



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA CELULAR
LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL**

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES Y
VESÍCULAS DE MEMBRANA SECRETADAS DE *Leishmania* spp.
CON EL PLASMINÓGENO, COMPONENTE DEL SISTEMA
FIBRINOLÍTICO**

**Tesis Doctoral como requisito parcial para optar al Grado de Doctor en
Biología Celular**

DONACION

**Autor: MSc. Lourdes Figuera
Tutor: Dra. Luisana Avilán**

**SERBIULA
Tullio Febres Cordero**

Mérida, junio 2013

DEDICATORIA

A

La memoria de mi amada abuela Josefina.

*Mis padres por su incondicional apoyo mantenido
perfectamente a través del tiempo.*

A mi esposo Edgar, pilar fundamental en mi vida.

*A mis tesoros: Celeste y Brisabed por constituir los
motores de mi vida.*

“ Cuando quieres algo, todo el universo conspira para que realices tu deseo ”

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

De manera especial debo agradecer a mi Tutora, Profesora Luisana Avilán, por aceptarme en su laboratorio para realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección. Su apoyo, estímulo y confianza en mi trabajo, su rigurosidad y capacidad de orientación, constituyó un aporte invaluable no solo en el desarrollo de mi tesis, sino en mi formación como investigador. Gracias infinitas.

Deseo hacer extensivo mi agradecimiento por la dicha de haber tenido la oportunidad de compartir con el Dr. Juan Luis Concepción. Su participación oportuna ha enriquecido este trabajo y ha significado el surgimiento de una bella amistad. Gracias siempre por sus consejos y enseñanzas.

Quiero expresar mi más sincera gratitud a la señora Betty Hernández, por su apoyo y disposición incondicional durante la realización de este trabajo. Ella es una persona admirable con gran espíritu y dinamismo de trabajo.

Al Dr. Edgar Marchán Marcano, por acompañarme, apoyarme y comprenderme desde el inicio en esta ardua meta académica, sobre todo por sus palabras de aliento, estímulo y fortaleza que fueron claves para alcanzar esta meta. Por las sugerencias oportunas y correcciones muy acertadas realizadas al manuscrito final de mi tesis doctoral. Mil gracias.

A mis hijas: Brisabed y Celeste por la tolerancia y comprensión en mis horas de ausencia, a mis padres y hermanos por todo el amor incondicional de forma genuina que siempre me han brindado y a la abuela Brisaida por su apoyo oportuno en los momentos más difíciles.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Animal: Amaranta, Luis, Yuma, Carolaing, Visnú, Jessica, María Andreína y Ender. En especial, a Amaranta, quien compartió conmigo sus conocimientos y experiencias en el laboratorio sin mezquindad.

A mis amigos del Laboratorio de Enzimología de Parásitos: Judith Neves, Andrea Silene y Héctor Acosta, quienes siempre estuvieron dispuestos a escucharme y orientarme en los momentos más difíciles durante mi estadía en la Facultad de Ciencias, brindándome palabras de aliento y estímulo.

A todos los miembros que conforman la familia del Laboratorio de Enzimología de Parásitos, al Dr. Wilfredo Quiñones y a la Dra. Ana Cáceres. Mis recuerdos al señor Silverio por su cortesía y ayuda en algunos momentos difíciles.

Al Dr. Tomás Hermoso y a la Licenciada María Figuera, por recibirnos en su Laboratorio de Proteómica en el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

A la Dra. Patricia Cuervo, quien gentilmente me permitió realizar mi pasantía doctoral en proteómica en el Laboratorio de Pesquisa em Leishmaniose del Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ en Río de Janeiro, Brasil.

A la Dra. Rosa Virginia Mendoza, la Licenciada Delsy Dávila Vera y al Ingeniero Alirio Balza Quintero, todos miembros del Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Prú” de la Universidad de los Andes.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

Este Trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Fisiología Animal** de la Facultad de Ciencias, con financiamiento del proyecto N° **2007000960** de Misión Ciencias del **FONACIT**.

Gracias a la beca otorgada por la **Comisión de Formación de Recursos humanos de la Universidad de Oriente** y al programa de beca internacional de la **Universidad de las Naciones Unidas-Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC)**, por el apoyo económico otorgado para la realización de mi pasantía doctoral en el **Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose** en el **Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ** en Río de Janeiro, Brasil.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
Introducción	1
Objetivo General y Específicos	4
Marco Teórico	5
Materiales y Métodos	44
Capítulo I	
Resultados	83
Discusión	96
Capítulo II	
Resultados	102
Discusión	135
Conclusiones	152
Perspectivas	153
Referencias bibliográficas	154
Anexos	178

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	Pág.
I. Ejemplos de bacterias que interaccionan con el sistema plasminógeno plasmina	22
II. Ejemplos de parásitos que interaccionan con el sistema plasminógeno plasmina	23
III. Características fisicoquímicas de tres tipos de vesículas de membrana secretadas	38
IV. Constante de disociación o K_d de <i>Leishmania</i> spp.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
1. Taxonomía de <i>Leishmania</i> spp	7
2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	9
3. Esquema modular de la estructura del plasminógeno	15
4. Proceso de Fibrinólisis	18
5. Sistema plasminógeno/plasmina	19
6. Composición proteica y lipídica de un exosoma típico	40
7. Mapa del vector de clonación pGEMT	58
8. Mapa del vector de subclonación pET28a	63
9. Perfil de elución del plasminógeno de una cromatografía de afinidad con una columna L-lisina sefarosa 4B	84
10. Perfil de elución del plasminógeno de una cromatografía de exclusión molecular con una columna sefarosa 6B	85
11. Unión de plasminógeno con los promastigotes de <i>L.</i> <i>mexicana</i>	88
12. Unión de plasminógeno con los promastigotes de <i>L.</i> <i>braziliensis</i>	88
13. Unión de plasminógeno con los promastigotes de <i>L.</i> <i>infantum</i>	88
14. Fracción microsomal de las tres especies de <i>Leishmania</i>	91
15. Electroforesis bidimensional de la fracción microsomal de <i>L.</i> <i>mexicana</i>	92
16. Ligand blotting de la electroforesis bidimensional de la fracción microsomal de <i>L. mexicana</i>	93
17. Ligand blotting de la electroforesis bidimensional de la fracción microsomal de <i>L. mexicana</i> revelado por quimioluminiscencia	93
18. Western blotting de la fracción microsomal de <i>L. mexicana</i> obtenida de la electroforesis bidimensional donde se corrobora la presencia de SMP-1	95

19. Microscopía electrónica de transmisión de las vesículas de membrana secretadas por <i>L. mexicana</i>	103
20. Microscopía electrónica de transmisión de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	103
21. Microscopía electrónica de transmisión de las vesículas o brotes que emergen de la membrana plasmática visualizado en promastigotes de <i>L. mexicana</i>	104
22. Microscopía electrónica de barrido de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> antes del proceso de secreción	105
23. Microscopía electrónica de barrido de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> después del proceso de secreción	105
24. Patrón de bandas proteicas de <i>Leishmania</i> spp	107
25. Western blotting de las vesículas de membrana de <i>L. mexicana</i> revelado con diferentes anticuerpos de parásitos de la familia <i>Trypanosomatidae</i>	109
26. Interacción de las vesículas de membrana con el plasminógeno en <i>L. mexicana</i>	110
27. Ligand blotting y Western blotting de las vesículas de membrana secretadas por <i>L. mexicana</i>	111
28. Ligand blotting de las vesículas de membrana de <i>Leishmania</i> spp	112
29. Resultados obtenidos de la espectrometría de masas utilizando la tecnología Orbitrap	113
30. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen que codifica para la proteína SMP-1	115
31. Amplificado de SMP-1 obtenido por la técnica de PCR	115
32. Digestión del vector pGEMT con las enzimas de restricción BamHI y NdeI	116
33. Secuencia nucleotídica obtenida para el gen SMP-1	116
34. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de SMP-1 de <i>L. mexicana</i> con otros miembros de la familia <i>Trypanosomatidae</i>	117

35. Modelo tridimensional de la proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1)	119
36. Codones raros presentes en la secuencia nucleotídica de la proteína SMP-1	121
37. PCR de colonia	121
38. Ensayos de sobreexpresión de SMP-1 con IPTG	122
39. Ensayo de solubilidad de SMP-1 con IPTG	123
40. Perfil de purificación de SMP-1	124
41. Oligomerización de SMP-1	125
42. Ensayo de especificidad de anticuerpos anti SMP-1	126
43. Western blotting revelado con anticuerpos anti SMP-1 de <i>L. mexicana</i>	126
44. Inmunofluorescencia de parásitos permeabilizados con anticuerpos anti-SMP1	127
45. Western blotting de los ensayos de digestión por proteasas de SMP-1	129
46. Zimograma de las vesículas de membrana de <i>L. mexicana</i>	130
47. Western blotting de los ensayos de digestión por proteasas de enolasa en vesículas de membrana	130
48. Western blotting de los ensayos de digestión por proteasas de enolasa	131
49. Interacción de SMP-1 con el plasminógeno humano	132
50. Inhibición de la interacción de SMP-1 con el plasminógeno por ácido ϵ -aminocaproico	133
51. Inhibición de la unión de SMP-1 con el plasminógeno humano por carboxipeptidasa B	134
52. Esquema de interacción de <i>L. mexicana</i> con el sistema fibrinolítico	151

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AP	α 2-antiplasmina
DTT	ditiotreitól
ϵ-ACA	ácido epsilón aminocaproico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo inmunoabsorbente unido a enzima
FDP	producto de degradación de la fibrina
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GlcK	glucoquinasa
GP63	glicoproteína 63
GPI	glicofosfatidilinositol
HIV	virus de inmunodeficiencia humana
HSP70	proteína de choque térmico 70
HSP90	proteína de choque térmico 90
IFNγ	interferón gamma
IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil- β -D-tio-galactósido
kDa	kilo Dalton
LACK	proteína quinasa C activada
LB	medio de cultivo Luria Bertani
LBS	sitio de unión a lisina
LCD	leishmaniasis cutánea difusa
LCL	leishmaniasis cutánea localizada
LMC	leishmaniasis mucocutánea
LV	leishmaniasis visceral
LIT	medio de cultivo a base de infusión de hígado y triptosa
MEB	microscopía electrónica de barrido
MET	microscopía electrónica de transmisión
mg	miligramo/s
ml	mililitro

mM	milimolar
μM	micromolar
MMS	metaloproteasas
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NO	óxido nítrico
OMS	organización mundial de la salud
OPD	orto-felindiamina
PAIs	inhibidores de los activadores del plasminógeno
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenolpiruvato
PGK	fosfoglicerato quinasa
PKC	proteína quinasa C
Plg	plasminógeno
Plm	plasmína
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	polifluoruro de vinilideno
p/v	peso/ volumen
RPMI	medio mínimo Roswell Park Memorial Institute
SDS	duodecil sulfato de sodio
SFM	sistema fagocítico mononuclear
SMP-1	proteína miristoilada pequeña 1
TEMED	tetrametiletildiamina
t-PA	activador de plasminógeno tisular
TGF-β	factor de crecimiento tumoral beta
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
u-PA	activador de plasminógeno tipo uroquinasa

**Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Postgrado en Biología Celular
Laboratorio de Fisiología Animal**

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES Y
VESÍCULAS DE MEMBRANA SECRETADAS POR *Leishmania* spp.
CON EL PLASMINÓGENO, COMPONENTE DEL SISTEMA
FIBRINOLÍTICO**

RESUMEN

La interacción de una gran variedad de organismos patógenos, tanto procariotas como eucariotas con los componentes del sistema fibrinolítico, podría ser considerado un posible evento universal implicado en el proceso de invasión, diseminación y establecimiento de los patógenos en el hospedador. Esta interacción puede ser mediada a través de receptores localizados en la superficie celular, vesículas secretadas y/o proteínas con capacidad de unión al plasminógeno que le permitan al patógeno secuestrar componentes del sistema fibrinolítico del hospedador, promoviendo así la degradación de la fibrina y proteínas de la matriz extracelular. Asimismo, entre los organismos eucariotas, se ha demostrado que *Leishmania mexicana*, agente causal de la Leishmaniasis cutánea, tiene la capacidad de interactuar con los componentes del sistema fibrinolítico: plasminógeno y plasmina. En ese sentido, se realizó un estudio de la interacción de los promastigotes y vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp. con el plasminógeno. Las vesículas de membrana de *Leishmania* spp. fueron purificadas por ultracentrifugación luego de someter los parásitos a un proceso de secreción en medio mínimo durante 24 horas. La caracterización bioquímica de las vesículas de membrana de *L. mexicana* se llevó a cabo mediante electroforesis, Western blotting y Ligand blotting utilizando plasminógeno como ligando. Se detectaron diferentes proteínas: factor de elongación-1 α , fosfoglicerato quinasa, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, GP63, y dos proteínas receptoras de plasminógeno: Enolasa y LACK. Adicionalmente se logró identificar por espectrometría de masas un nuevo receptor de plasminógeno, el cual fue posteriormente clonado y sobreexpresado en *Escherichia coli*. Este receptor es la

proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1). SMP-1 recombinante fue capaz de unir plasminógeno de manera dosis dependiente y saturable, con una constante de disociación (K_d) de 0,24 μ M, valor que se encuentra dentro del rango fisiológico de la concentración de plasminógeno sanguíneo. Esa interacción fue inhibida por el ácido ϵ -aminocaproico, sugiriendo que en la unión están involucrados residuos de lisina; asimismo, los ensayos realizados con carboxipeptidasa B, confirmaron una inhibición en un 65% de la interacción, indicando que la lisina encontrada en el extremo carboxilterminal está implicada en el reconocimiento con el plasminógeno. Empleando los anticuerpos policlonales anti SMP-1, se demostró la presencia de SMP-1 en el flagelo y en las vesículas de membrana de las tres especies de *Leishmania*. Se demostró a su vez que *L. braziliensis* y *L. infantum*, al igual que *L. mexicana*, también tienen la capacidad de unir plasminógeno humano, siendo mayor en los promastigotes en fase estacionaria y los sometidos a choque térmico, observándose gran analogía en la inhibición de la interacción parásitos-plasminógeno por el ácido ϵ -aminocaproico, sugiriendo que en la unión están involucrados residuos de lisina. Los valores de constantes de disociación (K_d) para la unión con plasminógeno son similares, denotando que no existen diferencias considerables en la capacidad de unión al plasminógeno entre las tres especies de *Leishmania* evaluadas. Estos hallazgos nos permiten proponer como modelo que los promastigotes de *Leishmania* spp. en fase estacionaria expresan receptores de plasminógeno en su superficie y además secretan vesículas de membrana que contienen estos mismos receptores: Enolasa, LACK y SMP-1, que podrían constituir nuevos factores de virulencia en *Leishmania*.

Palabras claves: *Leishmania* spp., sistema fibrinolítico, plasminógeno, vesículas de membrana secretadas, proteínas de unión a plasminógeno.

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Postgrado en Biología Celular
Laboratorio de Fisiología Animal

**STUDY OF THE INTERACTION OF PROMASTIGOTES AND
MEMBRANE VESICLES SECRETED BY *Leishmania* spp. WITH
PLASMINOGEN, COMPONENT OF FIBRINOLYTIC SYSTEM**

ABSTRACT

The interaction of a wide variety of pathogenic organisms, both prokaryotic and eukaryotic with fibrinolytic system components, could be considered a possible universal event involved in the invasion process, dissemination and establishment of pathogens in the host. This interaction may be mediated through receptors located on cellular surface, secreted vesicles and/or proteins with plasminogen binding capacity that would allow the components sequester pathogens host fibrinolytic system, thus promoting the degradation of fibrin net and extracellular matrix proteins. Also among eukaryotic organisms, it have been shown that *Leishmania mexicana*, causal agent of cutaneous Leishmaniasis, has the ability to interact with the fibrinolytic system components: plasminogen and plasmin. In this sense, a study of the interaction of promastigotes and secreted membrane vesicles of *Leishmania* spp. with the plasminogen was carried out. Membrane vesicles of *Leishmania* spp. were purified by ultracentrifugation after submitting the parasites to a process of secretion in a minimum medium for 24 hours. The biochemical characterization of the membrane vesicles of *L. mexicana* was carried out by electrophoresis, Western blotting and Ligand blotting using plasminogen as a ligand. Different proteins were detected: elongation factor-1 α , phosphoglycerate kinase, glyceraldehydes 3 phosphate deshydrogenase, GP63, and two receptors proteins plasminogen: Enolase and LACK. Additionally, we identified by mass spectrometry a new plasminogen receptor, which was subsequently cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. This receptor is a small myristoylated protein SMP-1. SMP-1 recombinant was able to bind plasminogen in a dose dependent and saturable manner with a dissociation constant (K_d) of 0,24 μ M, value that is within the physiological range of the plasminogen blood concentration. This interaction was inhibited by ϵ -aminocaproic acid, suggesting that in the binding are implicated lysine residues. Further, assays

performed with carboxypeptidase B treatment, confirmed an inhibition of 65%, indicating that lysine residue found at the carboxylterminal end is involved in the recognition of plasminogen. Using polyclonal antibodies anti SMP-1, it was showed the presence of SMP-1 in the flagellum and in the membrane vesicles of the three *Leishmania* species. Also we demonstrated that *L. braziliensis* and *L. infantum*, like *L. mexicana*, have the ability to bind human plasminogen, this binding being higher in stationary phase promastigotes and those submitted to heat shock. In all case the binding was inhibited by ϵ -aminocaproic acid, suggesting that lysine residues are involved. Values of dissociation constant (K_d) for the binding to plasminogen are similar, denoting there are not considerable differences in plasminogen binding capacity between the three *Leishmania* species tested. These findings allow us to propose as model that promastigotes of *Leishmania* spp. in the stationary phase, express plasminogen receptors on their surface and also secreted membrane vesicles containing the same receptors: Enolase, LACK and SMP-1, which could be new virulence factors in *Leishmania*.

Keywords: *Leishmania* spp., fibrinolytic system, plasminogen, membrane vesicles secreted, plasminogen binding proteins.

