania donovani]</a>	31.2	31.2	7%	6.3	34%	<a href="#">XP_003860101.1</a>
<a href="#">NADH-dependent fumarate reductase-like protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]</a>	31.2	31.2	14%	6.4	30%	<a href="#">XP_003879080.1</a>
<a href="#">hypothetical protein, conserved [Leishmania donovani]</a>	30.4	30.4	10%	9.7	30%	<a href="#">XP_003859462.1</a>
<a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]</a>	30.4	30.4	10%	10.0	30%	<a href="#">XP_001464273.1</a>

Figura 6. (A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ciclooxigenasas de rata, ratón, conejo, gato, perro, caballo y humano (enzimas COX clásicas), en donde se resaltan los dominios y residuos importantes para la actividad COX. Se muestran los dominios de dimerización, el dominio de unión a membrana, la histidina aceptora de protones, la tirosina del sitio activo, la histidina de unión a metal y la serina que se acetila. (B) BLAST-P utilizando la secuencia de aminoácidos de la COX-2 de ratón contra la base de datos de Leishmania ssp. La enzima COX clásica presentó poca similitud.

## **PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD COX DE *Leishmania mexicana*.**

Extractos totales solubilizados de *L. mexicana* se sometieron a una columna de intercambio iónico para obtener diferentes eluidos por medio de un gradiente de fosfatos. Se dio seguimiento a la proteína con actividad COX de *Leishmania* a través de su actividad enzimática en combinación con la reactividad positiva que presentaba un anticuerpo policlonal comercial dirigido contra la COX-2 de ratón. La figura 7 muestra el análisis electroforético del extracto total con el cual se inició la purificación y los eluidos de la columna de intercambio iónico, mostrando claramente un patrón diferencial en el contenido proteico de las fracciones; una réplica de este gel fue analizada por Western blot con el anticuerpo anti COX-2 de ratón. La figura 8 muestra la identificación de una proteína de 66 kDa en los eluidos 3 al 16, misma que se observa en el extracto total y el sobrenadante el cual fue pasado por la columna. Estos eluidos fueron analizados para medir su actividad enzimática. La figura 8 muestra la actividad COX de las fracciones provenientes de la columna de intercambio iónico; siendo los eluidos 3 al 16 los que presentaron una elevada actividad específica. La actividad enzimática en estos eluidos corresponde con el reconocimiento del anticuerpo policlonal anti-COX-2 de ratón en los ensayos de Western blot (Fig. 7).

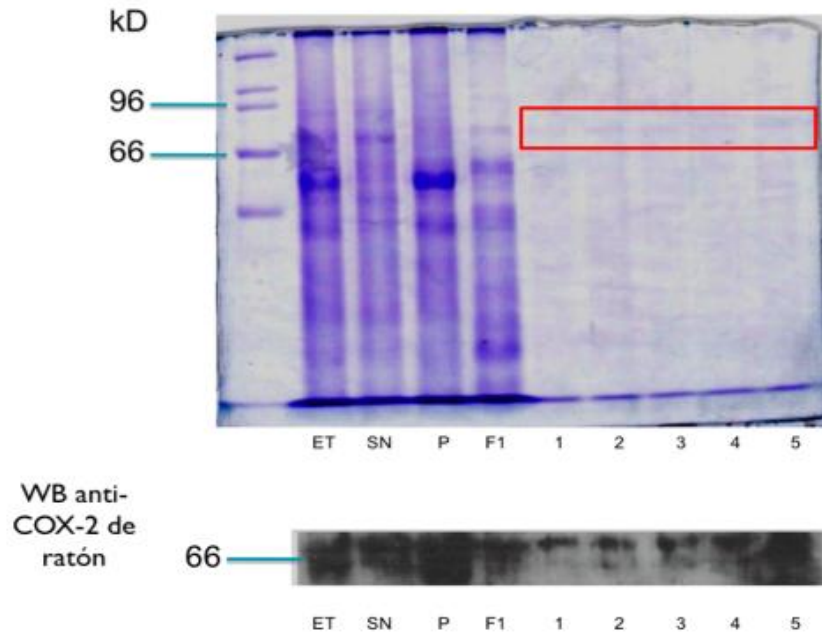


Figura 7. SDS-PAGE de muestras de *Leishmania mexicana*, fraccionadas y purificadas por medio de DEAE Celulosa, y un Western blot sobre una réplica del mismo, donde se observa el reconocimiento de una banda de aproximadamente 66 kDa por medio del anticuerpo policlonal anti-COX-2 de ratón.

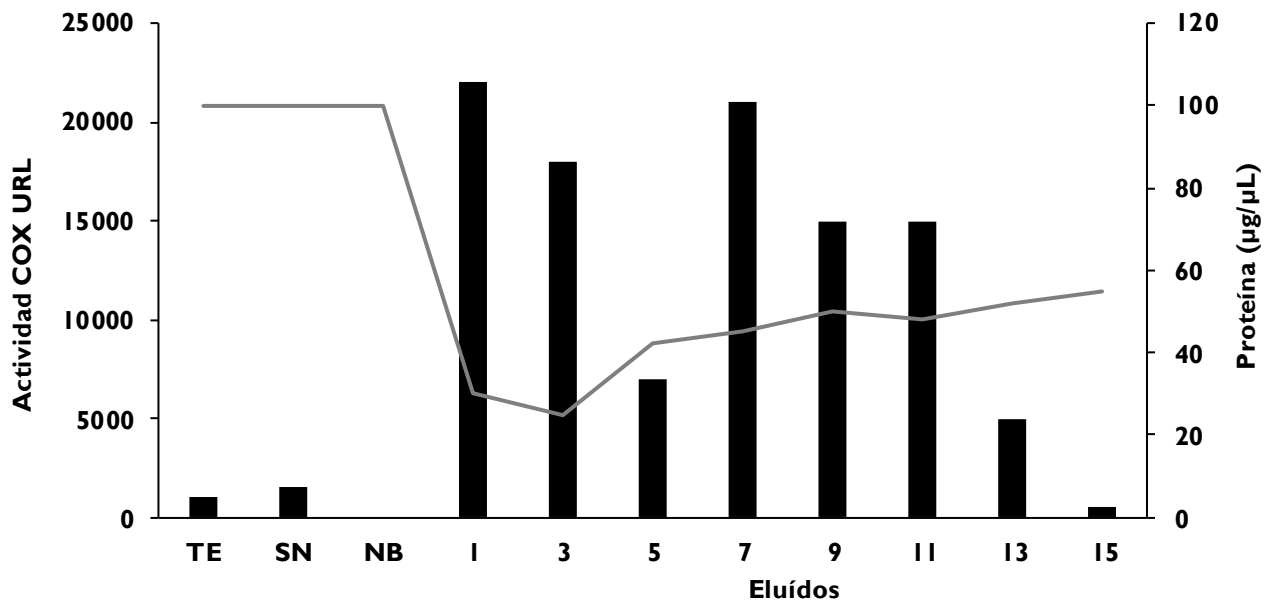


Figura 8. Ensayo de actividad enzimática tipo COX sobre muestras de *L. mexicana* purificadas por DEAE-Celulosa. Los eluidos 1-13 presentan actividad tipo COX y corresponden con las muestras reconocidas por el anticuerpo policlonal anti-COX-2 de ratón.

Como puede observarse en las figuras 7 y 8 se obtuvo la proteína con actividad COX en los eluidos 1-13. Sin embargo, durante el proceso de enriquecimiento de la muestra con la proteína con actividad COX a partir de los eluidos obtenidos resultó en pérdida tanto de proteína como de actividad enzimática (datos no mostrados), por lo que se descartó este procedimiento.

Se decidió por lo tanto, recuperar la proteína de aproximadamente 66 KDa que fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-COX-2 de ratón, a partir de un gel de poliacrilamida SDS y donde se presentó actividad enzimática tipo COX, y someterla a digestión *in situ* para realizar un análisis por espectrometría de masas (LC/MS/MS) y de esta manera poder identificar la proteína responsable de la actividad enzimática. El análisis mostró que 15 péptidos de la proteína digerida correspondían a la enzima glicosomal fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, y solo 2 correspondían a la proteasa de superficie (Fig. 9).

<b>Leishmania Protein Identified</b>	<b>Mascot #</b>	<b>Peptide sequences Identified</b>	<b>NCBI or SwissProt Accession #</b>
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	922	15	gi 73544483 [Leishmania major strain Friedlin]
	839	14	091015 [Leishmania infantum JPCM5]
	544	9	gi 154339978 [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]
Surface protease [Leishmania donovani]	94	2	gi 159327

Figura 9. Resultados de la espectrometría de masas de la banda de aproximadamente 66 kDa que fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-COX-2 de ratón. Se encontraron 15 péptidos con similitud a la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa de *Leishmania major* y 2 péptidos con similitud a la proteasa de superficie de *Leishmania braziliensis*.

Debido a que el proceso de purificación de la proteína de interés por medio de intercambio catiónico no resultó eficiente para obtener proteína en cantidad suficiente para llevar a cabo el protocolo de inmunización para la generación de anticuerpos monoclonales se optó por el método de precipitación de proteínas con sulfato de amonio para lograr su enriquecimiento.

Una vez que se preparó el extracto total de promastigotes de *Leishmania* y éste se sometió al proceso de precipitación con sulfato de amonio como se describe en “Material y Métodos”, las fracciones obtenidas se corrieron en geles de poliacrilamida y éstos se tiñeron con plata. En un gel representativo se observa una proteína purificada altamente enriquecida con un peso aproximado a 63 kDa en las fracciones de 10, 20 y 30% de SAS. El análisis por Western blot de una réplica de dicho gel utilizando el anticuerpo policlonal anti COX-2 de ratón mostró el reconocimiento de una banda de aproximadamente 63 kDa en las fracciones de 10, 20 y 30% de SAS (Figura 10).

Las fracciones al 10, 20 y 30% de SAS en las que hubo reconocimiento de una banda de aproximadamente 63 kDa fueron sometidas a ensayos de actividad tipo COX. Los resultados mostraron que las muestras purificadas a 10, 20, 30 y 40% de SAS sí presentaban actividad tipo COX. La proteína purificada al 20% de SAS (30 µg) presentaba una actividad de 21 000 unidades de luz relativa (URL), la proteína purificada al 30% de SAS (25 µg) presentaba una actividad de 18 000 URL y la proteína purificada al 40% de SAS (40 µg) presentaba una actividad de 22 000 URL. Con éste método de enriquecimiento se obtuvo una cantidad suficiente de proteína para utilizarla como antígeno en el proceso de producción de los anticuerpos monoclonales.

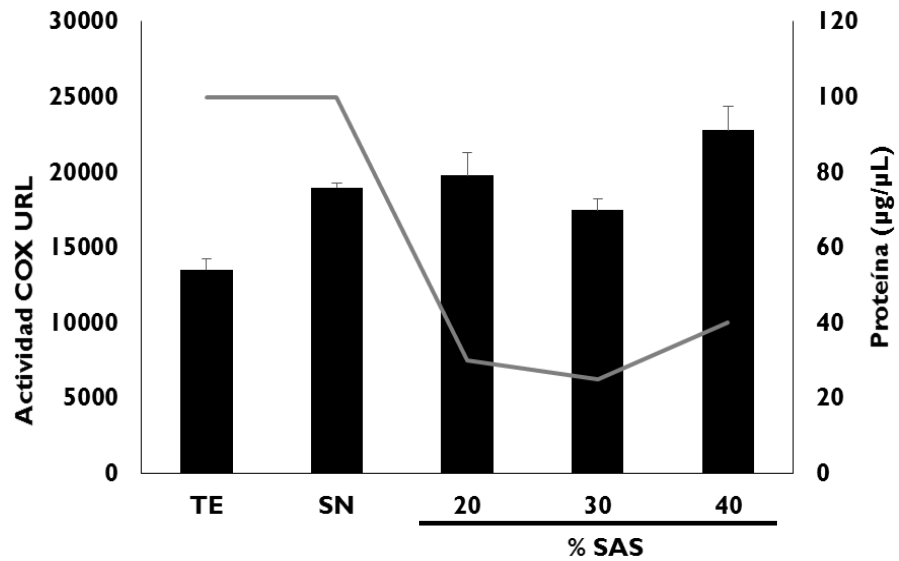
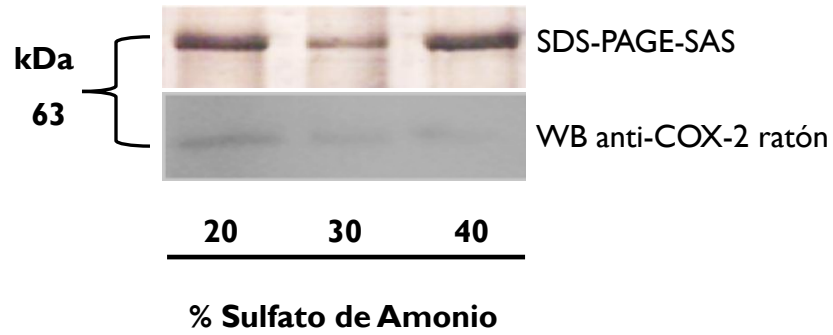


Figura 10. Purificación de proteínas a partir de un extracto de *Leishmania mexicana* por medio de sulfato de amonio. Las muestras precipitadas al 20, 30 y 40% de saturación mostraron actividad tipo COX y además una banda de aproximadamente 63 kDa fue reconocida por el anticuerpo policlonal

### PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA (NATIVA) TIPO COX DE *Leishmania mexicana*.

Los anticuerpos monoclonales fueron producidos al fusionar células de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados con la proteína reconocida por el anticuerpo anti-COX-2 de ratón y que además presentaba actividad enzimática (fracción al 20% de saturación con SAS). Los hibridomas se mantuvieron en crecimiento por 11 días y los sobrenadantes

de los cultivos se probaron con el antígeno con el cual se inmunizó. Se realizaron tres subclonaciones para asegurar que las clonas elegidas provenían de una sola clona que reconocía el antígeno de interés.

Se eligieron las 6 clonas que presentaron mayor absorbancia en ensayos de ELISA contra el antígeno específico.

Las clonas elegidas fueron B7, C5, C1, D12, F8 y G10 (Fig. 10).

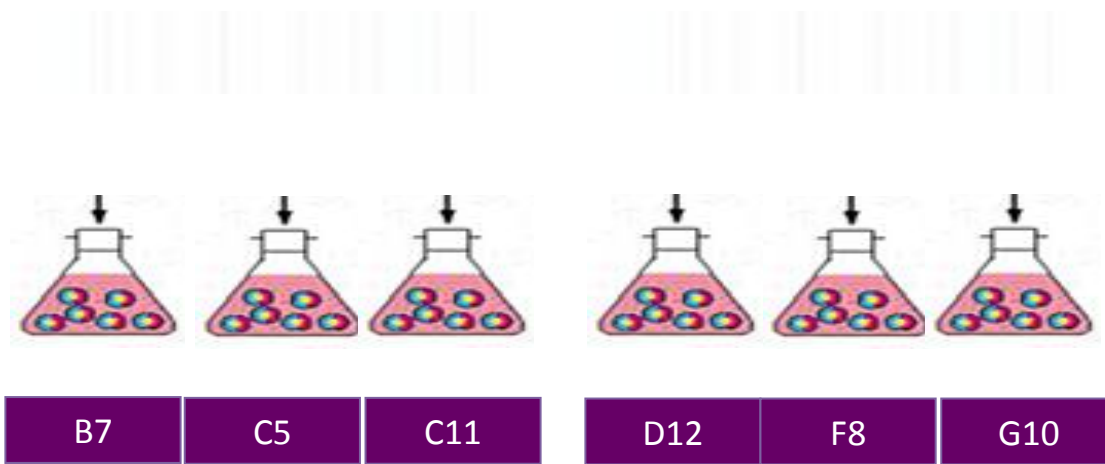


Figura 11. Clonas que mostraron el mejor título de anticuerpos (>3) sobre el reconocimiento del antígeno (proteína purificada con actividad tipo COX) por medio de ELISA.

El sobrenadante del cultivo de las clonas de los hibridomas seleccionados se utilizó en ensayos de inmunofluorescencia para determinar si éstos mostraban un reconocimiento sobre *Leishmania mexicana*. Los resultados mostraron que los anticuerpos de las clonas elegidas reconocieron una proteína en promastigotes de *Leishmania mexicana* tanto a nivel superficial, como intracelular (Fig 12 A, B).

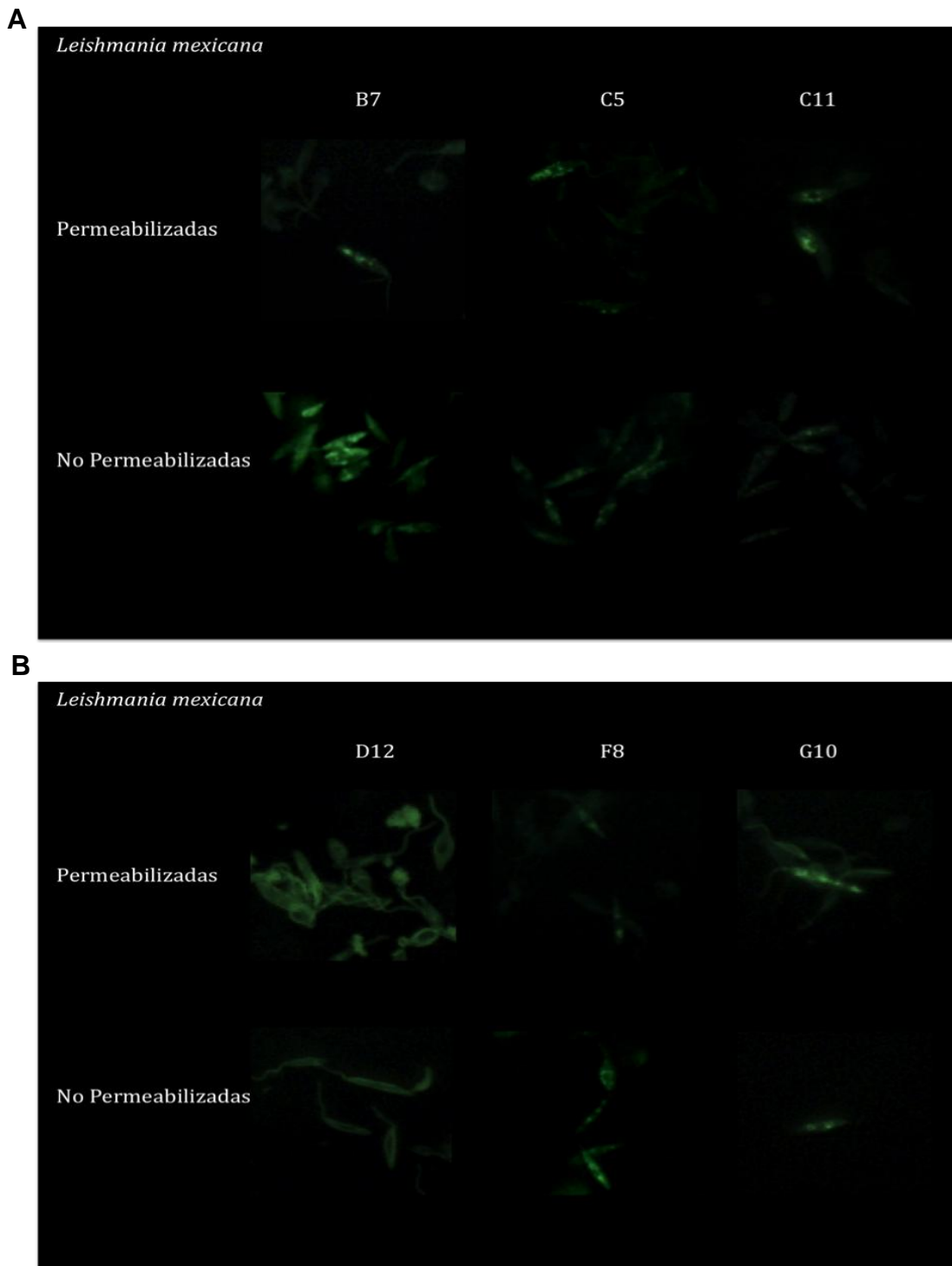
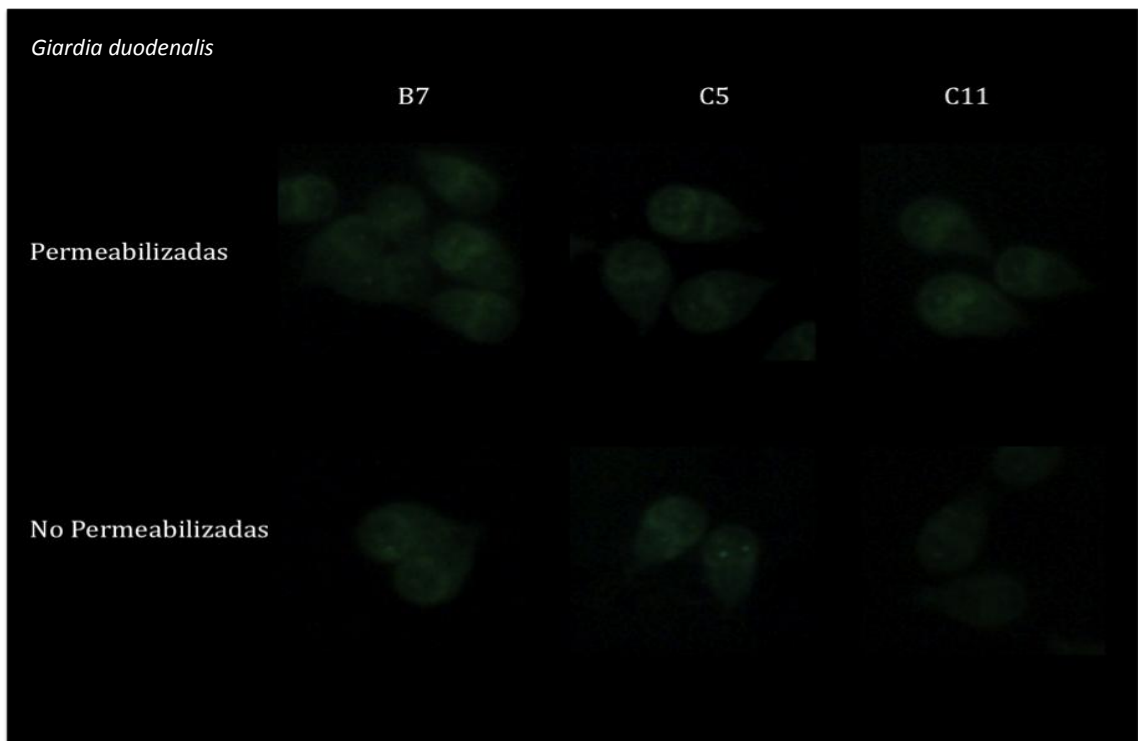