INTRODUCCIÓN

La interacción de los microorganismos patógenos con una variedad de moléculas del hospedador, constituye uno de los mecanismos implicados en la invasión y el establecimiento de estos agentes infecciosos (Wilson *et al.*, 2002). El proceso de invasión es mediado principalmente por factores de virulencia, constituidos por moléculas que se encuentran en la superficie celular y/o productos secretados, que participan en la evasión de la primera línea de defensa del hospedero (respuesta inmune innata y adquirida) (Bhattacharya *et al.*, 2012). Además comprende la degradación y penetración de las barreras tisulares (matriz extracelular y membrana del basamento) a través de diferentes mecanismos que involucran la interacción de los patógenos con un complejo sistema de cascadas dependiente de proteasas, entre las cuales se incluyen: fagocitosis, activación del complemento, coagulación y fibrinólisis, las cuales desempeñan funciones muy importantes asociadas con la patogénesis de la infección sistémica (Sanderson-Smith, 2012).

La interacción de los microorganismos patógenos con los componentes del sistema fibrinolítico humano, constituye uno de los múltiples mecanismos estratégicos que favorecen el proceso de invasión y diseminación en el hospedador (Lottenberg *et al.*, 1994; Coleman y Benach, 1999; Bergmann y Hammerschmidt, 2007). Diversos estudios han permitido demostrar la capacidad que tienen las bacterias patógenas de secuestrar el plasminógeno, componente del sistema fibrinolítico del hospedador (Boyle y Lottenberg, 1997; Lahteenmaki *et al.*, 2005; Sun, 2006) a través de receptores localizados en la superficie celular bacteriana (Sanderson-Smith *et al.*, 2012) aunado a que el plasminógeno es capaz de interactuar

con los productos secretados por estos organismos bacterianos (Toledo *et al.*, 2012). La activación de este zimógeno plasmático es mediada por los activadores producidos por algunas bacterias invasivas o por los activadores del hospedador (activador de plasminógeno tisular (t-PA) y activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA), transformando al plasminógeno en su forma activa, plasmina, cuya actividad proteolítica le confiere al patógeno diversas ventajas como: (i) secuestrar y exponer la plasmina en su superficie impidiendo la inhibición por la α 2-antiplasmina y α 2-macroglobulina, (ii) escapar fácilmente de la red de fibrina depositada por el hospedador para detener la infección, (iii) degradar los componentes del complemento e inmunoglobulinas, (iv) tomar nutrientes de los tejidos del hospedador, (v) promover la adherencia e invasión celular, (vi) degradar directamente proteínas de la matriz extracelular y de la membrana del basamento a través de la activación de las metaloproteasas, facilitando así la diseminación y su establecimiento en el hospedador (Hall *et al.*, 1991; Sun, 2006; Gong *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2011; Siemens *et al.*, 2011).

En la última década, numerosas evidencias experimentales han permitido documentar que además de los organismos procariotas (bacterias), una gran variedad de organismos eucariotas (hongos y parásitos), también interaccionan con el sistema fibrinolítico (Crowe *et al.*, 2003; Jolodar *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2004; Ramajo-Hernández *et al.*, 2007; Mundodi *et al.*, 2008; de la Torre-Escudero *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2011), considerándose como un posible evento universal en patógenos utilizado como mecanismo de invasión y migración en el hospedador (Sun, 2006).

Entre los parásitos que interaccionan con el sistema fibrinolítico se encuentran los protozoarios pertenecientes al género *Leishmania* (Avilán *et al.*, 2000; Calcagno *et al.*, 2002), causantes de un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde lesiones cutáneas localizadas que curan espontáneamente hasta formas viscerales que pueden ocasionar la muerte del individuo sino son tratadas oportunamente. La infección por *Leishmania* y su establecimiento en el hospedador mamífero va a depender de múltiples factores relacionados con determinantes moleculares evasivos/invasivos, los cuales se conocen como factores de virulencia y son claves para garantizar el parasitismo intracelular (Chang *et al.*, 1990). En el caso de *Leishmania*, estos determinantes moleculares evasivos/invasivos se encuentran localizados en la superficie celular, son secretados y/o podrían constituir proteínas de unión a plasminógeno que le permiten al parásito interaccionar con el sistema fibrinolítico del hospedador. En la superficie de *Leishmania mexicana*, han sido identificados los receptores para plasminógeno: Enolasa y el receptor intracelular de proteína quinasa C activada (LACK) (Vanegas *et al.*, 2007; Gómez-Arreaza *et al.*, 2011), las cuales también han sido reportadas en el secretoma de diferentes especies de *Leishmania* (Silverman *et al.*, 2008; Cuervo *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2011) y en el proteoma de los exosomas de *Leishmania major* y *Leishmania donovani* (Silverman *et al.*, 2010). En el presente estudio se propone conocer si otras especies de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum*) causantes de manifestaciones mucocutáneas y viscerales respectivamente, interaccionan con el sistema fibrinolítico, y dilucidar si las proteínas receptores de plasminógeno se encuentran en las vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp., las cuales podrían constituir otros factores de virulencia implicados en la invasión y diseminación en el hospedador.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio de la interacción de los promastigotes y vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp. con el plasminógeno, componente del sistema fibrinolítico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las características de unión al plasminógeno humano en los promastigotes de *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*.
2. Obtener y caracterizar las vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp.
4. Analizar las proteínas con capacidad de unión al plasminógeno humano en las vesículas de membrana de *Leishmania* spp.
5. Identificar, clonar, sobreexpresar y purificar un gen que codifique para un nuevo receptor de plasminógeno en vesículas de *Leishmania* spp y producir anticuerpos policlonales.

MARCO TEÓRICO

1. Leishmaniasis

1.1. Descripción y distribución geográfica

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por diferentes especies de protozoarios pertenecientes al orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*. Fue descrita por primera vez en 1903, por Leishman y Donovan en material de autopsias del bazo de pacientes de la India que sufrían fiebre (Ross, 1903). En la actualidad, la Leishmaniasis constituye un grave problema de salud pública mundial, considerada como categoría I de las enfermedades infecciosas no controladas del Programa de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud, que afectan a las poblaciones pobres y marginadas. Es endémica en 88 países (66 del Viejo Mundo y 22 del Nuevo Mundo) de África, Asia, Europa y América. Alrededor de 350 millones de individuos están en riesgo de contraer esta enfermedad; la prevalencia mundial es de 12 millones y la incidencia de 2 millones de casos, de los cuales 1,5 millones corresponden a Leishmaniasis cutáneas y 500 mil a Leishmaniasis visceral (OMS, 2010).

La Leishmaniasis está clasificada como una de las enfermedades olvidadas del mundo con una morbilidad global de 2.090 mil individuos deshabilitados por año y una tasa de mortalidad de 60.000 individuos cada año (Evans y Kedzierski, 2012). En el caso de la Leishmaniasis visceral, se ha convertido en una de las infecciones oportunistas más frecuentes en individuos HIV positivos en áreas endémicas, trayendo complicaciones clínicas por el incremento en la falla del tratamiento (Mathu

et al., 2006).

En Venezuela, la Leishmaniasis es endémica, presenta una amplia distribución geográfica con predominio en las regiones montañosas, de pie de monte o selváticas, encontrándose en 22 de las 24 entidades político-territoriales (Yépez y Scorza, 2003). En este sentido, De Lima *et al.*, 2010 reportaron 47.762 casos de las diferentes formas de Leishmaniasis cutánea en un análisis clínico epidemiológico realizado en Venezuela por entidad federal entre 1988-2010, correspondiendo el 98% a la forma cutánea localizada, siendo los estados Mérida y Trujillo los más afectados.

En relación a la Leishmaniasis visceral en Venezuela, Borges, 2010 reportó 465 casos en 13 de las 24 entidades federales, registrándose una tasa anual de incidencia de 0,2 casos por 100.000 habitantes, siendo los estados más afectados Nueva Esparta, Anzoátegui, Lara, Sucre y Trujillo. Estas son cifras subestimadas originadas por ausencia de un reporte obligatorio además del uso inadecuado de herramientas en el diagnóstico que conllevan al subregistro de la Leishmaniasis visceral.

1.2. Taxonomía y epidemiología

En relación a la taxonomía, *Leishmania* pertenece al dominio Eukariota, reino Excavata, subreino Protozoa, phylum Euglenozoa, orden Kinetoplastidae, familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania*. Lainson y Shaw, 1987, establecieron la subdivisión del género en dos subgéneros: *Leishmania*, que comprende todos los parásitos que se desarrollan en el intestino medio y anterior de los vectores (región *Suprasyllaria*) con representantes tanto del Viejo mundo como del Nuevo Mundo, y *Viannia*, que agrupa todos los parásitos que se desarrollan en el intestino posterior,

migrando luego hacia el intestino medio y anterior de los insectos (región *Peripylaria*), restringido al Nuevo Mundo. Dentro de cada subgénero, se incluyen una o más especies (Rioux *et al.*, 1990), tal como se muestra en la Figura 1.

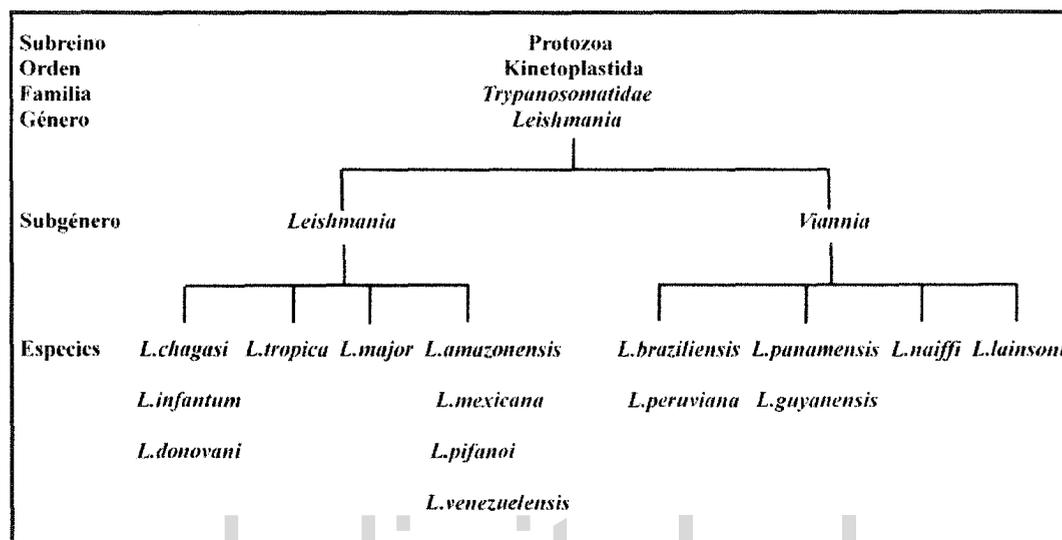


Figura 1. Taxonomía de *Leishmania*. Tomado y modificado de Bañuls *et al.*, 2007.

Las especies de *Leishmania* existentes presentan morfologías similares, pero se diferencian en cuanto a su distribución geográfica, comportamiento biológico, características clínicas y epidemiológicas, parámetros inmunopatológicos, patrones isoenzimáticos, aspectos moleculares, entre otros (Lainson y Shaw, 1979; Croan *et al.*, 1997; Bañuls *et al.*, 2007).

La transmisión de la Leishmaniasis es a través de la picadura de insectos dípteros hematófagos de la familia *Psychodidae*, conocidos comúnmente como flebótomos, pertenecientes al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Se han descrito alrededor de 500 especies, de las cuales solo 30 han sido

confirmadas como vectores implicados en la transmisión de ésta enfermedad (Lainson y Shaw, 1972, Killick-Kendrick, 1999). La Leishmaniasis es considerada una antroponosis; en la forma zoonótica, el parásito se mantiene en reservorios animales silvestres (rabipelados, zorros, roedores) o en domésticos (perros, gatos) y el hombre se infecta accidentalmente cuando penetra en el ciclo natural de transmisión, mientras que en la forma antroponótica, el hombre es el único hospedero (Desjeux, 2001).

Además de la transmisión vectorial, también han sido reportadas otras formas de transmisión: transfusional, congénita, sexual, ocupacional (accidentes en el laboratorio), y por transplantes de órganos (Symmers, 1960; Elamin y Omer, 1992; Gutiérrez, 1993; Herwaldt y Juranek, 1993; Cummins *et al.*, 1995; Sing *et al.*, 1996; Alvar *et al.*, 1997; Meinecke *et al.*, 1999).

1.3. Ciclo de vida

El ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Figura 2), se inicia cuando una hembra infectada del vector en la búsqueda de sangre para su alimentación pica a un hospedero vertebrado susceptible. Este vector, generalmente presenta el proventrículo obstruido debido a la gran cantidad de promastigotes metacíclicos (forma infectiva) y al succionar sangre, todo el contenido es regurgitado e inoculado junto con la saliva en la dermis del hospedero mamífero. Los promastigotes metacíclicos (móviles) llegan a la circulación sanguínea y son fagocitados por las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos), en cuyo interior se transforman en formas aflageladas conocidas como amastigotes que constituyen la forma clínicamente

relevante. Los amastigotes son capaces de dividirse por fisión binaria hasta producir la ruptura de la célula, liberando los amastigotes que van a infectar a otros macrófagos circundantes (Alexander *et al.*, 1999; Solbach y Laskay, 2000; Bonfante y Barroeta, 2002; Singh, 2006).

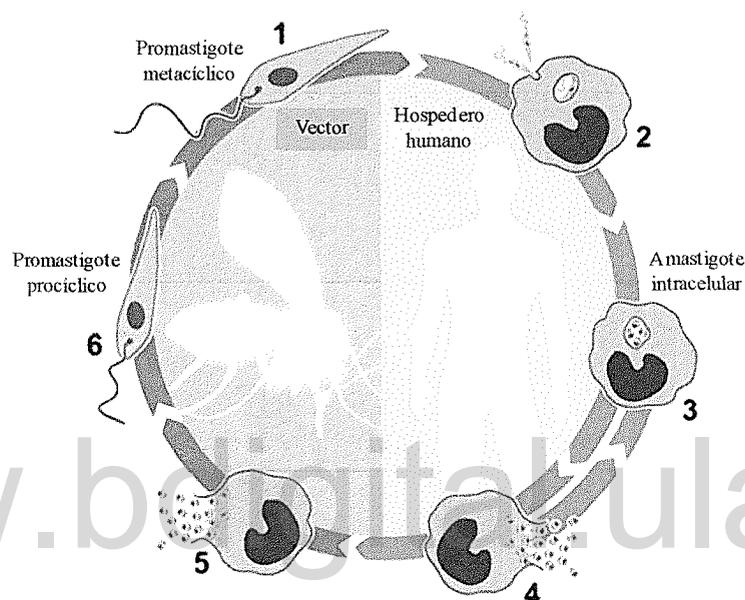


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Tomado de Cuervo *et al.*, 2010.

Algunas especies, *L. mexicana* y *L. braziliensis*, se localizan en los macrófagos de la piel y mucosas respectivamente, mientras que *L. donovani* y *L. infantum* se diseminan hacia las vísceras (Boelaert *et al.*, 2000). Cuando un flebótomo se alimenta de un hospedero infectado, succiona de la sangre y la linfa los amastigotes, los cuales en el intestino medio del vector se transforman en promastigotes (metacicloogénesis) y finalmente, migran a la probóscide cerrando así el ciclo de vida (Dostálova y Volf, 2012).

1.4. Manifestaciones clínicas

La Leishmaniasis presenta un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde lesiones cutáneas localizadas que curan espontáneamente, hasta formas viscerales que pueden ocasionar la muerte del individuo si no es tratada oportunamente. El polimorfismo de las lesiones va a depender principalmente de la especie de *Leishmania* involucrada y de la respuesta inmunológica del hospedador (Harris *et al.*, 1998). Puede ser clasificada en cuatro formas clínicas, Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL), Leishmaniasis Mucocutánea (LMC), Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) y Leishmaniasis Visceral (LV) (Herwaldt, 1999; Stuart *et al.*, 2008).

La LCL es causada por especies del subgénero *Leishmania*, donde se incluyen diferentes especies pertenecientes al Viejo Mundo y al Nuevo Mundo. Se caracteriza por la formación de úlceras en la piel de localización variable (principalmente en la cara, brazos y piernas), que pueden ser únicas o múltiples. Las úlceras son redondeadas, no dolorosas, con bordes indurados, levantados y de contornos regulares. Presentan un fondo limpio, granulomatoso, que en ocasiones suelen infectarse secundariamente con bacterias. La mayoría de los casos curan espontáneamente en algunos meses, cuando el individuo posee una adecuada respuesta inmune celular, quedando cicatrices hipocrómicas para toda la vida (Grevelink y Lerner, 1996).

La LMC es ocasionada por diferentes especies del subgénero *Viannia*, entre las cuales se incluye *L. braziliensis*. Se produce por la diseminación hemática o linfática de las amastigotes de la piel hacia las membranas mucosas. En la fase inicial,

aparecen úlceras cutáneas localizadas que desaparecen, pero años después (10-20 años) reaparecen en las membranas mucosas, orales, nasales, faríngeas, o laríngeas, causando gran daño histológico, anatómico y ruptura funcional del tejido. Las lesiones generalmente comienzan a nivel del tabique nasal con eritema, hiperemia, prurito e inflamación, que se extienden hacia las mucosas causando perforación y destrucción total del tabique nasal (naríz de tapir) y desfiguración. Las lesiones no curan espontáneamente, la respuesta inmune celular está aumentada y existe resistencia frente a los tratamientos convencionales (Marsden, 1990; Goto y Lindoso, 2010).

La LCD es causada por la especie *L. pifanoi* en Venezuela, *L. amazonensis* en América del sur y *L. mexicana* en América central (Lainson y Shaw, 1998). Al igual que en la LMC, los parásitos se diseminan por vía hematogena o linfática. Clínicamente se caracteriza por la presencia de infiltraciones difusas en la piel y en el tejido celular subcutáneo que conlleva a la formación de ondulaciones, pápulas o nódulos eritematosos, múltiples, no ulcerados semejantes a lepromas. Se localizan frecuentemente en la cara, aunque en ocasiones pueden observarse en otras zonas del cuerpo del hospedero (tórax, brazos). Corresponde a la forma maligna o difusa de la Leishmaniasis y es la variante anérgica de la enfermedad, ya que existe una alteración del sistema inmunológico con ausencia de respuesta inmune celular en el hospedero. Nunca cura espontáneamente y se observa una marcada tendencia a las recidivas después del tratamiento (Pearson y Sousa, 1996).