Figura 12 Análisis por microscopía de fluorescencia de parásitos de *L. mexicana* utilizando las clonas B7, C5, C11 (A) D12, F8 y G10 (B). Las laminillas se observaron en un microscopio de Epifluorescencia a 40X (Nikon E600)



Resultó de nuestro interés analizar la posibilidad de que proteínas similares a COX, que pudieran ser reconocidas por los anticuerpos monoclonales, estuvieran presentes en otros parásitos de interés clínico. Las clonas de los seis anticuerpos monoclonales generados se probaron entonces contra *Giardia duodenalis* y *Trypanosoma cruzi*. Los resultados mostraron que todas la clonas reconocieron a estos parásitos tanto en condiciones de no permeabilización como permeabilizados, sugiriendo que la molécula reconocida por estos anticuerpos se encuentra tanto en la membrana como en el citoplasma de los parásitos (Fig. 13 y 14).

A



**B**

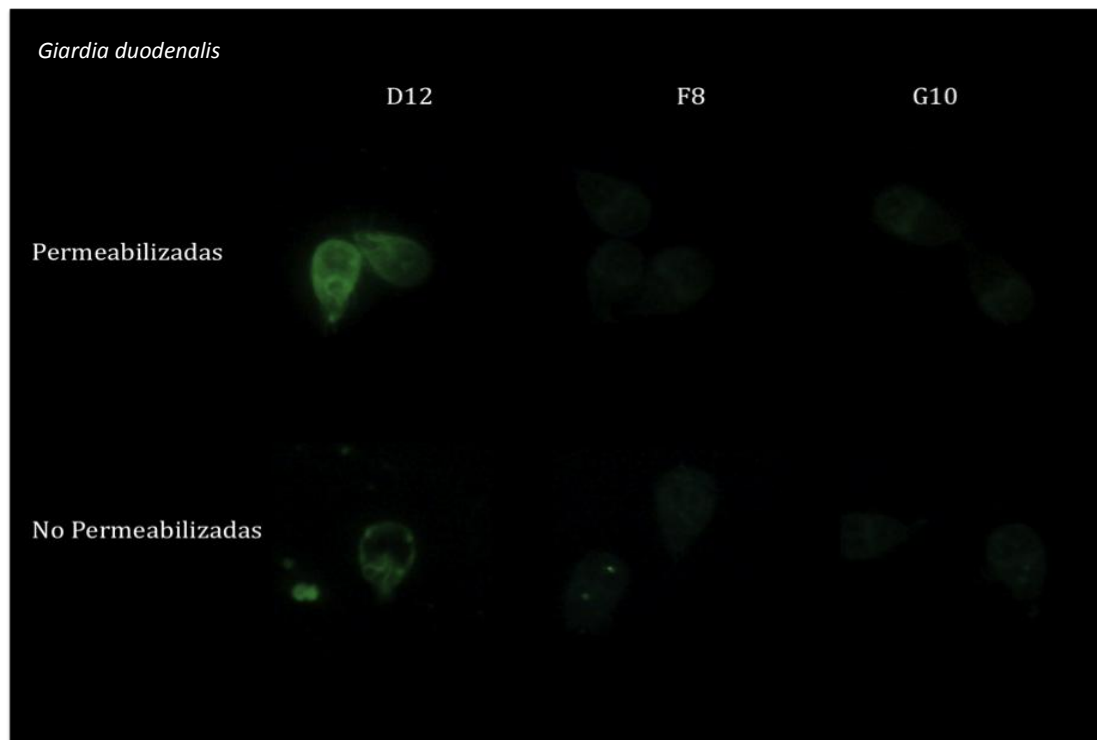
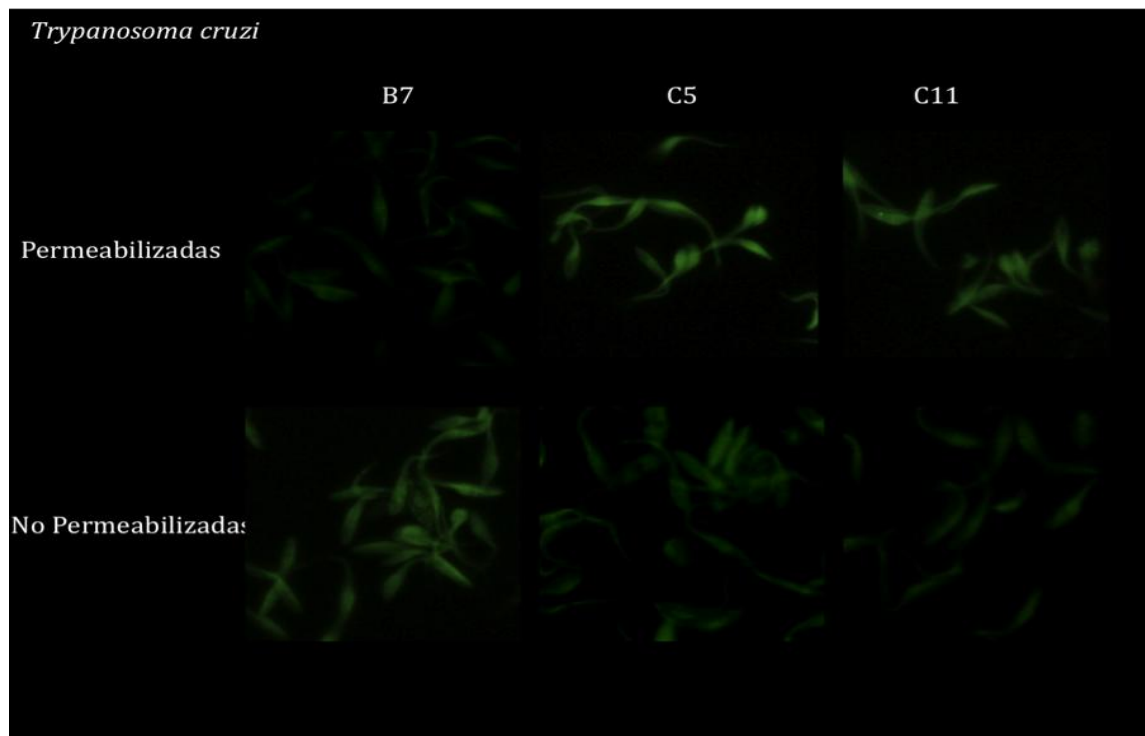


Figura 13. Análisis por microscopía de fluorescencia de parásitos de *G. duodenalis* utilizando las clonas B7, C5 y C11 (A) D12, F8 y G10 (B). Las laminillas se observaron en un microscopio de Epifluorescencia a 40X (Nikon E600)