La LV o Kala-azar es causada por las especies *L. donovani* y *L. infantum*. En este tipo de Leishmaniasis hay un intenso parasitismo en las células del sistema fagocítico

mononuclear (SFM) localizados en las vísceras, afectando principalmente al hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. El período de incubación es en promedio de 2 a 6 meses y la población más afectada corresponde a los menores de 10 años. Clínicamente el individuo manifiesta fiebre, pérdida de peso, pancitopenia, anemia, hepatoesplenomegalia e hipergammaglobulinemia. Cuando no es tratada a tiempo el índice de mortalidad es casi del 100% (Davies *et al.*, 2000; Singh, 2006).

1.5. Tratamiento

El tratamiento de la Leishmaniasis es complejo, por lo que se recomienda la utilización de múltiples esquemas terapéuticos contra las diversas formas clínicas de la enfermedad (Tracy y Webster, 2001). La quimioterapia convencional está basada en el uso de compuestos antimoniales pentavalentes como el antimonio de meglumine (Glucantime) y estiboglunato de sodio (Pentostam) que constituyen la primera línea de elección desde el año 1930, a pesar de conocer que son medicamentos altamente tóxicos que pueden ocasionar severos efectos colaterales como pancreatitis, neuropatías periféricas, hepato y cardiotoxicidad, mialgia, anemia y leucopenia (Olliaro *et al.*, 2005), aunado a otras desventajas como poca disponibilidad de estos medicamentos en el mercado, alto costo, inactividad por vía oral, períodos prolongados de administración y la resistencia que han desarrollado los kinetoplastidas (Sundar, 2001; Croft *et al.*, 2006). Cuando el tratamiento falla, se utilizan los medicamentos de segunda línea de elección: Pentamidina y Anfotericina B, los cuales son antibióticos y antifúngicos efectivos pero altamente tóxicos, mucho más costosos y pueden inducir reacciones adversas en un 20-50% de los casos

(Jhingran *et al.*, 2008). Sin embargo, la formulación de la Anfotericina B en su forma liposomal (Ambisome B) disminuye la toxicidad del fármaco, siendo utilizada en países del Mediterráneo con excelentes resultados, pero tiene el inconveniente de su altísimo costo para ser utilizada en los países en desarrollo (Herwaldt, 1999; Brendle *et al.*, 2002).

En la última década, para la Leishmaniasis visceral, se cuenta con una nueva droga sistémica conocida como Miltefosina (Ganguly, 2002). Es un alquilfosfolípido sintético inicialmente empleada como anticanceroso y la primera droga oral eficaz contra la LV que ha proporcionado un índice de curación cerca del 98%. Es utilizada exhaustivamente en la India apoyado por la OMS con mucho éxito en focos resistentes a los antimoniales pentavalentes a pesar de sus efectos teratogénicos (Sundar *et al.*, 2003; Monzote, 2009).

Por otro lado, a pesar de los numerosos intentos en el desarrollo de vacunas de primera, segunda y tercera generación, en la actualidad ninguna ha tenido 100% de eficacia, seguridad y aun están en fase de experimentación (Mayrink *et al.*, 1992; Engers *et al.*, 1996; Khalil *et al.*, 2000; Dunning, 2009).

En síntesis, es evidente y sorprendente que aún no existan terapias adecuadas ni vacunas realmente efectivas a pesar de todos los esfuerzos multidisciplinarios realizados en el mundo, probablemente aun falta por comprender muchos aspectos relacionados con la biología celular del parásito y dilucidar mecanismos claves asociados con la interacción parásito-hospedero. En vista de este panorama que representa un verdadero problema de salud pública, en el Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias de la ULA desde hace 13 años, se viene

investigando sobre los factores involucrados en la interacción de *L. mexicana* con los componentes del sistema fibrinolítico humano, con la finalidad de entender el rol fisiológico de esta interacción y aportar a futuro conocimientos útiles que permitan diseñar estrategias efectivas para el control de la Leishmaniasis.

2. Sistema Fibrinolítico

En el humano, el sistema fibrinolítico, conocido también como sistema plasminógeno/plasmina, es una cascada enzimática involucrada principalmente en la disolución de los coágulos de fibrina (fibrinólisis), aunque también desempeña otras funciones importantes en los mecanismos de remodelaje tisular y migración celular implicados en procesos fisiológicos como embriogénesis, angiogénesis, cicatrización, reclutamiento de macrófagos, procesamiento de prohormonas, y procesos patológicos como la diseminación de células tumorales y metástasis (Castellino, 1981; Plow *et al.*, 1995). Uno de los componentes del sistema fibrinolítico es un zimógeno plasmático conocido como plasminógeno y su producto activo, la enzima proteolítica plasmina. Otros componentes de este sistema son los activadores del plasminógeno, los inhibidores de la plasmina, los inhibidores de los activadores del plasminógeno, el fibrinógeno y la fibrina (Collen y Lijnen, 1991; Ploplis y Castellino, 2000).

2.1. Plasminógeno

El plasminógeno es una glicoproteína monocatenaria, constituida por 791 aminoácidos, 2% de carbohidratos y una masa molecular de 92 kDa (Wiman y Wallen, 1975). El plasminógeno es sintetizado principalmente por el hígado como la proenzima o zimógeno (forma inactiva) de una serín proteasa (plasmina) (Castellino y

Ploplis, 2005) y circula en el plasma sanguíneo a una concentración de 1.5-2 μM con una vida media aproximada de 2 días (Ponting *et al.*, 1992). El plasminógeno es una molécula que posee en la región aminoterminal un péptido de preactivación de 77 residuos de aminoácidos, seguido por 5 dominios de secuencias homólogas en forma de bucle, denominados *kringles*, (Forsgren *et al.*, 1987) localizados entre Lys⁷⁸ y Arg⁵⁶⁰ en la cadena pesada, fusionados con la cadena liviana que corresponde a un dominio catalítico en la región carboxiloterminal compuesto por una triada (His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ y Ser⁷⁴¹) de serín proteasas (Ponting *et al.*, 1992; Law *et al.*, 2012) (Figura 3).

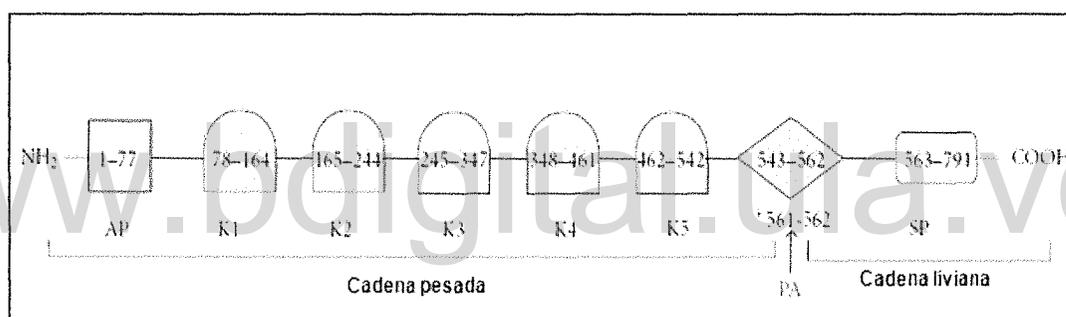


Figura 3. Esquema modular de la estructura del plasminógeno. Tomado de Bhattacharya *et al.*, 2012. AP: péptido activación, PA: corte proteolítico mediado por los activadores del plasminógeno, SP: dominio serínproteasa en el extremo carboxiloterminal.

Los dominios *kringles* son secuencias de 80 a 90 aminoácidos cada uno, de aproximadamente 10 kDa, estabilizados por 3 puentes disulfuro (Angles-Cano, 1994; Chandler, 1996). Estos dominios son muy importantes en la estructura del plasminógeno ya que poseen los sitios de unión a lisina (LBS) que median la interacción del plasminógeno con sus sustratos, inhibidores, proteínas bacterianas y receptores en la superficie celular (Hajjar *et al.*, 1986; Miles y Plow, 1991). Los LBS

consisten en una depresión hidrofóbica, formada por residuos aromáticos (Trp⁶², Phe⁶⁴ y Trp⁷²) y un dipolo iónico con los sitios aniónico y catiónico en extremos opuestos a la depresión, la cual interacciona con la región alifática del ligando (grupos metileno), y los centros aniónicos (Asp⁵⁵/Asp⁵⁷) y catiónicos (Lys³⁵/Arg⁷¹ o Arg³⁴/Arg⁷¹) interaccionan con los grupos cargados epsilon amino y carboxilato, respectivamente (Collen y Lijnen, 1991). Los LBS que carezcan de uno o ambos residuos del centro aniónico pueden unirse a ligandos de lisinas no carboxiloterminales como los amino-hexyl (AH) o sitios AH (Henkin *et al.*, 1991).

El plasminógeno posee cinco dominios *kringles* (K1, K2, K3, K4 y K5), los cuales presentan diferentes afinidades por sus ligandos; todos reconocen ligandos tipo lisina excepto el K3. Sin embargo, K1, K2 y K4 tienen afinidad solo por lisinas carboxiloterminales, teniendo K1 y K4 mayor afinidad que K2; K5 posee afinidad tanto por motivos de lisinas internas como por lisinas carboxiloterminales. K3 es el único *kringle* que no posee afinidad por lisinas aparentemente por la pérdida de esa función (Castellino, 1990; Chang *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1999; Burgin y Schaller, 1999).

En relación a las diferentes formas del plasminógeno, se han aislado cuatro formas en el plasma humano basado en la variación del extremo aminoterminal y en el grado de glicosilación. Una de esas constituye la forma nativa del plasminógeno conocida como Glu-plasminógeno, que posee una secuencia de 67 aminoácidos, encontrándose ácido glutámico en el extremo aminoterminal. Este péptido puede ser eliminado de la molécula nativa por acción de la plasmina dando origen a la forma Lys-plasminógeno, la cual posee lisina en el extremo aminoterminal (Wallen y

Wiman, 1972). Al comparar el Glu-plasminógeno con el Lys-plasminógeno, se encontró que este último tiene mayor afinidad por la fibrina, puede ser activado 10 o 20 veces más rápido por los activadores del plasminógeno y además tiene de 2 a 3 veces mayor afinidad por los receptores celulares (Markus *et al.*, 1979; Bachmann, 1987; Miles *et al.*, 2003). Lys-plasminógeno, normalmente no circula en el plasma, sin embargo, ha sido identificado en las superficies celulares (Holvoet *et al.*, 1985; Hajjar, 2003). Adicionalmente, según el patrón de glicosilación, el plasminógeno puede ser dividido en plasminógeno tipo 1, que posee dos sitios de glicosilación en Thr³⁴⁶-Asn²⁸⁹ en el *kringle* 3 y el plasminógeno tipo 2, que tiene solamente un sitio de glicosilación en Thr³⁴⁶ en la región inter-*kringle* 3-4 (Henkin *et al.*, 1991).

2.2. Fibrinólisis

En condiciones fisiológicas, el plasminógeno es activado por dos activadores: el t-PA (activador de plasminógeno tisular) y la urokinasa o u-PA (activador de plasminógeno tipo urokinasa). Ambos activadores catalizan el corte proteolítico del enlace peptídico entre los residuos Arg⁵⁶¹ y Val⁵⁶², dividiendo a la molécula en dos fragmentos, una cadena pesada constituida por 561 aminoácidos que va desde el extremo aminoterminal hasta el residuo Arg⁵⁶¹ y una cadena liviana formada por 230 aminoácidos que inicia desde la Val⁵⁶² hasta el extremo carboxiloterminal; ambas cadenas quedan unidas mediante dos puentes disulfuros y esa nueva conformación de la molécula expone la triada catalítica formada por los residuos His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ y Ser⁷⁴¹ (Castellino y Poplis, 2005). Una vez activado el plasminógeno se forma un complejo trimolecular en el cual la actividad catalítica del t-PA es estimulada permitiendo la

generación de plasmina directamente en la superficie de la fibrina para iniciar el proceso de degradación de la misma, digiriéndola en pequeños péptidos (FDP) hasta su disolución completa (Figura 4). El plasminógeno puede además degradar otras proteínas como fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicanos y activar pro-metaloproteasas, las cuales están asociadas con la degradación de los componentes de la matriz extracelular que promueven la remodelación y migración celular (Collen, 2001).

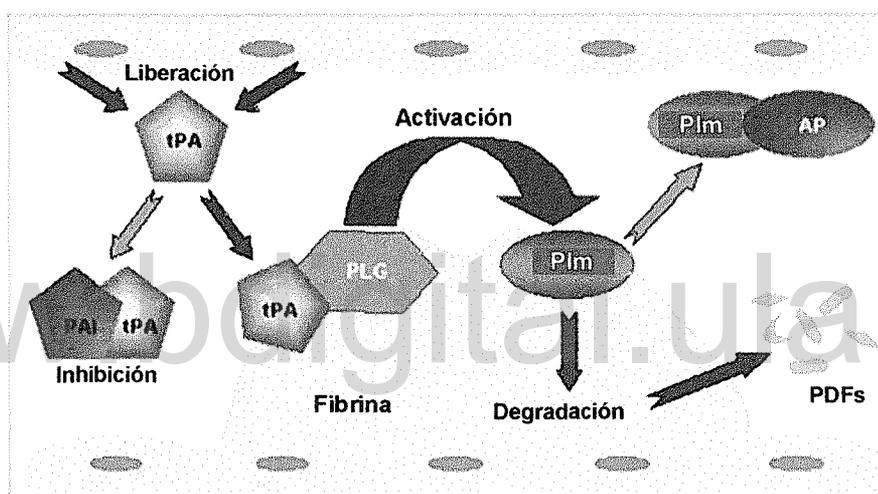


Figura 4. Proceso de Fibrinólisis. Tomado de Smith y Marshall, 2010. **PLG:** plasminógeno, **Plm:** plasmina, **AP:** α_2 -antiplasmina, **t-PA:** activador tisular del plasminógeno, **PAI:** inhibidores de los activadores del plasminógeno, **PDFs:** producto de degradación de la fibrina.

2.3. Regulación del sistema plasminógeno/plasmina

En condiciones fisiológicas, la conversión del plasminógeno a plasmina, es regulada a nivel de los activadores del plasminógeno por los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs). Adicionalmente, la inhibición de la plasmina es mediada por la α_2 -antiplasmina y α_2 -macroglobulina cuando es liberada a la circulación, evitando así la proteólisis no regulada de la plasmina sobre otras

proteínas del plasma (Angles-Cano, 1994; Plow *et al.*, 1995). La mayoría de los inhibidores del sistema plasminógeno/plasmina pertenecen a la superfamilia de las serpinas, proteínas que se caracterizan por participar en la regulación de las cascadas de activación del complemento, la coagulación y fibrinólisis (Rawlings *et al.*, 2004). En la Figura 5 se muestran los principales componentes del sistema plasminógeno/plasmina y las proteínas que lo regulan.

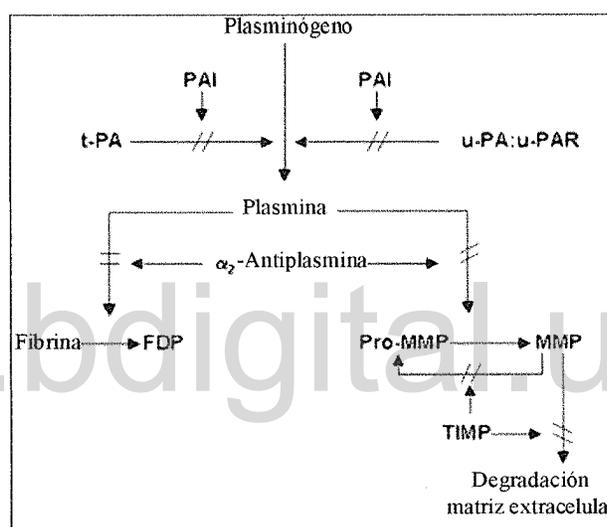


Figura 5. Sistema plasminógeno/plasmina. Tomado de Collen, 2001. **tPA**; activador tisular del plasminógeno, **PAI**: inhibidores de los activadores del plasminógeno, **FDP**: producto de degradación de la fibrina, **Pro-MMP**: pro-metaloproteasas, **MMP**: metaloproteasas, **TIMP**: inhibidores tisulares de metaloproteasas.

Además de todas las funciones mencionadas anteriormente que desempeña el sistema fibrinolítico, también se ha demostrado que numerosos organismos patógenos (bacterias, hongos, virus y parásitos) han desarrollado diferentes estrategias que le permiten interactuar con este sistema, utilizándolo en el proceso de invasión y diseminación en el hospedador.

2.4. Interacción de Organismos Patógenos con el Sistema Fibrinolítico

La interacción de un organismo patógeno con el sistema fibrinolítico fue documentado por primera vez por Tillet y Garner en 1933, quienes encontraron en cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de humanos una fibrinolisina (estreptoquinasa), que tenía la capacidad de activar el plasminógeno e inducir la lisis de los coágulos de fibrina. Posteriormente, Sun *et al.*, 2004 fueron los que realmente demostraron que los organismos patógenos utilizan el sistema fibrinolítico como mecanismo de invasión al hospedador, al evidenciar una alta mortalidad en ratones transgénicos (humanizados) infectados con cepas de *Streptococcus* grupo A y G, debido a que la estreptoquinasa de *Streptococcus* aislada de humanos es específica y sólo tiene afinidad para el plasminógeno humano.

Años más tarde, diversas investigaciones han permitido demostrar que además de los organismos procariotas (bacterias), una gran variedad de organismos eucariotas (hongos, protozoarios y nemátodos) también utilizan el sistema fibrinolítico, considerándose esto como un posible evento universal en patógenos utilizado como mecanismo de invasión, diseminación y establecimiento en el hospedador (Sun, 2006).

En relación a la interacción del sistema fibrinolítico con las bacterias invasivas como *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia pestis*, se ha corroborado que estas incrementan su virulencia por la capacidad de convertir el plasminógeno en plasmina mediado por sus propios activadores (estreptoquinasa, estafiloquinasa, proteína Pla, respectivamente). Adicionalmente, se ha descrito en *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae y *Haemophylus influenzae*, la presencia de receptores celulares en la superficie que interactúan con el plasminógeno y cuya activación es llevada a cabo por los activadores del hospedador (t-PA y u-PA). Recientemente, Toledo *et al.*, 2012 señalaron que el plasminógeno también es capaz de interactuar con los productos secretados por organismos bacterianos.