**A**



**B**

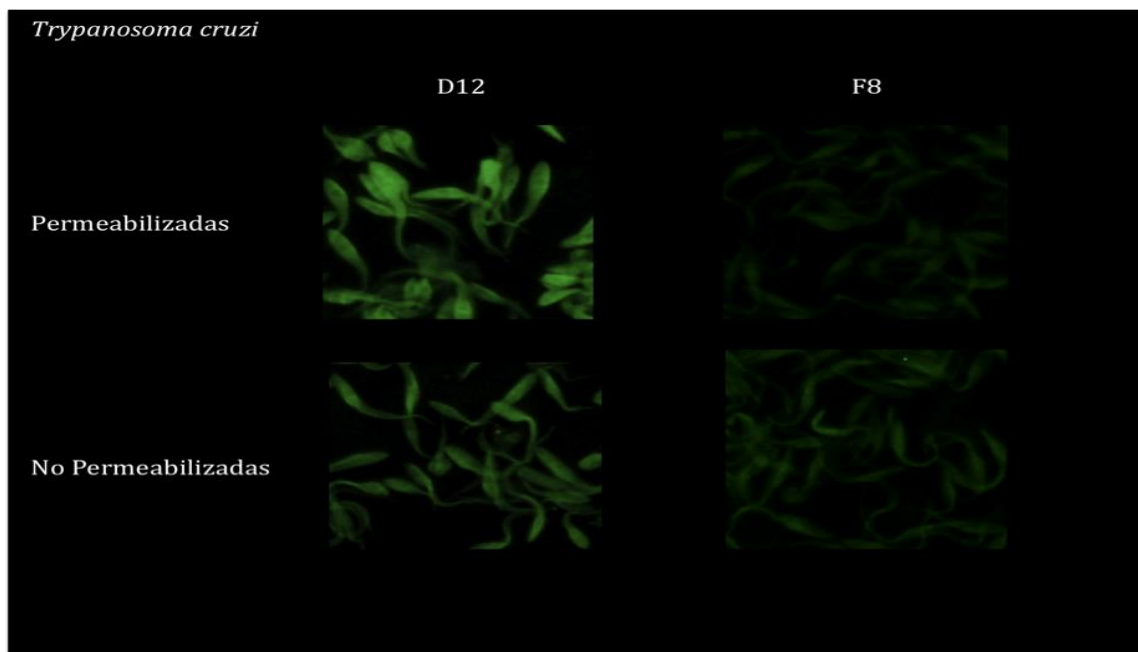
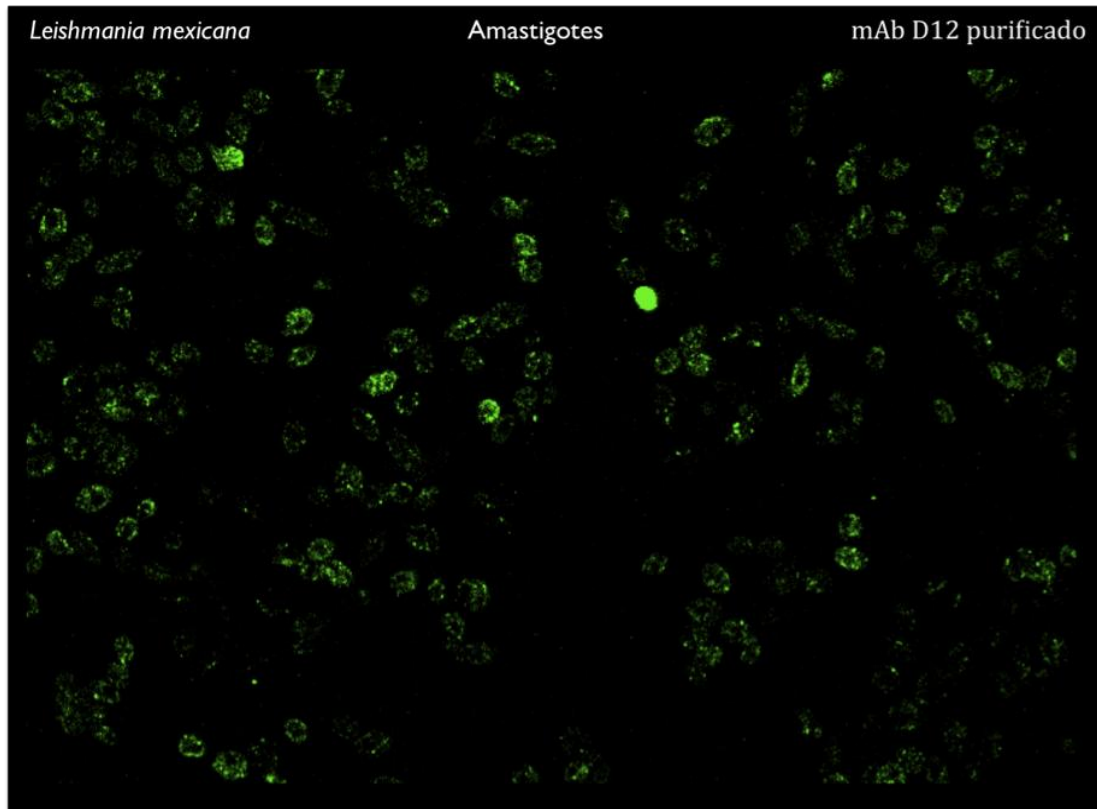


Figura 14. Análisis por microscopía de fluorescencia de parásitos de *T. cruzi* utilizando las clonas B7, C5 y C11 (A) D12 y F8 (B). Las laminillas se observaron en un microscopio de Epifluorescencia a 40X (Nikon E600 B7).

El anticuerpo que mostró el mayor reconocimiento por inmunofluorescencia fue el anticuerpo proveniente de la clona D12. Este anticuerpo fue utilizado para realizar ensayos a nivel de microscopía confocal para determinar con mayor precisión la localización subcelular de la proteína en amastigotes y promastigotes de *Leishmania mexicana*. Los resultados mostraron que la proteína que es reconocida por el anticuerpo del hibridoma D12 se encuentra tanto en la superficie como en el interior del parásito (Figuras 15A y 15B).

A



**B**

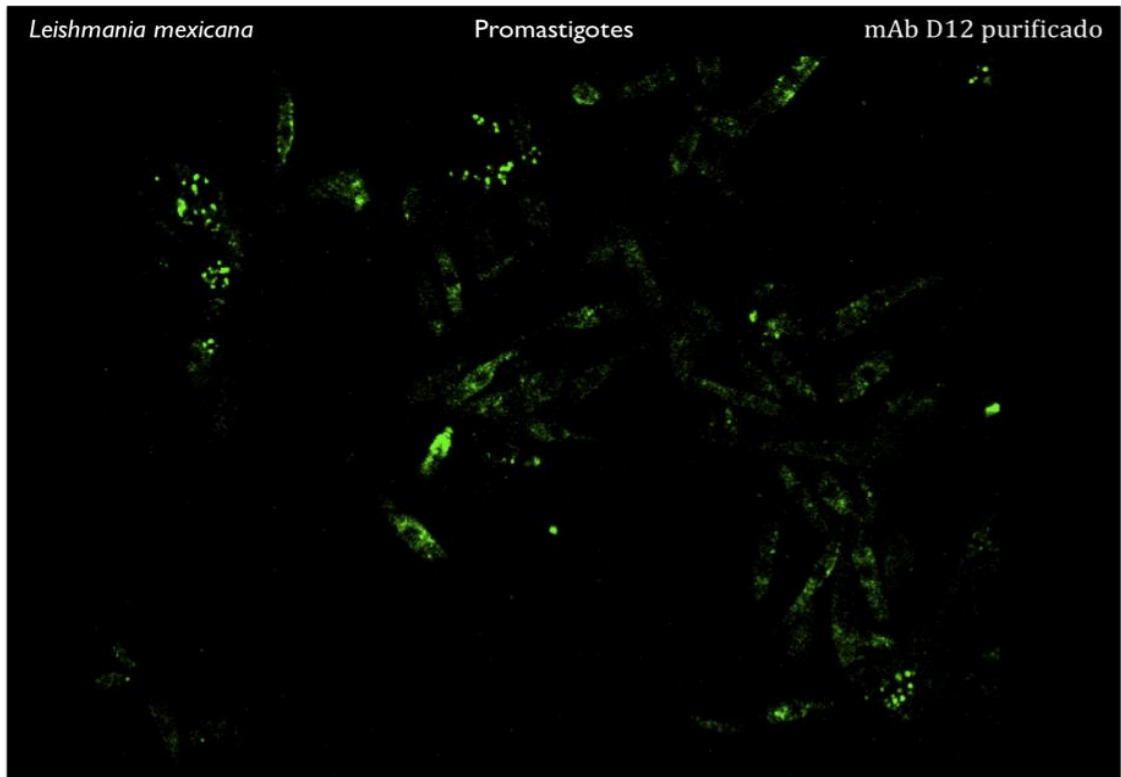


Figura 15. Análisis por microscopía de fluorescencia de amastigotes (A) y promastigotes (B) de *Leishmania mexicana* utilizando la clona D12. Las laminillas se observaron en un microscopio confocal a 60 X

Con el fin de confirmar la identidad de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal D12, se desarrollaron ensayos de inmunoprecipitación para posteriormente realizar un análisis de secuenciación por MALDI-TOF.

Se utilizó como muestra la fracción donde se encontraba la proteína purificada al 20% de saturación con SAS (antígeno con el cual se inmunizaron los ratones). El precipitado obtenido como se describe en “Material y Métodos” se sometió a electroforesis, y el gel se tiñó con Azul de Comassie. En dicho gel se pudo observar la presencia de 2 bandas, la primera correspondía a un peso molecular aproximado de 60 KDa, la segunda a un peso molecular aproximado de 50 KDa, que posiblemente son las cadenas pesadas del anticuerpo con el cual se realizó la inmunoprecipitación (Fig. 16).

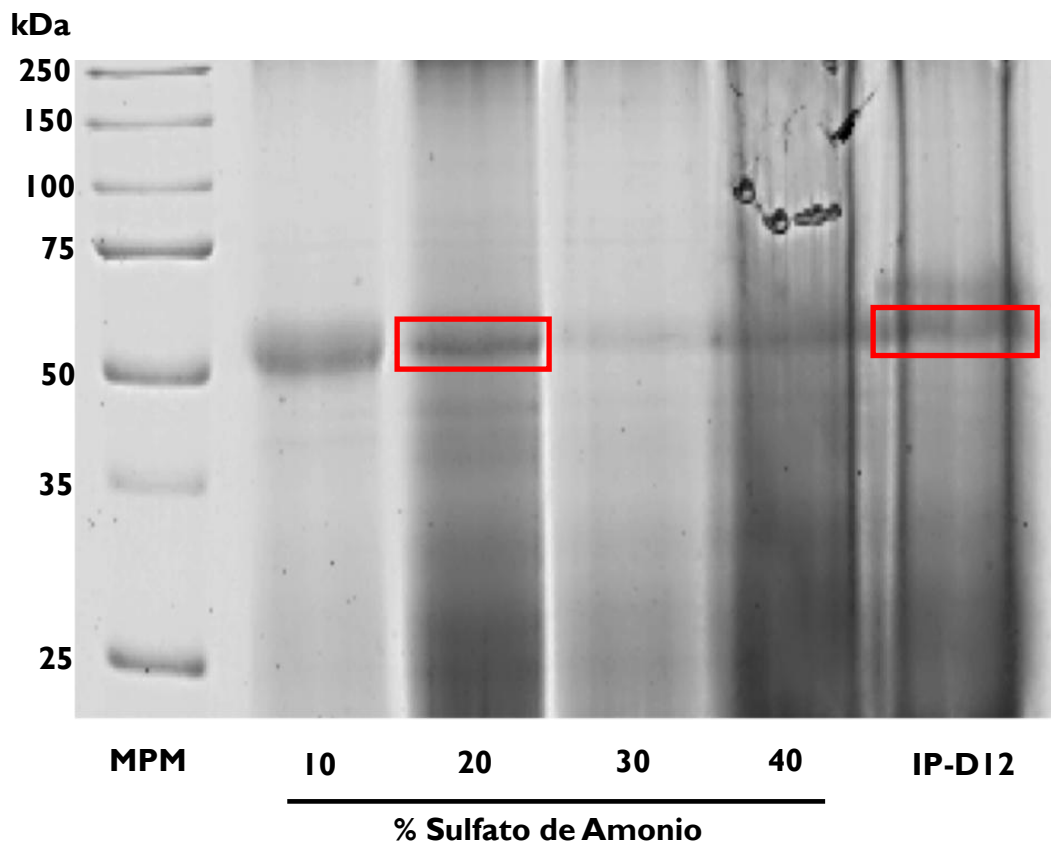


Figura 16. SDS-PAGE de extracto total de *Leishmania mexicana* precipitadas con sulfato de amonio al 10, 20 , 30, 40 % de saturación y el inmunoprecipitado del anticuerpo D12.

Se sabe que el tratamiento de los anticuerpos con agentes reductores como el betamercaptoetanol genera la separación de las cadenas pesadas (50-55 kDa) y ligeras (25 kDa) de los anticuerpos, por lo tanto el resultado anterior confirmaba la inmunoprecipitación de una proteína de aproximadamente 63 kDa. Dicha proteína fue analizada por espectrometría de masas y los resultados mostraron que los péptidos generados a partir de ésta proteína correspondían por homología en secuencia con la leishmaniolisina de *Leishmania amazonensis* (Fig. 17).

## **{MATRIX} Mascot Search Results**

**User** : magda  
**Email** : magda@ccg.unam.mx  
**Search title** : 3b  
**Database** : SwissProt 2012\_08 (537505 sequences; 190795142 residues)  
**Taxonomy** : Other Eukaryota (3389 sequences)  
**Timestamp** : 11 Sep 2012 at 19:22:29 GMT  
**Top Score** : 53 for **GP63\_LEIAM**, Leishmanolysin OS=Leishmania amazonensis GN=gp63 PE=3 SV=1

### **Mascot Score Histogram**

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 48 are significant ( $p < 0.05$ ).

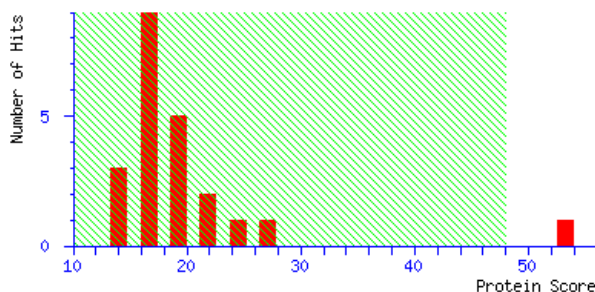
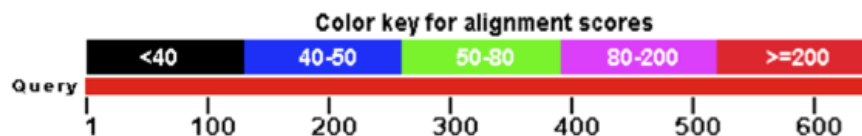


Figura 17. Histograma Mascot de la banda de aproximadamente 63 kDa inmunoprecipitada con el anticuerpo D12. Se encontró que el perfil de péptidos corresponde a la leishmaniolisina gp63 de *Leishmania amazonensis*.

Por medio de espectrometría de masas se pudo detectar que la proteína reconocida por el anticuerpo D12 era la proteína gp63 de *Leishmania*, sin embargo no se explicaba el por qué la proteína tenía un reconocimiento sobre otros parásitos de importancia médica, por lo cual se realizó un alineamiento de la proteína gp63 de *Leishmania amazonensis* contra la base de datos de proteínas de parásitos de importancia médica, esto por medio del programa bioinformático blast-p disponible en:

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BLAST\\_SEARCH&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BLAST_SEARCH&LINK_LOC=blasthome)

El programa muestra una visión general de las secuencias de bases de datos alineadas a la secuencia de consulta. La puntuación de cada alineación se indica mediante uno de los cinco colores diferentes, que divide el rango de puntuaciones en cinco grupos:



Los resultados mostraron poca homología de la proteína gp63 de *Leishmania amazonensis* con la base de datos de *Giardia duodenalis*, ya que los alineamientos encontrados caen en el primer grupo de alineación que corresponde a <40. El mismo análisis se realizó para comparar la proteína gp63 de *Leishmania amazonensis* contra las bases de datos de *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica* y *Mus musculus*, encontrando que



*Trypanosoma cruzi* cae en el quinto grupo de alineamiento, lo cual indica una gran homología con la proteína en cuestión. Para *Entamoeba histolytica* y *Mus musculus* el alineamiento con la proteína gp63 de *Leishmania amazonensis* cae en el cuarto grupo, lo cual indica que en la base de datos de *Entamoeba histolytica* y *Mus musculus* existen proteínas con una homología mayor al 50 % a gp63 de *Leishmania amazonensis* (Figura 18).

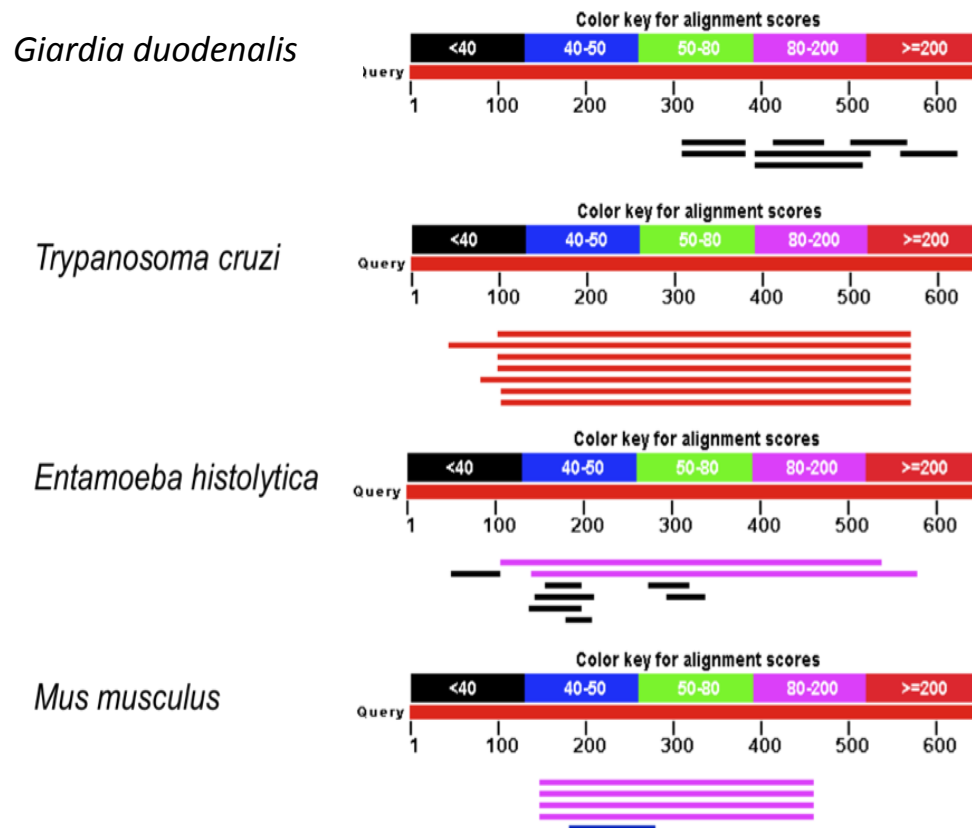


Figura 18. BLAST-P de la proteína gp63 de *Leishmania amazonensis* con diferentes bases de proteínas en organismos de interés.

Hasta este punto sabíamos que el anticuerpo proveniente de la clona D12 reconocía a la proteína gp63, pero no sabíamos si la proteína gp63 era la responsable de la actividad tipo COX, por lo cual se procedió a realizar la purificación de las glicoproteínas de *Leishmania mexicana* y evaluar la actividad tipo COX a través de su unión con la lectina Concanavalina A.