En resumen, todos estos mecanismos inducen la activación del plasminógeno y por ende, la generación de plasmina, convirtiendo al patógeno en un organismo proteolítico que le confiere diversas ventajas: (i) secuestrar y exponer la plasmina en su superficie impidiendo la inhibición de esta proteasa por la α 2-antiplasmina y α 2-macroglobulina, (ii) escapar fácilmente de la red de fibrina depositada por el hospedador para detener la infección, (iii) degradar los componentes del complemento e inmunoglobulinas, (iv) tomar nutrientes de los tejidos del hospedador, (v) degradar directamente proteínas de la matriz extracelular y de la membrana del basamento a través de la activación de las metaloproteasas, facilitando así la diseminación y su establecimiento en el hospedador. En la Tabla I se detallan algunas interacciones entre bacterias y el plasminógeno humano.

En la última década, numerosas evidencias experimentales han permitido documentar que los parásitos, tanto protozoarios como helmintos también interactúan con el sistema fibrinolítico, específicamente con el plasminógeno. Se ha demostrado que la interacción es mediada a través de receptores que se encuentran en la superficie celular de los parásitos, entre los cuales se incluyen los protozoarios *L. mexicana* (Avilán *et al.*, 2000; Calcagno *et al.*, 2002), *T. cruzi* (Almeida *et al.*,

2004; Rojas *et al.*, 2008), *Trichomonas vaginalis* (Mundodi *et al.*, 2008), *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium berghei* (Ghosh *et al.*, 2011) y los helmintos, *Schistosoma bovis* (Ramajo-Hernández *et al.*, 2007, de la Torre-Escudero *et al.*, 2010), *Onchocerca volvulus* (Jolodar *et al.*, 2003) y *Dirofilaria immitis* (González-Miguel *et al.*, 2012; González-Miguel *et al.*, 2013).

Tabla I. Ejemplos de bacterias que interactúan con el sistema plasminógeno/plasmina. Tabla modificada de Sun, 2006.

Bacterias	Interacción con el plasminógeno	Función
<i>S. pyogenes</i>	Activación	Incrementa la virulencia
<i>S. aureus</i>	Activación	-----
<i>S. pyogenes</i>	Unión	Incremento de la virulencia/Adhesión a uPar/antifagocitosis
<i>Y. pestis</i>	Activación	Incrementa la virulencia
<i>B. burgdorferi</i>	Unión	Acelera la formación de plasmina por t-PA y u-PA
<i>A. hydrophilla</i>	Unión	Estimula la formación de plasmina por t-PA
<i>E. coli</i>	Unión	Incremento de la formación de plasmina por t-PA y u-PA
<i>H. influenzae</i>	Unión	Estimula la formación de plasmina por t-PA

Asimismo, los patógenos pueden interactuar con el plasminógeno mediante moléculas proteicas secretadas al medio extracelular, tal es el caso del nemátodo *D. immitis* (González-Miguel *et al.*, 2012) y los tremátodos *Fasciola hepatica* (Bernal *et al.*, 2004), *Echinostoma caproni* (Marcilla *et al.*, 2007) y *Clonorchis sinensis* (Wang

et al., 2012). En la Tabla II se muestran algunas interacciones entre los parásitos y el plasminógeno.

Tabla II. Ejemplos de parásitos que interactúan con el sistema plasminógeno/plasmina.

Parásitos	Receptores	Interacción con el plasminógeno
<i>L. mexicana</i>	Enolasa/LACK	Unión
<i>P. falciparum</i>	Enolasa	Unión
<i>T. vaginalis</i>	Enolasa/GAPDH	Unión
<i>O. volvulus</i>	Enolasa/GAPDH	Unión
<i>S. bovis</i>	Enolasa/GAPDH/fructosa -1,6-bifosfato aldolasa	Unión
<i>D. immitis</i>	Enolasa/GAPDH/fructosa -1,6-bifosfato aldolasa	Unión
<i>F. hepática</i>	Enolasa/GAPDH	Unión

La fijación del plasminógeno en la superficie celular o a través de las moléculas secretadas por los parásitos, facilita su conversión en plasmina al secuestrar los activadores del hospedador, adquiriendo así la actividad proteasa. En diversos estudios, ha sido demostrado un incremento de la activación del plasminógeno por t-PA en ensayos de unión a plasminógeno en *L. mexicana*, *T. cruzi* y en proteínas obtenidas del extracto del tegumento de *S. bovis* (Avilán *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2004; Ramajo-Hernández *et al.*, 2007). Por otra parte, hallazgos interesantes fueron revelados por Ramajo-Hernández *et al.*, 2006 quienes evidenciaron mediante ensayos

de ELISA la generación de plasmina al incubar las proteínas de excreción/secreción del tegumento de *S. bovis* con el plasminógeno, sugiriendo la presencia de activadores endógenos de plasminógeno. Mitra *et al.*, 1995 dilucidaron a través de zimogramas y análisis de lisis de coágulos de fibrina, la presencia de una serín proteasa expresada constitutivamente en el secretoma de *Acanthamoeba castellanii* que tiene la capacidad de activar el plasminógeno.

En consecuencia, todas las evidencias descritas anteriormente sobre la interacción del sistema fibrinolítico con los parásitos, sugieren que también lo utilizan como una estrategia adicional que les permite degradar fibrina y componentes de la matriz extracelular, migrar y atravesar barreras tisulares, infectar células y evitar la formación de coágulos. Por lo tanto, se sugiere que los receptores de plasminógeno presentes en la superficie celular o las moléculas secretadas podrían constituir factores de virulencia que están asociados al proceso de invasión, diseminación y establecimiento de los parásitos en el hospedador.

En el caso de *Leishmania* spp., a pesar de las diversas estrategias que se han propuesto para explicar parcialmente el éxito de la infección de estos parásitos, no se han dilucidado los mecanismos mediante los cuales atraviesan el tejido del hospedero para establecer la infección e inclusive se desconoce cómo algunas especies, entre ellas *L. infantum*, logran invadir y diseminarse hacia órganos vitales como hígado, bazo y médula ósea. Chang *et al.* 1990, señalan que los parásitos del género *Leishmania* interactúan con diversos factores plasmáticos, siendo los constituyentes del sistema de complemento y del sistema fibrinolítico los más importantes para la fase de reconocimiento, fagocitosis por el macrófago e invasión del hospedero. En

ese sentido, desde hace más de una década se han realizado estudios en *L. mexicana*, agente causal de la Leishmaniasis cutánea, con la finalidad de dilucidar si este microorganismo al igual que otros patógenos también utiliza el sistema Plasminógeno/Plasmina como un mecanismo de invasión y diseminación en el hospedador.

2.5. Interacción *Leishmania*/Plasminógeno

Avilán *et al.*, 2000 encontraron que los promastigotes de *L. mexicana* tienen la capacidad de unir tanto plasminógeno como plasmina, con constantes de disociación (K_d) de 2,40 μM y 1,2 μM respectivamente, resultando ambas concentraciones dentro de los rangos de relevancia fisiológica. La unión fue inhibida por el ácido epsilon-aminocaproico (ϵ -ACA), sugiriendo que en la interacción están involucrados residuos de lisina. Adicionalmente, señalaron que los activadores del plasminógeno (t-PA, uroquinasa y estreptoquinasa) fueron capaces de inducir una mayor actividad enzimática asociada al promastigote. Estos hallazgos permitieron demostrar que los promastigotes de *L. mexicana* interaccionan con los componentes del sistema fibrinolítico y probablemente podría constituir una estrategia que está asociada con la virulencia del parásito. Con la finalidad de corroborar los resultados antes descritos, se realizaron otras investigaciones complementarias, entre ellas, Calcagno *et al.*, 2002, señalaron diferencias en la capacidad de unión del plasminógeno entre los morfotipos presentes en cultivos axénicos de *L. mexicana*; las formas redondeadas (amastigotes) unen más plasminógeno que las formas alargadas. También se evidenció que los promastigotes sometidos a choque térmico y en fase estacionaria tienen mayor capacidad de unión al plasminógeno humano. Asimismo, con la

finalidad de dilucidar la posible función de la interacción de *Leishmania* con el plasminógeno, se evaluó el desarrollo de lesiones cutáneas producidas por *L. mexicana* en ratones deficientes de plasminógeno (plg^{-/-}) y silvestres (plg^{+/+}) (Maldonado *et al.*, 2006); encontrando que el tamaño de la lesión fue mayor en los ratones machos (plg^{+/+}) que en los (plg^{-/-}). Además se observó que los parásitos se limitaron en focos aislados en las lesiones de los ratones (plg^{-/-}), en contraste, con un patrón disperso sobre todo el infiltrado observado en las lesiones de los ratones (plg^{+/+}). Estos resultados *in vivo*, permitieron corroborar que los parásitos tienen menor capacidad de infectar a los ratones deficientes de plasminógeno, lo que sugiere que el plasminógeno podría desempeñar un rol fundamental en el desarrollo de la lesión.

Adicionalmente, en la búsqueda de las proteínas receptoras involucradas en la interacción de *L. mexicana*/plasminógeno, Vanegas *et al.*, 2007 identificaron una α -enolasa localizada en la membrana externa que funciona como receptor de plasminógeno y que contribuye *in vitro* con un 60% en la interacción *Leishmania*-Plasminógeno. Posteriormente, Gómez-Arreaza *et al.*, 2011 identificaron también en *L. mexicana* otra proteína LACK, localizada tanto en el citosol como en la membrana externa, involucrada en la unión, contribuyendo en un 10% de la interacción y aumento de la activación del plasminógeno *in vivo* que podría estar relacionado con la invasión del parásito. Asimismo, Arraiz, 2011 y Barros, 2011, demostraron en *T. cruzi* (organismo filogenéticamente cercano a *Leishmania* spp.) que la enolasa es el principal receptor de plasminógeno tanto en las formas epimastigotes y tripomastigotes, contribuyendo en un 90% de la unión.

2.6. Receptores de plasminógeno

La interacción del sistema plasminógeno/plasmina con diferentes tipos de células fue demostrada por primera vez en 1985 por Miles y Plow, quienes encontraron que las plaquetas tenían la capacidad de unir y activar plasminógeno en su superficie. Los receptores de plasminógeno están ampliamente distribuidos tanto en las células procariotas como en las células eucariotas, destacando su importancia en la regulación positiva de la activación del plasminógeno y en los procesos fisiopatológicos en los que participa el sistema plasminógeno/plasmina. Entre los tipos celulares capaces de unir plasminógeno en mamíferos se encuentran: monocitos, linfocitos, fibroblastos, macrófagos, plaquetas, células endoteliales, células adrenales, células medulares y células tumorales (Miles *et al.*, 2005).

La capacidad de unión al plasminógeno en las células de mamíferos es muy alta, se han medido desde 37.000 sitios de unión por plaqueta hasta 10^7 sitios de unión por célula endotelial. La unión es mediada tanto por receptores proteicos como no proteicos presentes en la superficie celular (Miles *et al.*, 1986). En general, los receptores celulares presentan las siguientes características: una baja afinidad por el plasminógeno ($1\mu\text{M}$), lo cual es esencial para localizar la actividad de la plasmina y limitar la proteólisis excesiva; su distribución es ubicua; los receptores están presentes en alta densidad en un rango de 10^6 a 10^7 sitios de unión por célula; son inhibidos por la lisina, análogos de la lisina como el ácido ϵ -ACA y por péptidos con lisinas en el extremo carboxilterminal, que efectivamente bloquean la interacción del plasminógeno con las superficies celulares, indicando un mecanismo de unión común que involucra los LBS de los dominios *kringles* del plasminógeno.

Según Miles *et al.*, 2005, los receptores de plasminógeno pueden clasificarse en cuatro grandes grupos:

a) Los receptores que son sintetizados con lisinas en su extremo carboxiloterminial y capaces de aumentar la activación del plasminógeno unido a ellos. Tal es el caso de la α -enolasa humana, la proteína TIP49a, p11 humana y GAPDH bacteriana.

b) Los receptores que no son sintetizados con lisinas en su extremo carboxilo terminal pero que sufren modificaciones post-traduccionales capaces de generarlos y que también aumentan la probabilidad de activación del plasminógeno unido a ellos. Ejemplo de estos receptores lo constituyen la anexina II y actina en células endoteliales.

c) Los receptores que poseen motivos de unión con lisinas internas o en los extremos aminoterminales con capacidad para aumentar la activación del plasminógeno unido. Dentro de estos receptores se incluyen las integrinas α IIb β 3 en plaquetas y α M β 2 en neutrófilos, anfoterina y GP330 en mamíferos. En bacterias, la proteína de superficie tipo M de *Streptococcus* del grupo A (PAM) posee los motivos **a1**: ⁶²DAELQRLKNERHE⁷⁴ y **a2**: ⁷⁵EAELERLKSE⁸⁴, resaltando que los aminoácidos señalados en negritas son claves para la interacción con el plasminógeno (Wistedt *et al.*, 1995). Adicionalmente, en este grupo de receptores se encuentra un motivo interno de unión a plasminógeno de 9 aminoácidos de la enolasa ²⁴⁸FYDKERKQVY²⁵⁶, caracterizado primero en *S. pneumoniae*, el cual posteriormente fue identificado en la α -enolasa humana, en *L. mexicana* y en muchos otros

organismos como *S. pyogenes*, *C. albicans*, *A. hydrophila*, *O. volvulus*, *F. hepática* y *P. carinii* (Ghandi *et al.*, 2008).

d) Los receptores que no poseen lisinas en sus motivos de unión y que no aumentan la capacidad de activación del plasminógeno unido. A éste grupo pertenecen algunas proteínas de superficie como el factor tisular y moléculas no proteicas como los gangliósidos.

3. Enolasa

Enolasa es una metaloenzima que cataliza la conversión reversible del 2-fosfo-D-glicerato (2-PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP), en dos vías metabólicas claves: glicólisis y gluconeogénesis, importantes para el funcionamiento celular de muchos organismos (Pancholi, 2001). Es una proteína que está altamente conservada en todos los dominios de la vida (Archea, Bacteria y Eukarya), especialmente los aminoácidos que forman parte del sitio activo (Hannaert *et al.*, 2003). La familia de las enolasas está compuesta por 3 isoenzimas: alfa (α), beta (β) y gama (γ), que son específicas de diferentes tipos celulares. En los vertebrados, la α -enolasa se encuentra en una gran variedad de tejidos incluyendo el hígado, la β -enolasa está localizada exclusivamente en los tejidos musculares y la γ -enolasa en el tejido neuronal y neuroendocrino (Marangos *et al.*, 1978).

La enolasa está localizada principalmente en el citosol y posteriormente se encontró en la superficie de la membrana de diversas células en mamíferos y además en la superficie celular de numerosos microorganismos procariotas y eucariotas (Miles *et al.*, 1991, Pancholi y Fischetti, 1998). En la mayoría de los organismos

eucariotas, la enolasa presenta una estructura cuaternaria homodimérica en la cual cada monómero tiene un peso molecular entre 45 a 47 kDa (Wold, 1971), a diferencia de algunos organismos procariotas (*Bacillus subtilis*, *S. pneumoniae*), en los cuales la enolasa posee una estructura cuaternaria octamérica (Brown *et al.*, 1998, Ehinger *et al.*, 2004).

La enolasa clásicamente desempeña un papel metabólico, sin embargo, se ha demostrado tanto en organismos eucariotas como procariotas, que posee una enorme plasticidad y desempeña múltiples funciones diferentes a las clásicas, por lo que es considerada una proteína “moonlighting” (Jeffery, 1999). Estas funciones son reveladas cuando la enolasa se encuentra en otras localizaciones celulares diferentes de donde ejerce generalmente su función primaria. Entre las diversas funciones no glicolíticas se incluyen: constituir el principal componente estructural del cristalino de los vertebrados, en los cuales se encuentra como un monómero inactivo (Wistow y Piatigorsky, 1987), participar en la regulación transcripcional de genes asociados con la transformación morfológica y proliferación celular en el núcleo de las células en mamíferos (Kim y Dang, 2005). Su expresión es inducida en condiciones de hipoxia y estrés térmico actuando como una proteína de choque térmico (Aaronson *et al.*, 1995) y en bacterias, la α -enolasa forma parte del degradosoma de *E. coli*, participando en la regulación de la estabilidad del ARNm (Kaberdin y Lin-Chao, 2009).

Por otra parte, se ha descrito que la enolasa es expresada en la superficie celular como un receptor de plasminógeno en muchas células de mamíferos (epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas, tumorales), así como en numerosos organismos

patógenos procariotas (*S. pneumoniae*, *B. burgdorferi*, *Y. pestis*) y eucariotas (*C. albicans*, *T. vaginalis*, *S. bovis*, *P. falciparum*, *L. mexicana* y *T. cruzi*) (Nakajima *et al.*, 1994, Redlitz *et al.*, 1995, Jolodar *et al.*, 2003, Vanegas *et al.*, 2007), utilizado como una estrategia clave para la migración celular, invasión de los tejidos y diseminación de los patógenos en el hospedero (Boyle y Lottenberg, 1997, Lahteenmaki *et al.*, 2005). Adicionalmente, enolasa es secretada por diversas bacterias patógenas (*S. pyogenes*, *S. mutans* y *Lactobacillus crispatus*) y parásitos (*Eimeria tenella*, *F. hepática*, *E. caproni*, *Giardia intestinalis*, y *S. japonicum*). En los parásitos tripanosomatidios, se ha encontrado enolasa formando parte del secretoma/exosoma de *L. donovani*, *L. major* y *L. braziliensis* (Silverman *et al.*, 2008; Cuervo *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2010) y del secretoma de *T. brucei* (Geiger *et al.*, 2010).

El K_d de interacción de enolasa con el sistema plasminógeno-plasmina, se encuentra dentro del rango de la concentración fisiológica de plasminógeno para el humano (2 μM). La enolasa recombinante de *L. mexicana* ha reportado un K_d para la interacción con el plasminógeno humano de 0,5 μM (Vanegas *et al.*, 2007), cuya interacción es mediada a través de residuos de lisina, debido a que es inhibida por el ácido ϵ -aminocaproico. La interacción se establece a través de residuos de lisina presentes en motivos internos, similar a algunas enolasas de otros microorganismos, no como típicamente se ha descrito que las proteínas de unión a plasminógeno tienen residuos de lisina en el extremo carboxiloterminales, que les confieren la capacidad de interactuar con el sistema fibrinolítico, como por ejemplo la enolasa de humanos (Andronicos *et al.*, 1997).