Los eluidos fueron analizados para determinar si presentaban actividad tipo COX. También se incluyó en este análisis una muestra de extracto total de parásitos de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados mostraron que las muestras eluidas (3-15) presentaban actividad enzimática tipo COX (Fig. 19), y no solo las muestras provenientes de promastigotes de *L. mexicana*, sino también el extracto de parásitos de *T. cruzi*, lo cual también es un hallazgo importante que puede relacionar factores de virulencia de parásitos provenientes de una misma familia (*Trypanosomatidae*). Por lo tanto se puede proponer que alguna de las proteínas glicosiladas (posiblemente gp63) sea la responsable de la actividad COX en *L. mexicana*.

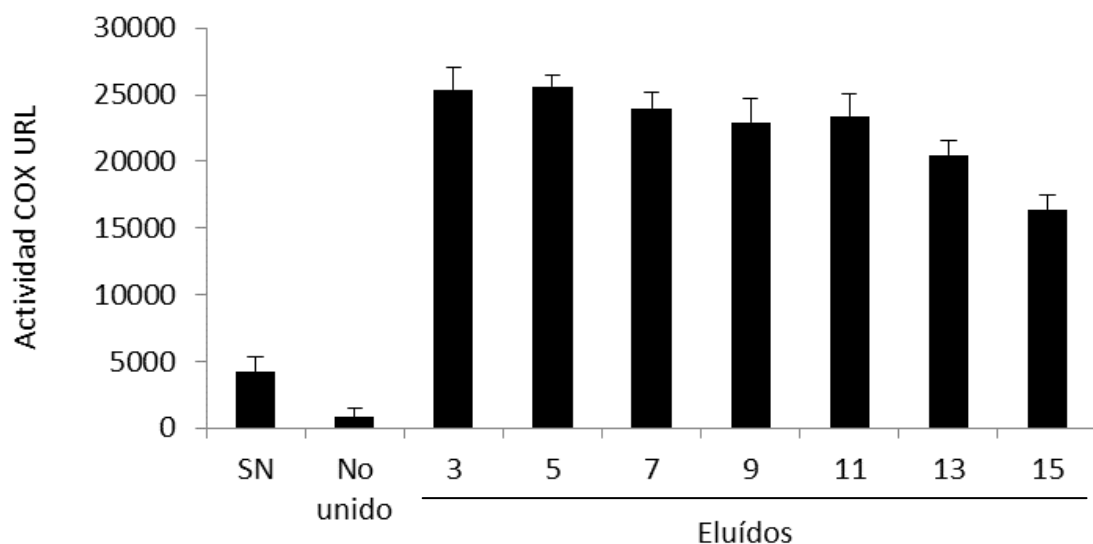


Figura 19. Actividad COX sobre glicoproteínas de superficie de *Leishmania mexicana*.

Para determinar si gp63 era la responsable de la actividad enzimática en los parásitos de *Leishmania mexicana* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando los anticuerpos: 1) D12 y 2) anti-gp63 comercial. Eluidos con actividad tipo COX provenientes de la purificación de glicoproteínas a partir de un lisado de promastigotes de *L. mexicana* fueron sometidos a inmunoprecipitación como se describió anteriormente. Las muestras inmunoprecipitadas se analizaron para su actividad tipo COX. Los resultados mostraron que las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo D12, y con el anticuerpo anti-gp63 comercial presentaron actividad enzimática tipo COX, con lo cual se confirma que la proteína gp63 de *L. mexicana* es la responsable de la actividad tipo COX (Fig. 20).

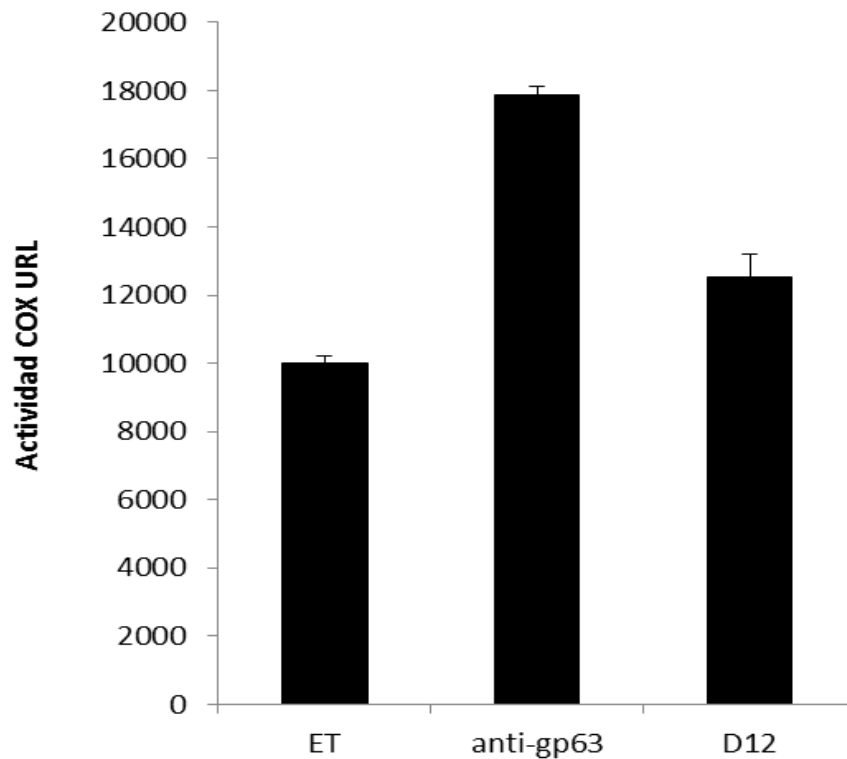


Figura 20. Actividad COX sobre el inmunoprecipitado de gp63 de *Leishmania mexicana*.

## DISCUSIÓN

Para la Organización Mundial de la Salud la leishmaniasis representa una de las enfermedades emergentes para la cual no hay un tratamiento específico, por lo tanto resulta de gran importancia el estudio del parásito para determinar cuáles son los mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero. Recientemente se ha encontrado que las prostaglandinas juegan un papel muy importante en la modulación del sistema inmune del hospedero, mismo que algunos parásitos regulan para poder establecerse en su hospedero (Daugochies and Joachim 2000; Ramaswamy, Kumar et al. 2000). Las prostaglandinas son potentes moduladores de procesos fisiológicos básicos en mamíferos y sus funciones han sido estudiadas ampliamente (Hayaishi 2002; Rowley, Vogan et al. 2005; Miller 2006; Weems, Weems et al. 2006). Sin embargo, el descubrimiento de que los parásitos producen prostaglandinas como lo hacen sus hospederos mamíferos, además de poseer la maquinaria enzimática para la biosíntesis de prostaglandinas (Kilunga Kubata, Eguchi et al. 1998; Daugochies and Joachim 2000; Kubata, Duszenko et al. 2000; Kubata, Kabututu et al. 2002; Noverr, Erb-Downward et al. 2003) ha conducido a un cambio en la comprensión de las funciones de las prostaglandinas durante infecciones por parásitos. Se han realizado estudios para buscar las enzimas involucradas en la generación de prostaglandinas en parásitos, por ejemplo, en el parásito *Onchocerca volvulus* se ha descrito una sintasa de prostaglandina D, la cual tiene un 47% de homología con la sintasa de prostaglandina D humana (Sommer, Rickert et al. 2003); en *Trypanosoma brucei* se ha descrito una sintasa de prostaglandina que es completamente diferente de las sintasas de PGF de mamíferos (39-40% de identidad de aminoácidos), sin embargo estudios han revelado que la estructura tridimensional entre las sintasas de prostaglandina de *T. brucei* y las sintasas de prostaglandina de mamíferos son similares (Kilunga, Inoue et al. 2005). También se realizó una búsqueda del gen la sintasa de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  de *T. brucei* en la base de datos de *Leishmania* donde se logró identificar una sola copia del gen P100/11E, que

se sobrerregula en promastigotes y que es de función desconocida (Samaras and Spithill 1989) . El ADN de cadena sencilla de *L. major*, *L. donovani* y *L. tropica* para el gen P100/11E se secuenció, clonó y sobreexpresó en bacterias (Kabututu, Martin et al. 2003), que produjeron una proteína recombinante citosólica de 34 kDa que cataliza la reducción de PGH<sub>2</sub> a PGF<sub>2α</sub>. La sintasa de PGF de *L. major* fue 61%, 99.3% y 99.3% idéntica a la de *T. brucei*, *L. donovani* y *L. tropica* respectivamente, sin embargo la búsqueda del gen y proteína de esta sintasa de prostaglandina por RT-PCR y western blotting no dio resultados positivos en especies de *Leishmania* del nuevo mundo (Kabututu, Martin et al. 2003).

En este trabajo nos enfocamos a la identificación de la proteína responsable de la actividad tipo COX en *Leishmania mexicana*, ya que estudios previos reportan la presencia de diferentes prostaglandinas en la especie *Leishmania* (Kubata, Duszenko et al. 2007). La búsqueda de secuencias consenso de proteínas COX clásicas de organismos superiores en la base de datos de proteínas de *Leishmania* no mostró proteínas que presentaran homología con las COX clásicas, mismo resultado obtenido en la identificación de una proteína con actividad COX en *Entamoeba histolytica* ya que la proteína identificada como responsable de la actividad COX fue una alfa-actinina que no presentó los dominios y residuos importantes para la actividad COX de las COX clásicas (Dey, Keller et al. 2003). Utilizando un anticuerpo policlonal anti COX-2 de ratón se logró determinar la presencia de una banda de aproximadamente 63 kDa en muestras de extractos totales de *L. mexicana* sometidas a saturación con sulfato de amonio (20-40% de SAS), donde dichas muestras presentaron actividad enzimática, diferente esquema al planteado por Dey y col. para la identificación de la proteína con actividad COX en *E. histolytica*, donde solo se utilizó como herramienta de seguimiento a un anticuerpo policlonal dirigido a la enzima COX-1 de oveja, donde dicho anticuerpo reconoció dos bandas, una con un peso aproximado de 66 y otra con un peso aproximado de 72 kDa en proteínas nucleares de *Entamoeba histolytica* (Dey, Keller et al. 2003).