Adicionalmente, mediante análisis proteómicos se aportan varias evidencias soportando que la enolasa forma un complejo multiproteico en el citosol de *T. cruzi* (Domingo-Sananes, 2004). Primeramente, se logró determinar mediante diferentes técnicas que enolasa en el citosol de *T. cruzi* co-purifica e interactúa con al menos 5 proteínas (p45, p57, p61, p64 y p75), cuyos nombres fueron asignados de acuerdo a los pesos moleculares determinados para cada proteína, las cuales tienen múltiples comportamientos bajo diferentes condiciones fisicoquímicas en los distintos pasos de purificación y ensayos de interacción proteína-proteína, y que de alguna manera modulan la actividad enolasa. Esta última afirmación fue sugerida debido a que la enolasa mostró mayor actividad en fracciones donde se encontraba libre de las proteínas que co-purifican con ella y también porque en los experimentos de cromatografía de filtración, la forma más activa (sentido glicolítico) de la enolasa es posiblemente un dímero, o un dímero asociado a alguna de las proteínas presentes en las fracciones.

Cabe destacar que la enolasa es una proteína que tiene una ubicación dual, es decir que se encuentra tanto en el citosol como en la superficie de la membrana plasmática, sin embargo, aun no se le conoce ningún péptido señal o secuencia de importación que podría explicar su localización en la membrana, no contiene ninguna señal GPI en el extremo carboxilterminal y tampoco ha sido dilucidada ninguna secuencia para palmitoilación y miristoilación en el extremo aminoterminal que son esenciales para el anclaje en la membrana. En ese sentido, se ha sugerido en el caso de *S. pneumoniae* que una vez que la enolasa es secretada, es reasociada nuevamente a la membrana a través de moléculas no identificadas (Bergmann *et al.*, 2001). En

parásitos del género *Leishmania*, se ha especulado que enolasa después de su secreción a través de los exosomas podría quedar unida a la membrana (Avilán *et al.*, 2011).

En síntesis, en *L. mexicana*, enolasa ha sido descrita como la proteína más importante que interacciona con el sistema plasminógeno/plasmina (Vanegas *et al.*, 2007) y considerada como un factor de virulencia potencial asociada en la relación parásito-hospedador.

4. LACK

LACK es una proteína de *Leishmania* de 36 kDa homóloga a un receptor intracelular de proteína quinasa C (PKC) activada, conocido como RACK1 en vertebrados. Está presente en todos los organismos eucariotas, se caracteriza por contener 7 repeticiones internas de Trp-Asp (WD 40), por lo que pertenece a la familia WD40 especializada en interacciones proteína-proteína. Además de participar en importantes procesos de transducción de señales, también está asociada con el control del ciclo celular y procesamiento de ARN (Neer *et al.*, 1994).

La función molecular de LACK en *Leishmania* spp no está clara, sin embargo, ha sido reportado que constituye una proteína esencial para la viabilidad y establecimiento de los parásitos en el hospedero (Kelly *et al.*, 2003). Se ha estudiado con mucho énfasis la respuesta inmunológica inducida por la proteína LACK, ya que constituye un antígeno inmunodominante en parásitos del género *Leishmania* (Mougneau *et al.*, 1995) y desde hace varios años está siendo utilizada en el intento de desarrollo de una vacuna contra la Leishmaniasis cutánea y visceral, obteniéndose

resultados prometedores en modelos murinos (Gurunathan *et al.*, 1997, Gonzalo *et al.*, 2001, De Oliveira Gomes *et al.*, 2012, Hezarjaribi *et al.*, 2013). En *L. mexicana*, Gómez-Arreaza *et al.*, 2011 demostraron que LACK es capaz de interactuar con el plasminógeno humano con una constante de disociación de 1,2 μM ; se logró evidenciar su presencia tanto en el citoplasma como en la cara externa de la membrana plasmática de los parásitos, lo que sugiere que podría desempeñar una función adicional, actuando posiblemente como un receptor de plasminógeno. Aunque la secuencia de LACK en *L. mexicana* AZV no posee lisina en el extremo carboxiloterminial, se encontraron tres posibles motivos internos de unión al plasminógeno similares al reportado por Bergmann *et al.*, 2001 en *S. pneumoniae*.

Silverman *et al.*, 2008, Cuervo *et al.* 2009, Silverman *et al.*, 2010 y Hassani *et al.* 2011 demostraron que los receptores de plasminógeno (enolasa y LACK) presentes en *L. mexicana* también forman parte del secretoma y de los exosomas de diferentes especies de *Leishmania*, de tal manera que por primera vez se descubre que el principal mecanismo de secreción (50% de las proteínas secretadas) en *Leishmania* spp. es mediado por una vía no convencional a través de los exosomas.

En tripanosomatidios, el término “secretoma” fue introducido por primera vez por Silverman *et al.*, 2008, en un análisis proteómico realizado para identificar un gran número de proteínas extracelulares encontradas en el medio condicionado de *L. donovani*, definiendo el “secretoma” como el conjunto de proteínas extracelulares secretadas o liberadas activamente de la célula por la vía clásica o no clásica de secreción y/o a través de exosomas. En el secretoma se encuentran diversas clases de moléculas: citoquinas, enzimas, hormonas, anticuerpos, proteasas, toxinas y péptidos,

entre las cuales se incluyen mediadores claves asociados con la interacción parásito-hospedador que constituyen factores de virulencia y están involucrados en diversos procesos biológicos como adhesión celular, migración celular, comunicación celular, inmunosupresión, sobrevivencia intracelular, señalización intercelular y evasión de la respuesta inmune.

5. Exosomas

Los exosomas son microvesículas de origen endocítico que miden entre 30-100 nm, presentan una morfología típicamente homogénea y particular en forma de copa, están limitados por una bicapa lipídica y poseen una densidad de flotación entre 1.1-1.9 g/mL en un gradiente de sacarosa (Mathivanan y Simpson, 2010). Son secretados por una gran variedad de células en mamíferos: células dendríticas, linfocitos B y T, células mastoides, células epiteliales, células endoteliales, células neuronales, reticulocitos y una gran variedad de células tumorales (Wubbolts *et al.*, 2003; Bhatnagar *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Adicionalmente, los exosomas han sido aislados y caracterizados en diversos fluidos biológicos: plasma sanguíneo, orina, saliva, semen, leche materna, líquido amniótico, fluido cerebroespinal y bronquial, entre otros, tanto en condiciones de salud como de enfermedad, emergiendo como herramientas promisorias en el diagnóstico clínico para ser usados como biomarcadores y potencialmente como nuevas estrategias terapéuticas (Simpson *et al.*, 2008)

5.1. Biogénesis de los exosomas

El análisis proteico de los exosomas indica que estos no contienen proteínas del núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático o aparato de Golgi. Todas las proteínas que se han identificado proceden del citosol, de compartimientos endocíticos o de la membrana plasmática (van Niel *et al.*, 2006). Las evidencias demostradas avalan la hipótesis del origen endosómico de los exosomas (Vlassov *et al.*, 2012). Las vesículas endocíticas se forman por endocitosis mediada por clatrina o no en la membrana plasmática, luego son transportadas a los endosomas tempranos, los cuales se desarrollan y se transforman en endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares donde ocurre una invaginación de la membrana hacia el interior del lumen endosomal conllevando a la formación de las vesículas intraluminales o exosomas, los cuales van a mantener la misma orientación topológica a la célula de origen (Scita y Di Fiore, 2010). Los cuerpos multivesiculares pueden potencialmente tener diferentes destinos y funciones, degradación lisosomal, servir como compartimientos de almacenamiento temporal (como en el caso de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II) o fusionarse con la membrana plasmática conduciendo a la liberación de las vesículas intraluminales o exosomas al medio extracelular (Keller *et al.*, 2006).

Actualmente, se desconocen los mecanismos moleculares implicados en la distribución de las proteínas y lípidos durante la biogénesis de los exosomas, sin embargo, se ha sugerido que en el proceso de formación de las vesículas intraluminales participa la maquinaria del complejo de distribución endosomal

requerida para el transporte (ESCRT), la cual consiste en un complejo multiproteico formado por proteínas solubles: ESCRT I, II, III y IV además de otras proteínas asociadas Alix y Tsg101. El proceso de fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática es mediado por proteínas de la familia Rab-GTPasas (Rab 11, Rab 27, Rab 35) y es probable que durante la liberación de los exosomas al medio extracelular estén involucradas las proteínas SNAREs (Record *et al.*, 2011).

5.2. Exosomas y otro tipo de microvesículas extracelulares

Las nomenclaturas utilizadas para nombrar las diversas vesículas de membrana secretadas ha traído inconvenientes y confusiones terminológicas, razón por la cual se llegó a un consenso o clasificación basado en tres mecanismos mediante los cuales las vesículas de membrana son liberadas al medio extracelular (Cocucci *et al.*, 2009; Mathivanan *et al.*, 2010; Gyorgy *et al.*, 2011; Théry, 2011). (i) Fusión exocítica de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática resultando en la liberación de los **exosomas**. (ii) Brotes de vesículas que emergen directamente de la membrana plasmática resultando en la formación de **microvesículas de desprendimiento**. (iii) Muerte celular que conlleva a la formación de los **cuerpos apoptóticos**. Cada una de las diferentes poblaciones de vesículas de membrana presentan características particulares que se resumen en la Tabla III.

Tabla III. Características fisicoquímicas de tres tipos de vesículas de membranas secretadas. Tabla modificada de Théry *et al.*, 2009; Gyorgy *et al.*, 2011.

Características	Exosomas	Microvesículas de Desprendimiento	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	30-100 nm	100-1000 nm	50-500 nm
Densidad de flotación (gradiente de sacarosa)	1.08-1.15 g/mL	Desconocido	1.16-1.28 g/mL
Morfología	Forma de copa	Formas irregulares	Formas heterogéneas
Composición lipídica	Ricos en colesterol, esfingomielina, ceramida, balsas lipídicas, baja exposición de la fosfatidilserina y ácido lisobifosfatídico	Colesterol y alta exposición de fosfatidilserina	Alta exposición de fosfatidilserina
Marcadores proteicos	Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), LAMP1, TSG101, Alix, HSC70	Selectinas, integrinas, CD40 y metaloproteinasas	Histonas
Sitio de generación	Cuerpos multivesiculares	Membrana plasmática	Desconocido
Tipo de generación	Constitutiva y regulada	Regulada	Regulada
Mecanismo de generación	Exocitosis de los cuerpos multivesiculares	Desprendimiento de la membrana plasmática	Contracción y muerte celular
Velocidad de sedimentación	100.000 g	10.000 g	1.200, 10.000 o 100.000 g

5.3. Composición molecular de los exosomas

La composición proteica y lipídica de los exosomas varía dependiendo del origen celular. Los análisis bioquímicos (electroforesis, Western blotting) y proteómicos haciendo uso de la espectrometría de masas han permitido identificar la presencia de un conjunto de proteínas que son comunes en exosomas provenientes de cualquier tipo de celular, las cuales fueron agrupadas para caracterizar o definir a un exosoma

típico, entre ellas proteínas asociadas al metabolismo, proteínas relacionadas con la respuesta inmunológica, proteínas de choque térmico, proteínas transmembranales, entre otras; en contraste con otras proteínas que son célula-específica. Hasta el momento, las proteínas identificadas solo han sido encontradas en el citosol o en la membrana plasmática y están ausentes en los organelos citoplasmáticos (Pant *et al.*, 2012).

Por otra parte, el análisis lipídico realizado mediante cromatografía de capa fina principalmente en exosomas procedentes de reticulocitos, células mastoides, células dendríticas y linfocitos B, ha permitido demostrar diferencias en la composición lipídica, la cual también varía dependiendo del tipo de célula. En general, los lípidos encontrados son colesterol, ceramidas, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina y balsas lipídicas (Schorey y Bhatnagar, 2008; Record *et al.*, 2011; Vlassov *et al.*, 2012).

Adicionalmente, Valadi *et al.*, 2007 demostraron la presencia de ARNm y microARNs en exosomas procedentes de células mastoides de ratón y humanos, los cuales estaban implicados en la transferencia de información de una célula a otra. En la Figura 6 se muestra una representación gráfica de la composición proteica y lipídica de un exosoma.

5.4. Funciones biológicas de los exosomas

Los exosomas están implicados en numerosas funciones biológicas, entre las cuales se destacan la comunicación intercelular, presentación antigénica, liberación de factores de virulencia, transferencia de ácidos nucleicos, entre otras (Théry *et al.*,

2009). Estas funciones pueden ser ejercidas en la célula mediante diversos mecanismos:

- a) Los exosomas pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática de la célula diana y liberar su contenido al interior de la célula receptora de una manera no selectiva transfiriendo proteínas y ARNs.
- b) Las proteínas de membrana presentes en los exosomas pueden interactuar con receptores presentes en la célula diana y activar procesos de señalización celular.
- c) Internalización de los exosomas a la célula vía endocitosis o por macropinocitosis.

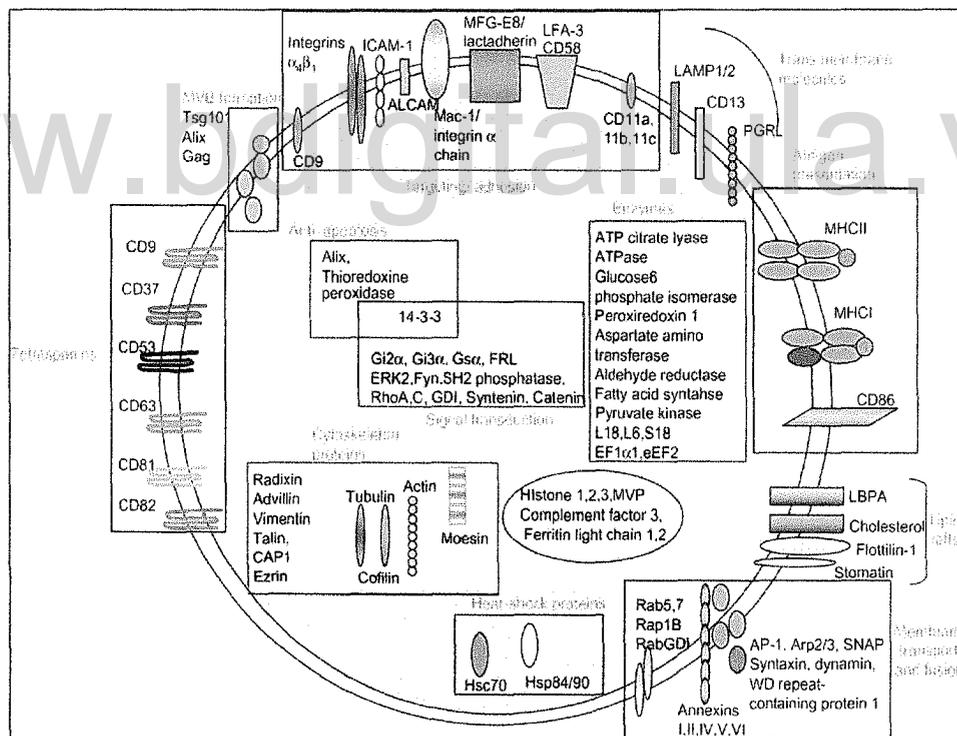


Figura 6. Composición proteica y lipídica de un exosoma típico. Tomado de Schorey y Bhatnagar, 2008.

5.5. Exosomas y organismos patógenos

En la actualidad, la liberación o secreción de vesículas de membrana bioactivas es considerado un mecanismo conservado en la evolución y un aspecto esencial en la biología celular de los organismos eucariotas y procariotas (Simpson *et al.*, 2008; Ellis y Kuehn, 2010; Silverman y Reiner *et al.*, 2010; Gyorgy *et al.*, 2011). Inicialmente, se sostenía que las vesículas encontradas en el sobrenadante de los cultivos celulares, correspondía al producto de la muerte celular y/o apoptosis y recientemente, se ha corroborado que la liberación de estas vesículas de membrana constituye un verdadero evento biológico que ocurre durante todo el ciclo de vida de muchas bacterias (Ellis y Kuehn, 2010), arquea (Ellen *et al.*, 2009), virus (Lenassi *et al.*, 2010), hongos oportunistas (Rodrigues *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010) y parásitos (Silverman *et al.*, 2010). Las vesículas de membrana representan vehículos transportadores de factores de virulencia como una estrategia clave relacionada con la patogénesis de la infección (Nandan *et al.*, 2002; Marti *et al.*, 2005; Torrecilhas *et al.*, 2012).

En este sentido, Deatherage y Cookson, 2012 señalan que en los parásitos, el principal mecanismo de secreción es mediado a través de la liberación de exosomas y por desprendimiento de vesículas que brotan o emergen directamente de la membrana plasmática, dentro de los cuales se incluyen *T. cruzi* (Torrecilhas *et al.*, 2009, Bayer-Santos *et al.*, 2012), *Trypanosoma brucei* (Atyame *et al.*, 2010), *P. falciparum* (Prudencio *et al.*, 2006), *Plasmodium yoelii* (Martín-Jaular *et al.*, 2011), *Toxoplasma gondii* (Aline *et al.*, 2004) y *Leishmania* spp. (Silverman *et al.*, 2010).

En parásitos del género *Leishmania*, Silverman *et al.*, 2010 demostraron la secreción de exosomas como un mecanismo general para la exportación de proteínas, y observaron exosomas y proteínas exosomales en el citoplasma de macrófagos infectados, sugiriendo que la liberación de los exosomas podría estar asociado con la comunicación macrófago-parásito y la modulación de la respuesta inmunológica durante la infección en *L. donovani* y *L. major*. Adicionalmente, evidenciaron modificación de la secreción de los exosomas cuando los promastigotes en fase estacionaria fueron sometidos a una temperatura de 37°C y pH 5.5 durante 24 horas, específicamente encontraron un incremento de la liberación de los exosomas y de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90), las cuales están asociadas con mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero e inmunosupresión. Aunque no está bien esclarecido, aun se sospecha que la liberación de los exosomas podría constituir otra estrategia alternativa del parásito que transporta factores de virulencia, debido a que su liberación y composición aumenta en situaciones de estrés (temperatura elevada, pH ácido), condiciones que son muy similares a las que experimentan los parásitos durante la fase temprana de infección al mamífero. Adicionalmente, el análisis proteómico realizado permitió la identificación de proteínas en los exosomas que constituyen factores de virulencia (GP63, triparedoxina peroxidasa, aldolasa, KMP11, Factor de elongación 1 α , LACK).