En este trabajo se generaron anticuerpos monoclonales contra las proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-COX-2 de ratón como una manera de hacer más específico el ensayo y para disponer de una herramienta adecuada para la detección de la proteína en diversos ensayos. Los anticuerpos generados reconocieron una proteína tanto en la superficie como en el interior de los promastigotes y los amastigotes de *Leishmania mexicana*, lo cual sugiere que dicha proteína podría tener una función tanto en la invasión como en el establecimiento en el hospedero. Los resultados mostraron que la proteína reconocida por el anticuerpo D12 es la proteasa de superficie gp63, una metaloproteasa altamente activa que es capaz de mediar la unión del parásito a los macrófagos y que tiene efectos sobre componentes del complemento durante la etapa de promastigotes; dicha proteína protege contra el ataque de las hidrolasas lisosomales y participa en el rompimiento de macromoléculas para obtener nutrientes en la etapa de amastigote (Medina-Acosta, Karess et al. 1989). Los anticuerpos generados también reconocieron proteínas en otros microorganismos de importancia médica como *T. cruzi* y *E. histolytica*, así como también en macrófagos de ratón (*Mus musculus*). Al realizar un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína gp63 con la base de datos de estos organismos se encontró una homología superior al 50%, por lo cual era probable encontrar el reconocimiento de una proteína similar con el anticuerpo utilizado, no así para el parásito *Giardia duodenalis*, en el cual se encontró poca homología, sin embargo el reconocimiento de una proteína en este parásito podría deberse al reconocimiento de una estructura conformacional y no a una estructura lineal, como se plantea para las sintasas de prostaglandina en *T. brucei* (Kilunga, Inoue et al. 2005). Extractos totales de *Leishmania mexicana* se sometieron a una purificación con Concanavalina A, los eluidos se utilizaron para realizar una inmunoprecipitación con el anticuerpo D12, donde la muestra inmunoprecipitada y las muestras al 10-40% de saturación con sulfato de amonio se sometieron a un corrimiento electroforético, y las bandas de un peso aproximado de 63 kDa de las

muestras al 20% de saturación e inmunoprecipitado se analizaron por MALDI-TOF, lo cual resultó en la identificación de péptidos que correspondían a la proteína gp63 de *Leishmania amazonensis*. De esta manera, se encontró a la proteasa de superficie de *Leishmania* como candidata a ser la proteína con actividad tipo COX en *Leishmania mexicana*. Ensayos de purificación de gp63 de *Leishmania mexicana* permitieron determinar que dicha proteína presentaba actividad COX, lo cual se confirmó al realizar una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo comercial anti-gp63 y el anticuerpo monoclonal D12, donde el inmunoprecipitado de ambos anticuerpos presentó actividad COX. La proteína gp63 no presentó los dominios ni residuos importantes para la actividad COX de las COX clásicas, sin embargo la única enzima tipo COX reportada en parásitos (proteína tipo COX de *Eentamoeba histolytica*) tampoco presentó estos dominios (Dey, Keller et al. 2003). Respecto a lo anterior se sabe que son muchos los casos donde los parásitos generan prostaglandinas utilizando vías que son distintas de las de las células en mamíferos. Además, se ha reportado que la búsqueda por alineamiento de secuencias en el genoma del parásito no muestra ninguna secuencia con homología significativa a las COX clásicas (Noverr, Erb-Downward et al. 2003).

Gp63 fue descrita como el principal antígeno de superficie expresado sobre promastigotes de varias especies de *Leishmania* (Chang and Fong 1982; Fong and Chang 1982; Bouvier, Etges et al. 1985; Etges, Bouvier et al. 1985; Chang, Inserra et al. 1986), y se menciona que debido a su estado de glicosilación esta proteína se encuentra en el rango de 60-66 kDa, dicho dato coincide con la proteína reconocida por el anticuerpo anti COX-2 de ratón y la proteína inmunoprecipitada por el anticuerpo monoclonal D12 la cual es una proteína de aproximadamente 63 kDa. Inicialmente se describió que gp63 tenía actividad proteasa, por lo que se le nombró como proteasa de superficie principal MSP por sus siglas en inglés, y después fue especificada como metaloproteasa de zinc. Debido a esta propiedad, gp63 fue denominada como leishmaniolisina por la Union Internacional de Bioquímica

y Biología Molecular. Esta metaloproteasa está presente no solo en diferentes especies de *Leishmania*, sino también en varias especies de *Trypanosoma* y *Trichomonas vaginalis* (Ma, Meng et al.; Etges, Bouvier et al. 1985; Bordier, Etges et al. 1986), lo cual apoya el resultado de encontrar el reconocimiento de una proteína por parte de anticuerpo D12 en ensayos de inmunofluorescencia en diferentes parásitos de importancia médica. Se ha reportado que en *L. major* la deficiencia de gp63 incrementa la sensibilidad a la lisis mediada por el complemento, pero no afecta la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago (Joshi, Sacks et al. 1998). La proteína gp63 de *Leishmania* podría considerarse como el principal factor de virulencia de este parásito, ya que dicha proteína puede degradar los componentes de la matrix extracelular, péptidos antimicrobianos, componentes del complemento, además de participar en la inactivación de vías de señalización para la activación de células efectoras como los macrófagos (Sorensen, Hey et al. 1994; Brittingham, Morrison et al. 1995). En vista de lo anterior, la proteína gp63 de *Leishmania* representa un factor de virulencia con una multiplicidad de funciones a la cual se le agrega, con base en los resultados reportados en este trabajo, la actividad tipo COX.



## **CONCLUSIÓN.**

En este trabajo se realizaron ensayos de purificación de proteínas y se utilizaron anticuerpos como herramientas de seguimiento de una proteína con actividad tipo COX. El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra la fracción con actividad tipo COX de *Leishmania mexicana* permitió determinar la localización subcelular de la proteína así como la identificación de la misma a partir de inmunoprecipitados con lo cual se concluye que la proteína gp63 es la responsable de la actividad tipo COX en *Leishmania mexicana*.

## **PERSPECTIVAS.**

- 1.- Secuenciar y clonar la proteína gp63 de *Leishmania mexicana*.
- 2.- Determinar la actividad COX en la proteína gp63 recombinante.
- 3.- Determinar PGH2 producida por la proteína gp63 nativa y recombinante.
- 4.- Determinar la protección de ratones BALB/C contra la infección de *Leishmania mexicana* mediante el uso del anticuerpo monoclonal D12.

## BIBLIOGRAFÍA

"Control of the leishmaniasis." World Health Organ Tech Rep Ser(949): xii-xiii, 1-186, back cover.

Alam, M. (1986). "Ionophore A23187 stimulates *Entamoeba histolytica* to release prostaglandin F2 alpha." Prostaglandins Leukot Med **22**(3): 259-64.

Arrieta, G. M. (2005). "Inducción de COX-2 por *Leishmania mexicana* en macrófagos." Tesis de Maestría.

Barr, S. D. and L. Gedamu (2003). "Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress." J Biol Chem **278**(12): 10816-23.

Belkaid, Y., B. Butcher, et al. (1998). "Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells." Eur J Immunol **28**(4): 1389-400.

Belley, A. and K. Chadee (1995). "Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation?" Parasitol Today **11**(9): 327-34.

Bhattacharya, M., K. Peri, et al. (1999). "Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope." J Biol Chem **274**(22): 15719-24.

Blackwell, J. M., R. A. Ezekowitz, et al. (1985). "Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum." J Exp Med **162**(1): 324-31.

Bodman-Smith, K. B., M. Mbuchi, et al. (2002). "C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses." Parasite Immunol **24**(9-10): 447-54.

Bordier, C., R. J. Etges, et al. (1986). "*Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycosphospholipid membrane anchor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 5988-91.

Bouvier, J., R. J. Etges, et al. (1985). "Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes." J Biol Chem **260**(29): 15504-9.

Brittingham, A., G. Chen, et al. (1999). "Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin." Infect Immun **67**(9): 4477-84.

Brittingham, A., C. J. Morrison, et al. (1995). "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-11.

Brooks, D. R., L. Tetley, et al. (2000). "Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*." J Cell Sci **113 ( Pt 22)**: 4035-41.

Buates, S. and G. Matlashewski (2001). "General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection." J Immunol **166**(5): 3416-22.

Campbell, K. A., P. J. Owendale, et al. (1996). "CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*." Immunity **4**(3): 283-9.

Courret, N., E. Prina, et al. (1999). "Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites." Eur J Immunol **29**(3): 762-73.

Chan, J., T. Fujiwara, et al. (1989). "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2453-7.

Chandrasekharan, N. V., H. Dai, et al. (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13926-31.

Chang, C. S., T. J. Inserra, et al. (1986). "Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*." Mol Biochem Parasitol **18**(2): 197-210.

- Chang, K. P. and D. Fong (1982). "Antigenic changes during intracellular differentiation of *Leishmania mexicana* in cultured macrophages." Infect Immun **36**(1): 430-1.
- Chappuis, F., S. Sundar, et al. (2007). "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat Rev Microbiol **5**(11): 873-82.
- Chiang, G. G. and B. M. Sefton (2001). "Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase." J Biol Chem **276**(25): 23173-8.
- Choudhry, M. A., Z. Ahmed, et al. (1999). "PGE(2)-mediated inhibition of T cell p59(fyn) is independent of cAMP." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): C302-9.
- Choudhry, M. A., P. E. Hockberger, et al. (1999). "PGE2 suppresses mitogen-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in T cells." Am J Physiol **277**(6 Pt 2): R1741-8.
- Dauguschies, A. and A. Joachim (2000). "Eicosanoids in parasites and parasitic infections." Adv Parasitol **46**: 181-240.
- Descoteaux, A. and G. Matlashewski (1989). "c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages." Mol Cell Biol **9**(11): 5223-7.
- Descoteaux, A. and S. J. Turco (1999). "Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 341-52.
- Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-8.
- Dey, I., K. Keller, et al. (2003). "Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13561-6.
- Diaz, G. J. (2007). "Identificación de una enzima tipo ciclooxygenasa en promastigotes de *Leishmania mexicana*." Tesis de Maestría.
- Etges, R. J., J. Bouvier, et al. (1985). "Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related." Mol Biochem Parasitol **14**(2): 141-9.