Asimismo, Silverman y Reiner, 2012 señalan que en los exosomas liberados por *Leishmania spp.* se encuentran proteínas que desactivan toda la maquinaria de señalización del macrófago, generando una respuesta antiinflamatoria mediada por la

IL-10 e inhibiendo las funciones microbicidas del macrófago, favoreciendo por ende, la persistencia del parásito y establecimiento de la infección en el hospedador.

En síntesis, lo anteriormente descrito sobre la interacción de los microorganismos patógenos con el sistema fibrinolítico, y en especial, la interacción de *L. mexicana* con el plasminógeno, los cuales sugieren que este patógeno utiliza el sistema fibrinolítico como un posible mecanismo asociado al proceso de invasión al hospedador, constituyen la base para la realización del presente estudio con otras especies de *Leishmania*, *L. braziliensis* y *L. infantum* causantes de diferentes manifestaciones clínicas, que permitan establecer una comparación de la interacción con el plasminógeno. Además dilucidar si las proteínas receptoras de plasminógeno se encuentran en las vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp. y con ello contribuir a la comprensión del mecanismo de invasión y diseminación de *Leishmania* spp en el hospedador.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Cultivo de promastigotes de *Leishmania* spp.

Los promastigotes de *Leishmania* spp se cultivaron en medio LIT (*liver infusion triptose*) monofásico suplementado con 5% de suero fetal bovino o en medio Schneider (Sigma Aldrich) suplementado con 20% de suero fetal bovino, ambos inactivados a 56°C durante 30 minutos (Childs, 1978). Los cultivos fueron mantenidos en agitación a 28°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial y/o la fase estacionaria. El crecimiento de los promastigotes fue monitoreado midiendo diariamente la densidad óptica a 600 nm. Adicionalmente, en algunos ensayos los parásitos en fase exponencial y/o fase estacionaria fueron sometidos a choque térmico incubando a los parásitos a una temperatura de 32°C sin agitación durante 12 horas (Calcagno, 2002).

1.2. Cepas de *Leishmania* spp.

En el presente estudio, se utilizaron tres especies de *Leishmania*: *Leishmania mexicana* cepa AZV, aislada por el Doctor José Witremundo Torrealba, en la Universidad de Carabobo de Venezuela (Pérez, 1979); *Leishmania braziliensis* MHOM Bel4 y *Leishmania infantum*, donadas gentilmente por el Instituto de Biomedicina de la Universidad Central de Venezuela.

1.3. Cepas bacterianas de *Escherichia coli*

- **XL1Blue**: con genotipo *endA1 gyrA96(naIR) thi-1 recA1 recIA1 lac glnV44 F'[:: Tn10 proAB+lacIq Δ (lacZ)M15] hsdR17 (rK-mK+)*. Resistente a tetraciclina (gen de resistencia portado en el plásmido F).
- **BL21(DE3)**: con genotipo *F-ompT gal dcm Ion hsdSB(rB-mB) γ(DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*.

1.4. Plásmidos

- **pGEM-T**: vector de alto número de copias que contiene los promotores ARN polimerasa T7 y SP6 y una región de múltiple clonaje dentro de la región que codifica para un α-péptido conocido como la enzima galactosidasa. Tiene un gen de resistencia a ampicilina *Amp^r*.

- **pET-28a+**: vector de expresión de proteínas recombinantes. Éste plásmido porta un N-terminal His-Tag/trombina/T7-Tag y una secuencia C-terminal His-Tag opcional. Tiene un gen de resistencia a kanamicina *Kan^r*.

- **pRARE**: gen de resistencia a cloranfenicol (*Cam^r*), origen de replicación p15a ori y genes tRNA (*ileX* tRNA, *argU* tRNA, *glyT* tRNA, *argW* tRNA, *leuW* tRNA, *proL* tRNA).

2. Medios de cultivos bacterianos

- **Medio LB**: 0,1% NaCl, peptona bacteriológica y 0,05% de extracto de levadura, pH 7.0.

• **Medio mínimo:** Na_2HPO_4 25 mM, KH_2PO_4 25 mM, NH_4Cl 50 mM, Na_2SO_4 5 mM, MgSO_4 2mM, glucosa 0,5%, aspartato 0,25% y tiamina 0,001%.

• **Medio de autoinducción (ZYM-5052):** 1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,05% de glucosa, 0,2% de lactosa, 0,5% de glicerol, MgSO_4 2 mM, Na_2HPO_4 25 mM, NH_4Cl 50 mM y Na_2SO_4 5 mM.

3. Medios de cultivos de parásitos

• **Medio LIT (liver infusión tryptose):** 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,002% p/v de hemina previamente disuelta en 8 ml de una solución 0,1 N de NaOH, 5% v/v de extracto de hígado de res, 5% de suero fetal bovino, 1,5% de triptosa, 0,4% de glucosa, KCl 5,36 mM, Na_2HPO_4 35,7 mM, NaCl 154 mM. Adicionalmente, a este medio se le añaden 0,006% de estreptomicina y 0,01% de penicilina G.

MÉTODOS

1. Técnicas generales

1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

La electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizó utilizando el sistema descrito por Laemmli, 1970. Se prepararon geles con diferentes concentraciones (10%, 12% y 15%) en el sistema de ensamblaje de geles MiniPROTEAN 3 Cell de BIORAD. La composición del gel concentrador fue de 0,156M Tris-HCl pH 6.8, 0,125% SDS, 6% acrilamida/bisacrilamida (29:1), tetrametiletilendiamina (TEMED) 10 μ l y 0,01% de persulfato de amonio.

El gel de resolución se realizó con el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (29:1) indicado para cada concentración, en presencia de 0,375M Tris-HCl pH 8.8, 0,25% de SDS, 12 μ l de TEMED y 0,01% de persulfato de amonio. Las muestras proteicas se mezclaron con un tampón de muestra que contiene 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM de β -mercaptoetanol, 2% de SDS, 10% de glicerol y 0,01% de azul de bromofenol. Las corridas electroforéticas se realizaron en el sistema de minigeles de BIORAD a 100 V durante 2 horas en un tampón de corrida cuya composición fue de 12,5mM Tris, 96 mM glicina y 0,05% SDS.

Los geles fueron teñidos empleando una solución colorante con azul de Coomassie (0,25% de azul de Coomassie R 250, 30% de metanol y 10% ácido acético en agua) y luego, fueron sometidos a un proceso de decoloración utilizando una solución decolorante (30% de metanol, 10% ácido acético en agua) durante 20

minutos. Esta técnica permitió la visualización de las proteínas teniendo como referencia el uso de marcadores de peso moleculares de diferentes casas comerciales e inclusive marcadores preteñidos comúnmente usados para los Western blotting.

1.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para la detección y análisis de ADN se utilizó la metodología descrita por Sambrook y Russell, 2001. Las muestras fueron tratadas con una solución de carga 6X (0,25% azul bromofenol, 0,25% xilen-cianol y 40% p/v sacarosa en agua destilada) y fueron sometidas a una electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en el tampón TAE 1X (0,4M Tris-acetato, 0,001M EDTA, pH 8). La corrida electroforética se realizó a 100V durante 45 minutos en presencia de tampón TAE 1X con 0,00001% de bromuro de etidio. Los geles con el producto de amplificación se visualizaron en una lámpara de luz UV.

1.3. Western blotting

Las proteínas separadas mediante electroforesis en el gel SDS-PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF) en presencia de un tampón de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 20% v/v metanol) en una cámara Mini Trans-blot de BIORAD a 100 V, en frío durante 1 hora. Transcurrido éste tiempo, la membrana fue lavada tres veces con PBS (25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.4, 14 mM NaCl, 10 mM KCl) y se bloqueó con PBS-caseína al 5% durante toda la noche. Luego, se lavó tres veces con PBS cada 5 minutos y se incubó con un anticuerpo primario en PBS-caseína al 1% con agitación suave por 1 hora. Se lavó nuevamente la membrana, dos veces con PBS y una vez

con TBS (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) cada 5 minutos y se incubó con un anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina) en TBS-caseína al 1% con agitación suave durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con TBS cada 5 minutos, se reveló con un sustrato (Thermo Scientific) para la fosfatasa alcalina (cloruro de tetrazolio nitro azul-NBT y sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato-BCIP) hasta completar el revelado y se detuvo la reacción en la membrana lavándola con agua destilada.

1.4. Ligand blotting

El Ligand blotting es una técnica donde se utiliza plasminógeno como ligando, con la finalidad de identificar proteínas que tengan la capacidad de unir plasminógeno. Consistió en transferir las proteínas obtenidas de la corrida electroforética a una membrana de nitrocelulosa o PVDF mediante Western blotting. Luego, la membrana se bloqueó con PBS-caseína al 5% durante toda la noche, se lavó tres veces con PBS cada 5 minutos y se incubó con plasminógeno a una concentración de 1 μ M en PBS-caseína al 1% durante 1 hora. Se incubó con el anticuerpo primario (anti-plasminógeno) en una dilución 1:2000 en PBS-caseína al 1% durante 1 hora con agitación suave. Se lavó la membrana dos veces con PBS y 1 vez con TBS cada 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina) en PBS-caseína al 1% durante 1 hora con agitación suave. Se realizaron tres lavados con TBS cada 5 minutos, se reveló con un sustrato comercial para la fosfatasa alcalina y la reacción se detuvo con agua destilada.

Esta técnica permitió identificar proteínas con capacidad de unión al plasminógeno humano en los extractos de parásitos, fracción microsomal y vesículas de membranas secretadas de las 3 especies de *Leishmania*.

1.5. Stripping de membranas

En algunos casos, la membrana del Ligand blotting se sometió a un proceso de *stripping* que consistió en la remoción de los anticuerpos y otros ligandos asociados a las proteínas unidas a la membrana mediante la aplicación de una solución ácida que interfiere con las interacciones proteína-proteína sin degradarlas. El proceso de *stripping* fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Harlow y Lane, 1999. Este consistió en incubar la membrana en metanol puro durante 1 minuto, luego se incubó en PBS durante 15 minutos para hidratar la membrana, se incubó en una solución de *stripping* (25 mM glicina, 1% SDS, pH 2) durante 30 minutos, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con PBS, la membrana se bloqueó en una solución 5% de PBS-caseína durante toda la noche y finalmente, se reveló siguiendo el protocolo descrito previamente para el Western blotting.

1.6. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford, 1976. Se utilizaron volúmenes entre 1 y 10 µl de la muestra problema añadiendo el volumen necesario de agua destilada hasta completar 800 µl. Luego a ese volumen se le agregó 200 µl del reactivo de Bradford de BIORAD, se mezcló por inversión y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6305 UV/Vis. El

resultado se calculó según la curva de calibración realizada previamente con albúmina sérica bovina.

1.7. Zimogramas

Los zimogramas fueron realizados con la finalidad de corroborar la presencia de proteasas en el extracto de los parásitos y en las vesículas de secreción de membranas. Este ensayo consistió en realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y 0,4% de caseína. Las muestras fueron tratadas sólo con el buffer de carga, SDS, sin agregar ditioneitol (DTT) ni β -mercaptoetanol. Adicionalmente, se preparó un gel de agarosa (50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM NaCl, 1% de agarosa y 10% de caseína). El gel de poliacrilamida fue colocado sobre el gel de agarosa e incubado en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche.

Luego, los geles fueron lavados en 30 ml de una solución de Tritón X-100 al 2,5% en agua durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en un buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.7, 10 mM NaCl, a 37 °C durante toda la noche. Se lavaron nuevamente con PBS y se colorearon con azul de Coomassie.

1.8. Ensayos de digestión con proteasas

Los ensayos de digestión fueron realizados con diferentes proteasas: bromelina (ananase) de Laboratorios Vargas, proteinasa K (Sigma) y tripsina (Gibco) con la finalidad de dilucidar la localización de diferentes proteínas. En relación a las vesículas de membrana, se utilizó bromelina (0,3 mg/ml) y proteinasa K (0,3 mg/ml) en PBS a 37°C sin agitación durante 60 minutos, en presencia o ausencia de tritón X-

100 0.15% v/v. Luego, la reacción fue detenida con un coctel de inhibidores que contiene E-64 (inhibidor de cisteín proteasas) en el caso de la digestión con bromelina y PMSF en el caso de la digestión con proteinasa K. Las muestras fueron tratadas con tampón de carga y se hirvieron por 10 minutos. Luego, se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa o PVDF mediante la técnica de Western blotting descrita anteriormente, realizando las incubaciones con los anticuerpos de interés para verificar si las proteínas se encuentran en el interior o en la membrana de éstas vesículas secretadas.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de digestión con tripsina 0,3 mg/ml y la enolasa recombinante (0,97 mg/ml) en PBS a 37°C sin agitación durante 60 minutos, en presencia o ausencia de tritón X-100 0.15% v/v y cloruro de calcio 157 mM. La reacción fue detenida con un coctel de inhibidores sin PMSF y se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente revelando el Western blotting con el anticuerpo anti-enolasa (dilución 1/1000).

2. Purificación de las vesículas de membrana secretadas

Las vesículas de membrana secretadas fueron obtenidas siguiendo los protocolos descritos por Silverman *et al.*, 2010 y Raposo *et al.*, 1996. Se cultivaron los promastigotes de tres especies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*) en 30 ml de medio Schneider, mantenidos en agitación a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9 a 600 nm, correspondiente al inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento de los promastigotes. Luego, se colocaron en

tubos Falcon estériles y se centrifugaron a 1.500 x g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento que contiene a los promastigotes fue resuspendido en el medio RPMI-1640 suplementado con HEPES 20mM, L-glutamina 2mM, D-glucosa 1%, 60 mg/ml penicilina y 50 mg/ml estreptomicina, pH 7.3 y se dejó en ese medio sin agitación a 28°C durante 24 horas.

Posteriormente, se centrifugó a 1.500 x g durante 15 minutos, el sedimento fue utilizado para preparar el extracto de los parásitos y se colectó el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Luego, ese sobrenadante se ultracentrifugó a 105.000 x g durante 90 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el sedimento que contiene las vesículas de membrana secretadas fue resuspendido en 50 µL de PBS. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford, luego fueron alicuotados y almacenados a -20°C para su uso posterior.

3. Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica de barrido fue realizada con la finalidad de visualizar si existían diferencias con respecto a la morfología externa de los parásitos antes y después del proceso de secreción. Asimismo, aplicamos la microscopía electrónica de transmisión que permitió evaluar los aspectos ultraestructurales de las vesículas de membrana secretadas.

3.1. Microscopía Electrónica de Barrido

El procesamiento de los promastigotes de *Leishmania* spp para microscopía electrónica de barrido consistió en un proceso de fijación donde los promastigotes fueron resuspendidos en una mezcla 3:3 (formaldehído al 3%, glutaraldehído al 3% diluidos en tampón cacodilato 0,1 M pH 6.3) a 4°C durante 24 horas y luego fueron lavados tres veces por 10 minutos cada vez en tampón cacodilato; las muestras fueron deshidratadas con alcohol etílico en concentraciones ascendentes 30%, 50% y 75% durante 15 minutos, 90% y tres veces al 100% durante 30 minutos; luego fueron desecadas en una campana por el método de punto crítico durante 48 horas y se llevó a cabo la metalización de la muestra sólo con oro; finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio de barrido Hitachi S-2500.

3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

El procedimiento consistió en fijar las muestras en una mezcla 3:3 (formaldehído al 3%, glutaraldehído al 3% diluidos en tampón cacodilato 0,1 M pH 6.3) y luego fueron lavados tres veces por 10 minutos cada vez en tampón cacodilato a 4°C durante 24 horas; luego fueron sometidas a una proceso de post-fijación en tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato durante 24 horas y lavados tres veces por 10 minutos cada vez en tampón cacodilato a 4°C durante 24 horas; las muestras fueron deshidratadas con alcohol etílico en concentraciones ascendentes 30%, 50% durante 20 minutos, 80% por 30 minutos, dos veces al 100% durante 30 minutos e incubación en óxido de propileno puro durante 30 minutos; posteriormente, se procedió a realizar una infiltración en resina (una parte de óxido de propileno y otra parte de

resina) durante 1 hora; posteriormente, se colocó el material en la cápsula de inclusión que contiene la resina, se colocó en la estufa a 60 °C durante 48 horas para que se lleve a cabo el proceso de polimerización. Finalmente, se realizaron los tallados de las pirámides, cortes y observación al microscopio electrónica H-7000.

4. Clonación y subclonación del gen SMP-1

4.1. Diseño de los oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se realizó un alineamiento con el programa MultAlin versión 5.4.1 desarrollado por Corpet, 1988 utilizando las secuencias del gen SMP-1 disponible en la base de datos de UniProtKB/TrEMBL-EBI y GenDB de 5 especies de *Leishmania*: *L. mexicana* (E9AUS1), *L. donovani* (E9BETA), *L. infantum* (A4HYX4), *L. major* (Q5SDH5) y *L. braziliensis* (E9AII6).

Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* de la secuencia del gen de interés disponible en el NCBI de *L. mexicana* (GI:322491430) con la finalidad de verificar que la secuencia no contenga sitios de corte con las enzimas de restricción disponibles, BamHI y NdeI, compatibles con el vector de expresión pET28a+. El análisis fue realizado con el programa NEBcutter versión 2.0 desarrollado por Vincze *et al.*, 2003.

Se seleccionaron los primeros 25 y los últimos 20 nucleótidos con los sitios de corte de las enzimas de restricción para diseñar los oligonucleótidos sentido y antisentido, los cuales fueron evaluados con el programa Oligo Explorer 1.2 y se ajustaron hasta obtener las características adecuadas para la amplificación como una

temperatura de fusión menor a 70 °C y similar entre ambos oligonucleótidos, un porcentaje de GC del 50% y una región homóloga al gen no menor de 16 bases.

4.2. Extracción del ADN genómico de *Leishmania mexicana*

La extracción del ADN se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell, 2001. Se cultivaron promastigotes de *L. mexicana* cepa AZV en medio LIT o Schneider hasta alcanzar la fase exponencial de la curva de crecimiento. Los parásitos se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Luego, las células fueron resuspendidas en un tampón de lisis (100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,1% SDS, pH 8) y el lisado fue sometido a un proceso de extracción con dos volúmenes de una mezcla de solventes orgánicos fenol: cloroformo: isoamilalcohol 25:24:1. La fase acuosa fue precipitada con etanol puro frío y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 80% frío. Se dejó evaporar todo el etanol y el ADN fue resuspendido en agua desionizada estéril. Se calculó la concentración y la pureza del ADN extraído midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm.

4.3. Amplificación por PCR del gen SMP-1

La amplificación del gen SMP-1 se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Mullis *et al.*, 1986. La técnica consistió en realizar una mezcla de reacción constituida por 50 µl con 1µM de cada oligonucleótido (sentido: 5'-GCATATGGGCTGCGGTGCTTCGT-3' y antisentido: 5'-GGATCCCTACTTTTCCTTCTCCCCCTGACGCT-3'), 0,2 mM de desoxinucleótidos, 1,5 U de Go Taq Flexi DNA polimerasa (Promega), 1,5 mM de

MgCl₂, Tampón 1X (Promega) y 1 µg de ADN genómico de *L. mexicana* completando con agua miliQ estéril.

El programa de ciclos térmicos diseñado para la amplificación fue de : 94 °C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos de 94°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos y 72°C por 60 segundos y finalmente un ciclo de 72°C por 10 minutos.

Para limpiar el producto de PCR, se utilizó el kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*” que constituye un sistema de cromatografía de sílica de la casa comercial Promega. El producto de la amplificación por PCR fue verificado en una electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

4.4. Clonación en el vector pGEM-T

El proceso de ligación del producto de PCR en el vector pGEM-T se realizó empleando el kit pGEM-T de Promega siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El mapa del plásmido se muestra en la Figura 7. Para la clonación en el vector pGEM-T, se preparó una mezcla total de reacción de 10 µl constituida por el buffer de ligasa T4 1X, 50 ng de pGEM-T, 60 ng del producto de PCR puro, 3U de ligasa de ADN de T4 y agua miliQ estéril. La mezcla de reacción se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la mezcla de la ligación se utilizó para la transformación de *E. coli* cepa XL1Blue competentes (Sambrook y Russell, 2001) con algunas modificaciones.

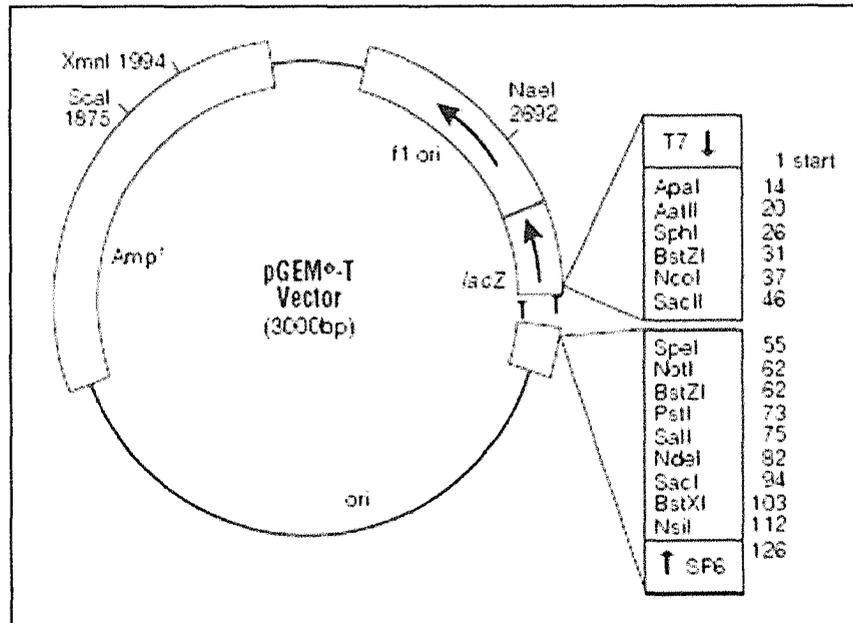


Figura 7. Mapa del vector de clonación pGEM-T.

4.4.1. Obtención de Células Competentes

Para obtener las células competentes se utilizó una variante del método de Cohen *et al.*, 1972 que se describe a continuación. Una colonia aislada de *E. coli* XL1Blue fue inoculada en 50 ml de medio Luria-Bertani (LB) en una fiola de 250 ml con el antibiótico de selección correspondiente (para XL1Blue tetraciclina 12,5 $\mu\text{g/ml}$; BL21pRARE cloranfenicol 34 $\mu\text{g/ml}$) y se dejó crecer a 37°C en agitación toda la noche. Se tomaron 5 ml del preinóculo y se inoculó 100 ml de medio LB con el antibiótico respectivo y se dejó crecer a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4.

El cultivo fue alicuotado en dos tubos de centrifuga (50 ml en cada uno) previamente enfriados, se incubaron por 5-10 minutos a 4°C y se colectaron las

células por centrifugación a 1100 x g durante 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y cada sedimento fue resuspendido con mucho cuidado en 10 ml de una solución de cloruro de calcio (60 mM CaCl₂, 10 mM Pipes, 10% glicerol pH 7, filtrada con una membrana de 2µM). El procedimiento se repitió nuevamente, luego las células se incubaron durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, se resuspendió cada sedimento suavemente en 2 ml de la solución de cloruro de calcio, se alicuotaron en 200 µl y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

4.4.2. Transformación de *E. coli* cepa XL1Blue competentes

Para llevar a cabo la transformación de *E. coli* cepa XL1Blue se utilizó el protocolo descrito por Sambrook y Russell, 2001 con algunas modificaciones. A 100 µl de células competentes se les añadió 10 µl del producto de ligación, se mezcló suavemente, se incubó en hielo durante 30 minutos y luego las células fueron sometidas a un choque térmico colocándolas en baño de María a 42°C durante 90 segundos y pasándolas inmediatamente a hielo durante 2 minutos. A la mezcla se le agregó 900 µl de medio LB sin antibióticos y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1500 x g durante 5 minutos y resuspendidas en 200 µl de medio LB para sembrarlas con rastrillo en placas de medio LB-agar al 1,5% conteniendo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido IPTG (40 µg/ml), el sustrato cromogénico Blue-Gal (40 µg/ml) y los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (12,5 µg/ml) para la selección de los transformantes. Cabe señalar que el IPTG y el Blue-Gal fueron

añadidos superficialmente a las placas y se dejaron reabsorber durante 4 horas a 37 °C.

4.4.3. Selección de los clones transformantes

La selección de los clones bacterianos transformados con el plásmido pGEM-T se realizó por medio de la actividad β -galactosidasa. Todas las colonias con el plásmido adquieren resistencia a la ampicilina, por lo tanto, son capaces de crecer en las placas, sin embargo, sólo las que contenían el inserto pierden la capacidad de α -complementación para obtener una β -galactosidasa funcional, resultando en colonias de color blanco.

4.4.4. Método de purificación del ADN plasmídico por ebullición

Para confirmar la presencia del plásmido recombinante en las células de *E. coli* cepa XL1Blue transformadas, se realizó una extracción del ADN plasmídico y su posterior digestión con enzimas de restricción.

La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el método de purificación de ADN plasmídico por ebullición (Sambrook y Russell, 2001). Las colonias seleccionadas fueron incubadas en 5 ml de medio LB más antibióticos (ampicilina 100 μ g/ml y tetraciclina 12,5 μ g /ml) a 37°C durante 12 h y agitación constante. El cultivo fue centrifugado a 1500 x g por 10 minutos, el sedimento fue resuspendido en 110 μ l de STETL (Tris 50 mM pH 8, sacarosa 8%, Tritón X-100 al 5%, EDTA 50 mM y lisozima 0,5 mg/ml) e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se colocó en agua hirviendo durante 30 segundos y se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C.

El sedimento obtenido fue removido y descartado con un palillo estéril y el sobrenadante fue incubado con 1 μ l de RNAsa (10 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para precipitar el ADN plasmídico obtenido, se añadió 110 μ l de isopropanol y se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue lavado dos veces con etanol al 70%, luego se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente y el sedimento fue resuspendido en 8,5 μ l de agua destilada estéril.

4.4.5. Digestión con enzimas de restricción

El ADN plasmídico obtenido por el método de ebullición descrito anteriormente, fue sometido a un tratamiento con enzimas de restricción para corroborar la presencia del inserto de interés en el plásmido. Se realizó la digestión con las enzimas BamHI (Promega) y NdeI (Promega) con la finalidad de liberar el inserto del tamaño esperado y finalmente se visualizó el producto de la digestión en un gel de agarosa al 0.7%.

4.4.6. Secuenciamiento del plásmido pGEM-T/SMP-1

Se seleccionaron 2 clones que poseían el inserto y se purificó el ADN plasmídico con el kit de *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* de Promega siguiendo las recomendaciones de esa casa comercial. Se midió la densidad óptica a 260 nm de las muestras para determinar la concentración del ADN plasmídico y se calculó el volumen correspondiente a 2 μ g de ADN y se agregó en un tubo eppendorf nuevo. Las muestras fueron enviadas para su secuenciamiento a los

laboratorios de Eurofins MGW Operon usando los oligonucleótidos universales T7 y SP6.

4.5. Subclonación en el vector de expresión pET-28a+

El clon recombinante obtenido de la transformación de XL1Blue con el plásmido pGEM-T/SMP-1 secuenciado fue utilizado para realizar la subclonación del gen SMP-1 en el vector de expresión pET-28a+ (Novagen), cuyo mapa se muestra en la Figura 8. Permite la expresión inducible con lactosa o sus análogos del gen clonado, incorporando una cola de 6 histidinas en el extremo aminoterminal de la proteína y un sitio de corte proteolítico para trombina entre la cola de histidina y el primer aminoácido de la proteína. Esta característica permite la purificación de la proteína recombinante mediante una cromatografía de afinidad a metales ya que los electrones desapareados de los 6 anillos de histidina logran coordinarse con un catión bivalente (níquel) y también permite la posibilidad de eliminar la cola de histidina de la proteína recombinante al tratarla con trombina.

Para incorporar el gen secuenciado en el vector de expresión pET-28a, el plásmido de clonación pGEM-T/SMP-1 secuenciado, se sometió a digestión con las enzimas de restricción BamHI y NdeI en su tampón respectivo a 37°C durante 4 horas. El producto de la digestión fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y la banda correspondiente al inserto fue cortada o extraída del gel para ser purificada con el el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* de Promega. Posteriormente, el vector pET-28a+ se sometió a digestión con las mismas enzimas de restricción y se procedió a realizar la ligación del gen de interés.

colonias transformantes se realizó en placas LB-agar 1,5% con kanamicina (30 µg/ml) y tetraciclina (12,5 µg/ml). Se seleccionaron al azar varias colonias y fueron evaluadas mediante un PCR de colonia para verificar la presencia del plásmido.

4.5.1. PCR de Colonia

El PCR de colonia (Guessow y Clackson, 1989) es un método que consiste en la amplificación por PCR del gen de interés para determinar a partir de un cultivo fresco de bacterias transformadas, la presencia del plásmido recombinante. Para esto, se tomó una fracción de la colonia sospechosa de ser portadora del plásmido recombinante y se transfirió a un tubo de microcentrifuga conteniendo 50 µl de agua miliQ . La muestra fue hervida durante 5 minutos para provocar la lisis celular. Luego, se centrifugó a 16000 x g por 1 minuto y el sobrenadante obtenido fue utilizado como molde para realizar el PCR como se describió anteriormente. El producto del PCR de colonia fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

Una vez comprobado la presencia del gen en las colonias positivas, se seleccionó una colonia para obtener el plásmido puro a partir de un cultivo de 10 ml en medio LB con los antibióticos tetraciclina (12,5 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml) y fue purificado con el kit de *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* de Promega.

4.5.2. Transformación de *E.coli* cepa BL21(DE3) competentes

Se realizó una doble transformación de células competentes *E. coli* cepa BL21 con los plásmidos pET28a+/SMP-1 y pRARE. En este ensayo se siguió el mismo protocolo de transformación descrito anteriormente, con la modificación que al

incubar las células competentes con el plásmido pET28a+/SMP-1, también se agregó un plásmido adicional pRARE (Novagen) con la finalidad de aumentar los niveles de ARNt raros en *E. coli* que puedan interferir con la expresión de la proteína. Las células resultantes de la transformación fueron sembradas en placas de medio LB con agar, suplementadas con kanamicina (30µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml), y se seleccionaron varias colonias positivas para ser evaluadas por la técnica de PCR. El producto del PCR de colonia fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

5. Ensayos de expresión y purificación de SMP-1

5.1. Ensayo de inducción con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)

El ensayo fue realizado con la finalidad de verificar si la proteína SMP-1 recombinante podía ser expresada a partir de la cepa de expresión transformada. Para ello, se utilizó la inducción de la expresión de la proteína recombinante con un análogo de la lactosa no metabolizable, isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG). A partir de un preinóculo fresco del clon de interés, se inocularon 100 ml de medio LB suplementado con kanamicina (30µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml), se dejó crecer a 37°C en agitación, monitoreando la densidad óptica a 600 nm hasta alcanzar un valor de 0,4 (fase de crecimiento exponencial). A esa densidad óptica se añadió IPTG en una concentración final de 1mM y el cultivo se mantuvo bajo las mismas condiciones tomando 1 ml de muestra cada hora por 4 horas. Las muestras fueron lavadas tres veces con PBS, centrifugadas a 300 x g durante 15 minutos y el sedimento obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Una vez recolectadas todas las muestras durante el proceso de inducción, los sedimentos de las células se lisaron resuspendiendo en 50 μ l de tampón de muestra (50 mM Tris-HCl pH 6,8 con 2% de SDS, 10% de glicerol y 0,1% de azul de bromofenol) con β -mercaptoetanol, se hirvieron por 10 minutos y fueron sometidas a una ruptura mecánica empleando una jeringa de insulina para lisar por completo las células y fragmentar el ADN. Las muestras fueron depositadas en un gel de poliacrilamida con SDS en cantidades proporcionales a la densidad celular con el propósito de tener en cada pozo las proteínas correspondientes a la misma cantidad de bacterias, para luego realizar una electroforesis. El gel fue coloreado con azul de Coomassie para visualizar la expresión de la proteína a lo largo del tiempo de inducción.

5.2. Ensayos de expresión con medio de autoinducción

Adicionalmente, se optó por sobreexpresar la proteína en un medio rico ZYM-5052 (Studier, 2005), conocido también como medio de autoinducción. El medio contiene una mezcla de fuentes de carbono que incluye lactosa como inductor de la expresión proteica y permite la sobreexpresión más lenta que el IPTG, una vez que el cultivo ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm entre 6 y 10. Esta condición de expresión es menos favorable para la formación de los cuerpos de inclusión y a su vez permite un alto rendimiento de la proteína recombinante soluble.

El ensayo se realizó a partir de un preinóculo de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pRARE/pET-28a+/SMP-1 en 5 ml de medio LB con cloranfenicol (34 μ g/ml) y kanamicina (30 μ g/ml), el cual se dejó crecer a 37°C en agitación durante 2

horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,2. El preinóculo se empleó para inocular 10 ml de medio mínimo (Na_2HPO_4 25 mM, KH_2PO_4 25 mM, NH_4Cl 50 mM, Na_2SO_4 5 mM, MgSO_4 2mM, glucosa 0,5%, aspartato 0,25% y tiamina 0,001%) suplementado con los antibióticos de selección y se dejó crecer a 37°C en agitación durante más de 12 horas.

Posteriormente, se inoculó 100 ml del medio ZYM-5052 con 1 ml del cultivo crecido en medio mínimo y se dejó crecer con los antibióticos a temperatura ambiente con agitación por 36 horas, tomando muestras del cultivo a las 8, 12, 24 y 36 horas. Las muestras recolectadas durante la autoinducción fueron tratadas con un buffer de lisis como se describió anteriormente. Los sedimentos y sobrenadantes obtenidos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 15% con SDS en condiciones desnaturizantes para determinar la solubilidad de la proteína recombinante expresada.

5.3. Purificación de SMP-1 recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales

Para purificar la proteína SMP-1 recombinante de *L. mexicana* se partió de un cultivo de 50 ml de medio de autoinducción inoculado con 0,5 ml del preinóculo de la cepa BL21(DE3)pRARE/pET28a+/SMP-1 con cloranfenicol (34 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (30 $\mu\text{g/ml}$) crecido en agitación a temperatura ambiente durante 36-46 horas. Las células se colectaron por centrifugación y se sometieron a tres lavados, cada uno, con 10 ml de tampón de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NaCl) para congelar el sedimento a -80°C hasta su uso. El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón de unión (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0,5 M NaCl pH 7.8), se añadió 1

μl de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Sigma) y 1 μl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2mM. Luego se sometió a una ruptura por sonicación utilizando el siguientes esquema diseñado: 2 pulsos de intensidad 9 por 45 segundos cada uno, 2 pulsos de intensidad 7 por 60 segundos cada uno y 7 pulsos de intensidad 9 por 45 segundos cada uno, permitiendo enfriar la muestra durante 3 minutos entre pulso y pulso.

Una vez rotas las células en el tampón de unión se colectó una muestra del homogenato, el cual fue centrifugado a 17.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se incubó 1 hora en agitación a temperatura ambiente con 1ml de columna His-Link (Promega) previamente equilibrada con 30 ml de tampón de unión. Se realizaron dos lavados de 5 ml cada uno con el tampón de unión, seguido por cuatro lavados con 5ml cada uno de tampón de lavado (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,5 M NaCl pH 6), dos lavados con 5 ml cada uno con tampón de lavado suplementado con 10 mM de imidazol y se eluyó con 20 ml (en fracciones de 4 ml) del tampón de elución (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,5 M NaCl pH 6, 200 mM imidazol).

La cuantificación de proteínas en las fracciones eluidas se realizó por el método de Bradford, 1976 anteriormente descrito y el proceso de purificación se evaluó mediante separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida con SDS tratando las muestras con el tampón de muestra que contiene 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM de β-mercaptoetanol, 2% de SDS, 10% de glicerol y 0,01% de azul de bromofenol.

Adicionalmente, la proteína SMP-1 recombinante fue sometida a un procedimiento para concentrarla y eliminar el imidazol. El procedimiento consistió en precipitar la proteína utilizando sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 80% de saturación durante toda la noche a 4°C. Luego se llevó a cabo una centrifugación a 17.000 x g durante 20 minutos y el sedimento se resuspendió en un volumen de 2,5 ml de tampón TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5). La solución fue sometida a una cromatografía de exclusión molecular mediante una columna Sephadex G-25 precalibrada PD-10 (Amersham Biosciences) con la finalidad de eliminar las sales y separar las sustancias menores de 1000 Da, eluyendo con 3,5 ml del tampón TBS.