Farrell, J. P. and C. E. Kirkpatrick (1987). "Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice." J Immunol **138**(3): 902-7.

Ferguson, M. A. (1997). "The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1359): 1295-302.

Fong, D. and K. P. Chang (1982). "Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7366-70.

Funk, C. D., L. B. Funk, et al. (1991). "Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment." FASEB J **5**(9): 2304-12.

Galfre, G. and C. Milstein (1981). "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." Methods Enzymol **73**(Pt B): 3-46.

Gantt, K. R., S. Schultz-Cherry, et al. (2003). "Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages." J Immunol **170**(5): 2613-20.

Garfin, D. E. (1990). "One-dimensional gel electrophoresis." Methods Enzymol **182**: 425-41.

Garfin, D. E. (2009). "One-dimensional gel electrophoresis." Methods Enzymol **463**: 497-513.

Ghosh, S., S. Goswami, et al. (2003). "Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage." Biochem J **369**(Pt 3): 447-52.

Harris, S. G., J. Padilla, et al. (2002). "Prostaglandins as modulators of immunity." Trends Immunol **23**(3): 144-50.

Hayaishi, O. (2002). "Molecular genetic studies on sleep-wake regulation, with special emphasis on the prostaglandin D(2) system." J Appl Physiol (1985) **92**(2): 863-8.

Heinzel, F. P., R. M. Rerko, et al. (1998). "Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity." Cell Immunol **184**(2): 129-42.

Hermoso, T., Z. Fishelson, et al. (1991). "Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system." EMBO J **10**(13): 4061-7.

Holm, A., K. Tejle, et al. (2001). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation." Cell Microbiol **3**(7): 439-47.

Huber, M., E. Timms, et al. (1998). "Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice." Infect Immun **66**(8): 3968-70.

Ilg, T., M. Fuchs, et al. (1994). "Distribution of parasite cysteine proteinases in lesions of mice infected with *Leishmania mexicana* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **67**(2): 193-203.

Joshi, P. B., D. L. Sacks, et al. (1998). "Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63)." Mol Microbiol **27**(3): 519-30.

Kabututu, Z., S. K. Martin, et al. (2003). "Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*." Int J Parasitol **33**(2): 221-8.

Kane, M. M. and D. M. Mosser (2000). "*Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation." Curr Opin Hematol **7**(1): 26-31.

Khan, M. G., K. R. Bhaskar, et al. (2014). "Comparison of PCR-based diagnoses for visceral leishmaniasis in Bangladesh." Parasitol Int **63**(2): 327-31.

Kilunga, K. B., T. Inoue, et al. (2005). "Structural and mutational analysis of *Trypanosoma brucei* prostaglandin H2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases." J Biol Chem **280**(28): 26371-82.

Kilunga Kubata, B., N. Eguchi, et al. (1998). "*Plasmodium falciparum* produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans." J Exp Med **188**(6): 1197-202.

- Kirtland, S. J. (1988). "Prostaglandin E1: a review." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **32**(3): 165-74.
- Kubata, B. K., M. Duszenko, et al. (2000). "Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*." J Exp Med **192**(9): 1327-38.
- Kubata, B. K., M. Duszenko, et al. (2007). "Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites." Trends Parasitol **23**(7): 325-31.
- Kubata, B. K., Z. Kabututu, et al. (2002). "A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*." J Exp Med **196**(9): 1241-51.
- Kwan, W. C., W. R. McMaster, et al. (1992). "Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism." Infect Immun **60**(5): 2115-20.
- Liew, F. Y., S. Millott, et al. (1990). "Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine." J Immunol **144**(12): 4794-7.
- Locksley, R. M., S. L. Reiner, et al. (1993). "Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice." Science **261**(5127): 1448-51.
- Luong, C., A. Miller, et al. (1996). "Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2." Nat Struct Biol **3**(11): 927-33.
- Ma, L., Q. Meng, et al. "Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*." Parasitol Res **109**(1): 71-9.
- Martínez, R. E. (2007). "Participación de las MAPKs en la activación de la ciclooxigenasa-2 en macrófagos J774A.1 infectados con *Leishmania mexicana*." Tesis de Maestría.
- Matte, C., G. Maion, et al. (2001). "*Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis." Parasite Immunol **23**(4): 177-84.
- McConville, M. J. and J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization



of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-9.

McConville, M. J., L. F. Schnur, et al. (1995). "Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species." Biochem J **310 ( Pt 3)**: 807-18.

McConville, M. J., S. J. Turco, et al. (1992). "Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage." EMBO J **11**(10): 3593-600.

McGwire, B. S. and A. R. Satoskar (2014). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." Qjm **107**(1): 7-14.

McMaster, W. R., C. J. Morrison, et al. (1994). "Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases." Parasitology **108 Suppl**: S29-36.

Medina-Acosta, E., R. E. Karess, et al. (1989). "The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage." Mol Biochem Parasitol **37**(2): 263-73.

Meyer, D. J., R. Muimo, et al. (1996). "Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*." Biochem J **313 ( Pt 1)**: 223-7.

Michelin, M. A., J. S. Silva, et al. (2005). "Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection." Exp Parasitol **111**(2): 71-9.

Miller, S. B. (2006). "Prostaglandins in health and disease: an overview." Semin Arthritis Rheum **36**(1): 37-49.

Morita, I., M. Schindler, et al. (1995). "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2." J Biol Chem **270**(18): 10902-8.

Mosser, D. M. and P. J. Edelson (1987). "The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*." Nature **327**(6120): 329-31.

Mottram, J. C., G. H. Coombs, et al. (2004). "Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*." Curr Opin Microbiol **7**(4): 375-81.

Murray, H. W. (1982). "Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes." J Immunol **129**(1): 351-7.

Noverr, M. C., J. R. Erb-Downward, et al. (2003). "Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes." Clin Microbiol Rev **16**(3): 517-33.

Okumura, Y., A. Yamauchi, et al. (2014). "A case of mucocutaneous leishmaniasis diagnosed by serology." J Dermatol **41**(8): 739-42.

Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, et al. (1991). "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*." Exp Parasitol **72**(2): 191-204.

Proudfoot, L., A. V. Nikolaev, et al. (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10984-9.

Proudfoot, L., C. A. O'Donnell, et al. (1995). "Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages." Eur J Immunol **25**(3): 745-50.

Puentes, S. M., D. M. Dwyer, et al. (1989). "Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum." J Immunol **143**(11): 3743-9.

Ramaswamy, K., P. Kumar, et al. (2000). "A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*." J Immunol **165**(8): 4567-74.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products." J Immunol **138**(6): 1926-32.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1990). "Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1." J Clin Invest **85**(6): 1914-24.

Roos, K. L. and D. L. Simmons (2005). "Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 62-9.

Rowley, A. F., C. L. Vogan, et al. (2005). "Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems." J Exp Biol **208**(Pt 1): 3-14.

Rozenfeld, C., R. Martinez, et al. (2003). "Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration." Infect Immun **71**(4): 2047-57.

Ruggeri, P., G. Nicocia, et al. (2000). "Polyamine metabolism in prostaglandin E2-treated human T lymphocytes." Immunopharmacol Immunotoxicol **22**(1): 117-29.

Salafsky, B. and A. C. Fusco (1987). "*Schistosoma mansoni*: a comparison of secreted vs nonsecreted eicosanoids in developing schistosomulae and adults." Exp Parasitol **64**(3): 361-7.

Samaras, N. and T. W. Spithill (1989). "The developmentally regulated P100/11E gene of *Leishmania major* shows homology to a superfamily of reductase genes." J Biol Chem **264**(7): 4251-4.

Sanchez-Ramirez, B., M. Ramirez-Gil, et al. (2004). "*Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*)." Exp Parasitol **106**(3-4): 119-25.

Schneider, P., J. P. Rosat, et al. (1992). "*Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages." Exp Parasitol **75**(2): 196-206.

Seay, M. B., P. L. Heard, et al. (1996). "Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes." Infect Immun **64**(12): 5129-37.

Smith, W. L. (1986). "Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells." Annu Rev Physiol **48**: 251-62.

Smith, W. L., D. L. DeWitt, et al. (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annu Rev Biochem **69**: 145-82.

Smith, W. L., E. A. Meade, et al. (1994). "Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2." Ann N Y Acad Sci **714**: 136-42.

Sommer, A., R. Rickert, et al. (2003). "A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2." Infect Immun **71**(6): 3603-6.

Sorensen, A. L., A. S. Hey, et al. (1994). "*Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro." APMIS **102**(4): 265-71.

Sosa Ávila Ediel Javier, C. L. J., Zuñiga Carrasco Iván Renato (2014). "Perfil Epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México." Enfermedades Infecciosas y Microbiología **34**(1): 31-36.

Spencer, A. G., J. W. Woods, et al. (1998). "Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy." J Biol Chem **273**(16): 9886-93.

Srivastav, S., W. Basu Ball, et al. (2014). "*Leishmania donovani* prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins." J Biol Chem **289**(2): 1092-105.

Tay, A., J. A. Squire, et al. (1994). "Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization." Genomics **23**(3): 718-9.

Weems, C. W., Y. S. Weems, et al. (2006). "Prostaglandins and reproduction in female farm animals." Vet J **171**(2): 206-28.

Weiss, W., F. Weiland, et al. (2009). "Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis." Methods Mol Biol **564**: 59-82.

World-Health-Organisation (2002). "The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections."

World Health Organization, G. H. O. G. (2014). Leishmaniasis.