6. Análisis bioinformático

6.1. Alineamiento

Para realizar el alineamiento múltiple se utilizaron las secuencias homólogas de la proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1) de otras especies de *Leishmania* y *T. cruzi*. Las seis secuencias de aminoácidos pertenecientes a SMP-1 fueron obtenidas después de realizar un WUBLAST (Gish y States, 1993) con la secuencia de aminoácidos de SMP-1 de *L. mexicana* AZV disponible en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las especies y números de acceso de las secuencias utilizadas se mencionan a continuación:

Especie de <i>Leishmania</i>	GI	Nº de acceso
<i>L. mexicana</i>	401421410	XP 003875194.1
<i>L. braziliensis</i>	389603914	XP 003723102.1
<i>L. infantum</i>	146085415	XP 001465265.1
<i>L. donovani</i>	398014571	XP 003860476.1
<i>L. major</i>	157868661	XP 001682883.1

El alineamiento múltiple fue realizado con el programa Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007) utilizando la versión en línea disponible del European Bioinformatic Institute. En general, el Clustal W2 fue utilizado para el alineamiento de múltiples secuencias divergentes de ADN o proteína, el cual va a generar un alineamiento progresivo de pares de bases o aminoácidos creando un alineamiento global que va a permitir apreciar las identidades, similitudes y diferencias en las secuencias.

6.2. Modelado de SMP-1

El modelado de la estructura de SMP-1 en 3D se realizó por homología utilizando el programa RasMol (Sayle, 1995) versión 2.6 tomando como patrón la estructura cristalina de la proteína miristoilada pequeña 1 de *L. major* (PDB: ID: 2FEO), Gooley *et al.*, 2006 disponible en el Banco de Datos de Proteínas.

7. Producción de anticuerpos en conejo

Para la obtención de los anticuerpos policlonales se dispuso de un conejo (*Oryctolagus cuniculus*) macho de 2,5 a 3,5 Kg y 5 meses de edad. Al conejo se le extrajo 1 ml de sangre completa de la vena de la oreja, la cual se dejó coagulando y luego fue centrifugada a 16.000 x g durante 10 minutos para obtener el suero preinmune antes de iniciar las inmunizaciones.

Los anticuerpos policlonales anti-SMP1 fueron obtenidos inmunizando al conejo con cinco dosis de 200 µg de la proteína SMP-1 recombinante por vía intradérmica, realizando refuerzos cada 15 días. Para la primera inoculación, se utilizó un volumen de antígeno y un volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma), las siguientes tres inmunizaciones se realizaron con un volumen de antígeno y un volumen de

adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y para la quinta inmunización se aplicó el antígeno sin adyuvante. Después de dos semanas de la cuarta inoculación del conejo, se realizó una nueva extracción de sangre de la vena de la oreja con la finalidad de determinar la presencia de los anticuerpos anti-SMPI en el suero realizando diluciones seriadas. Una vez corroborado la presencia de un título alto de anticuerpos anti-SMPI, se procedió a realizar el sangrado del conejo por punción cardíaca.

Para la obtención del suero por punción cardíaca, se extrajeron 50 ml de sangre directamente del corazón del conejo, se dejó coagular durante 4 horas a temperatura ambiente y se sometió a dos centrifugaciones sucesivas a 7.600 x g durante 20 minutos para eliminar los restos celulares y coágulos sanguíneos, obteniéndose el sobrenadante correspondiente a 25 ml de suero que fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso.

8. Ensayos de interacción del plasminógeno en las distintas fases de la curva de crecimiento de *Leishmania spp.* Cinética de unión plasminógeno-*Leishmania spp.* Interacción de SMP-1 recombinante con el plasminógeno.

8.1. Purificación del Plasminógeno humano

El plasminógeno se purificó a partir de plasma sanguíneo, fresco y congelado, obtenido del Banco de Sangre del Hospital Universitario de la ULA, siguiendo la metodología descrita por Deutsch y Mertz, 1970 que se describe a continuación. El plasma fue descongelado mantenido a 4°C, se midió el volumen y se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas: aprotinina 1 µg/ml, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2mM, benzamidina 4mM y fluoruro de

fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2mM. El plasma se pasó dos veces por una columna de afinidad L-Lisina Sefarosa 4B (10,5 cm x 4,3 cm) previamente regenerada y equilibrada con un tampón de equilibración ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20mM, 0,5M NaCl, 2mM EDTA, 0,01% NaN_3 , aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7,4) a un flujo de 0,6 ml/min a 4°C. Luego, la columna se lavó con cinco volúmenes de tampón de equilibración seguido de cinco volúmenes de tampón A ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50mM, 80mM NaCl, aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 4) a un flujo de 1,3-2 ml/min. Posteriormente, el plasminógeno unido al ligando (lisina) de la columna, fue eluido con un tampón de elusión ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50mM, 80mM NaCl, 50mM ácido epsilón aminocaproico (ϵ -ACA), aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7,4), recolectando fracciones de 4 ml en tubos de ensayo, a los que se les midió la densidad óptica a 280 nm para determinar la concentración de proteínas.

Las fracciones que se encuentren dentro del pico de elusión, se recolectaron en una misma fracción y fueron precipitadas con sulfato de amonio al 55% con agitación suave durante 12 horas a 4°C. El precipitado obtenido fue centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C y se resuspendió en tampón A sin aprotinina. Luego, se colocó ésta suspensión en una columna Sefarosa 6B (62 cm x 2 cm) previamente equilibrada con tampón A sin aprotinina. Se añadió el tampón A con un flujo de 0,26 ml/min a 4°C y nuevamente se colectaron fracciones de 4 ml en tubos de ensayo, a los que se les midió la densidad óptica a 280 nm para determinar la concentración de proteínas. Las fracciones dentro del pico de elución, fueron recolectadas en una misma fracción y precipitadas como se describió anteriormente. El precipitado se

centrifugó a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido y dializado contra PBS durante 12 horas a 4°C.

Adicionalmente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS para corroborar la pureza del plasminógeno. Otra muestra de plasminógeno se mezcló con 50 µl de PBS y 20 µl de sustrato cromogénico (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) de Sigma 3 mM para verificar que no fue activado durante el proceso de purificación (ésta reacción ocurre debido a que el sustrato es incoloro y se torna de color amarillo al ser degradado por la plasmina) y finalmente, se utilizó una muestra de plasminógeno para corroborar si es capaz de ser activado, añadiendo a 5 µl de plasminógeno 50 µl de PBS, 2 µl de estreptoquinasa 1 mg/ml (Pharmacia) y 20 µl de sustrato cromogénico S-2251 3 mM verificando el cambio de color al ser degradado por la plasmina.

El plasminógeno puro fue cuantificado por el método de Bradford, 1976, alicuotado y almacenado a -20°C para su uso posterior.

8.2. Unión de plasminógeno en las distintas fases de la curva de crecimiento de *Leishmania* spp.

Los promastigotes de *Leishmania* spp provenientes de cultivos en fase exponencial, fase estacionaria y/o sometidos a choque térmico, fueron lavados tres veces con PBS y centrifugados a 2.500 x g a 4°C durante 10 minutos. El último sedimento se resuspendió en un volumen mínimo de PBS, se realizó un conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer y se ajustó la densidad celular a $1,4 \times 10^8$ promastigotes/ml. Se incubaron los promastigotes por triplicado a una concentración de Plg de 2µM en PBS y BSA al 1% para un volumen final de 250 µl a temperatura

ambiente durante 1 hora y agitación constante. Adicionalmente, se incubaron los parásitos con ϵ -ACA 100mM, se centrifugaron a 1.500 x g a 4°C durante 10 minutos, se lavaron tres veces con PBS y el último sedimento fue resuspendido en PBS y estreptoquinasa (SK) (1 mg/ml). Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente, se midió la variación de la absorbancia a 405 nm en placas de ELISA al agregar el sustrato cromogénico.

8.3. Constante de disociación (K_d) de la unión *Leishmania* spp y el plasminógeno

Los promastigotes de *Leishmania* spp provenientes de cultivos en fase estacionaria fueron lavados tres veces con PBS y se centrifugaron a 2.500 x g durante 10 minutos a 4°C. El último sedimento fue resuspendido en un volumen mínimo de PBS, se realizó un conteo de los parásitos en la cámara de Neubauer y se ajustó la densidad celular a 5×10^8 promastigotes/ml. Los promastigotes se incubaron por triplicado con concentraciones de plasminógeno desde 0,05 hasta 4 μ M en PBS y BSA al 1% para un volumen final de 500 μ l, durante 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente y agitación constante. Luego, se centrifugaron a 1.500 x g durante 10 minutos a 4°C, se lavaron tres veces con PBS y el último sedimento se resuspendió con PBS en presencia de 100mM de ϵ -ACA durante 15 minutos. Se centrifugaron a 1.500 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se incubó con estreptoquinasa (1 mg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la variación de la absorbancia a 405 nm en placas de ELISA al agregar el sustrato cromogénico.

8.4. Unión de SMP-1 recombinante con el plasminógeno

La proteína recombinante fue diluida en PBS hasta obtener una concentración de 1 µg/ml, se colocó 50 µl (50 ng de SMP-1) de ésta solución en cada pozo de una placa de microtitulación (Maxisorp) durante 15 horas a 4°C. Se lavó tres veces la placa con tampón 1 (0,05% Tween 20 en PBS pH 7.4) por 5 minutos y se bloquearon los pozos con tampón 2 (0,05% Tween 20, 1mM EDTA, 0,25% gelatina en PBS pH 7.4) durante 12 horas a 4°C. Se lavaron tres veces los pozos con tampón 2 por 5 minutos y se colocaron concentraciones crecientes de plasminógeno humano con 1mM de PMSF, se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con tampón 2 y se incubó con un anticuerpo anti-plasminógeno humano hecho en conejo (dilución 1/2000 en tampón 2). Se lavaron tres veces como se describió anteriormente y se incubó con un anticuerpo anti-IgGs de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1/1000 en tampón 2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con tampón 2 y finalmente, se añadió 100 µl de una solución de orto-fenilendiamina (OPD) 2 mg/ml en tampón fosfato/citrato (0,05 M Na₂HPO₄, 0,03 M ácido cítrico, pH 5) con 0,12% de peróxido de hidrógeno y se midió la variación de absorbancia a 450 nm cada 50 segundos por 30 minutos.

8.5. Inhibición con ε-ACA de la interacción entre la proteína recombinante y el plasminógeno

El presente ensayo se realizó con la finalidad de determinar si la interacción de la proteína recombinante SMP-1 con el plasminógeno es mediada por sitios de unión a lisina. Consistió en sensibilizar una placa de microtitulación (Maxisorp) con una

concentración fija de la proteína recombinante (50 ng), luego se incubó con una solución 1 μ M de plasminógeno humano, 1mM de PMSF y concentraciones crecientes de ϵ -ACA (0,01-100 mM). Todo el experimento se realizó siguiendo el método descrito anteriormente hasta medir la variación de la absorbancia a 405 nm en la placa de ELISA al agregar el sustrato OPD.

8.6. Inhibición con carboxipeptidasa B de la interacción entre la proteína recombinante y el plasminógeno

El ensayo se realizó con la finalidad de determinar si el residuo de lisina localizado en el extremo C-terminal de la proteína SMP-1 recombinante, está involucrado en ésta interacción. Consistió en sensibilizar una placa de microtitulación (Maxisorp) con una concentración fija de la proteína recombinante (50 ng), luego se bloqueó con el tampón 2 (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.4, gelatina 0,25% p/v, Tween 20 0,05% v/v) durante toda la noche a 4°C; se lavó tres veces con el tampón 2 cada 5 minutos, se lavó tres veces con el tampón de la carboxipeptidasa B (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH: 7.65) cada 5 minutos, se incubó con carboxipeptidasa B porcina (Sigma) (50 U/pozo) a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavó tres veces con el tampón 2 cada 10 minutos, se incubó con 1 μ M de plasminógeno humano, 1mM de PMSF durante 2 horas, se lavó tres veces con el tampón 2 por 5 minutos cada uno, se incubó con un anticuerpo primario (anti-Plg 1/1000) durante 1 hora, se lavó tres veces con el tampón 2 por 10 minutos cada uno, se incubó con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa 1/10.000) durante 1 hora, se lavó tres veces con el tampón 2 por 10 minutos cada uno, se añadió el sustrato de la peroxidasa (OPD) para

el revelado y se midió la variación de la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro.

8.7. Ensayos de unión de las vesículas de membranas con el plasminógeno

La interacción del plasminógeno con las vesículas de membrana intactas fue realizado incubando las vesículas (0,1 mg) con 2 uM de plasminógeno en PBS-caseína al 1% a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 horas. Simultáneamente, se utilizaron controles: vesículas de membrana intactas sin incubar con plasminógeno e incubaciones con ϵ -ACA 100 mM y con anticuerpos anti SMP-1 (dilución 1:1000). Luego, se lavaron tres veces con PBS por ultracentrifugación en una centrífuga airfuge (Beckman) a 30 psi durante 30 minutos; se colocaron 2 ug de cada uno de los tratamientos en pozos de placas de ELISA, se incubó con un anticuerpo primario (anti-Plg 1/1000) durante 1 hora, se lavó tres veces con el tampón 2 por 10 minutos cada uno, se incubó con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa 1/10.000) durante 1 hora, se lavó tres veces con el tampón 2 por 10 minutos cada uno, se añadió el sustrato de la peroxidasa (OPD) para el revelado y se midió la variación de la absorbancia a 450 nm en en el espectrofotómetro.

9. Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial

El fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial se realizó según el método descrito por Concepción *et al.*, 1998 en el que el homogenato obtenido a partir de la ruptura de promastigotes de *Leishmania* spp. es sometido a

centrifugaciones sucesivas con gravedades crecientes con la finalidad de obtener diferentes componentes celulares de acuerdo con sus densidades: fracción nuclear (FN), fracción granular gruesa (FGG), fracción rica en glicosomas (FRG), fracción microsomal (FM) y fracción citosólica (FC).

La metodología consistió en someter los promastigotes de las 3 especies de *Leishmania* obtenidos de los cultivos en fase exponencial y/o fase estacionaria a un proceso de centrifugación a 3.000 x g a 4°C durante 20 minutos, se lavaron con tampón A (20mM Tris-HCl, 10mM KH₂PO₄, 5mM EDTA, 225 mM sacarosa, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, pH 7.2), luego se centrifugaron a 3.000 x g a 4°C por 20 minutos y el sedimento se resuspendió en tampón B (25mM Tris-HCl, 250 mM sacarosa, 2mM EDTA, 25mM NaCl, pH 7.2). Se centrifugó nuevamente a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C y el sedimento fue colocado en un mortero frío mantenido en hielo, al que se le adicionó carburo de silicio en una proporción 1:1 (p/p) y un volumen mínimo de tampón B con una mezcla de inhibidores (PMSF 200mM y cocktail de inhibidores de proteasas 1:1000).

La ruptura por abrasión mecánica se llevó a cabo hasta lograr alcanzar un 90% de células rotas que fue monitoreado por microscopía óptica de luz. Se dejó en reposo por 5-10 minutos para que sedimente el carburo de silicio. El sobrenadante se centrifugó a 300 x g por 3 minutos a 4°C para eliminar el carburo de silicio; ése sobrenadante (homogenato celular) se centrifugó a 1.000 x g por 5 minutos a 4°C para obtener la fracción nuclear (FN) y un sobrenadante libre de núcleos, el cual se centrifugó a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C para obtener la fracción granular gruesa (FGG) enriquecida en mitocondrias. El sobrenadante se centrifugó a 33.000 x g por

20 minutos a 4°C para obtener la fracción rica en glicosomas (FRG) y el sobrenadante corresponde al citosol con los microsomas, que se centrifugó a 100.000 x g por 2 horas a 4°C para obtener la fracción citosólica (sobrenadante) y la fracción microsomal (sedimento). La fracción microsomal fue resuspendida en un volumen mínimo de tampón C (50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1mM EDTA, pH: 7.4), 1 mM de PMSF con cocktail de inhibidores 1: 1000, fue alicuotada y almacenada a – 80°C para su uso posterior.

El fraccionamiento subcelular, fue de particular interés la obtención de la fracción microsomal de las tres especies de *Leishmania* en la búsqueda de nuevos receptores de plasminógeno en esas fracciones ricas en membrana, principalmente membrana plasmática, retículo endoplasmático liso y aparato de Golgi.

10. Inmunomicroscopía de fluorescencia

Se realizó inmunomicroscopía de fluorescencia con los parásitos permeabilizados con la finalidad de corroborar la localización de SMP-1. Se cultivaron promatigotes de *Leishmania* en medio LIT o Schneider hasta alcanzar la fase exponencial tardía, se colectaron por centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Luego, se resuspendió el sedimento en formaldehído al 4% durante 1,5 minutos, se centrifugó a 3000 x g durante 1,5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces el sedimento con PBS. Se realizaron diluciones hasta observar 10 parásitos por campo a 400X en un microscopio óptico. Se colocó 10 µl de la dilución de los parásitos sobre una lámina portaobjeto tratada con poli-L-lisina (dilución 1/10) y se dejó secar a temperatura ambiente. Se añadió PBS para hidratar durante 5

minutos y Tritón X-100 al 0,2% durante 20 minutos, se procedió a realizar nuevamente 3 lavados con PBS y se realizó un proceso de bloqueo con BSA al 3% más 50 mM de NH₄Cl en PBS durante 30 minutos en cámara húmeda. Se lavaron las láminas tres veces con PBS por 5 minutos y se inició la incubación con los anticuerpos primarios (anti SMP-1 y anti-tubulina) durante 1 hora. Se lavaron las láminas tres veces con PBS por 5 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti IgG de conejo acoplado a Cy3 y anti IgG de ratón acoplado a FITC) en la oscuridad durante 1 hora. Posteriormente, se lavaron las láminas cinco veces con PBS, se dejaron secar y finalmente se les añadió una solución de montaje DABCO 5% p/v, 90% glicerol en PBS. Las láminas fueron observadas en un microscopio Nikon.

11. Proteómica

Se realizó un análisis por proteómica de la fracción microsomal de *Leishmania* spp con la finalidad de identificar nuevas proteínas con capacidad de unión al plasminógeno humano. El procedimiento consistió principalmente en un proceso de isoelectroenfoque (primera dimensión) y una electroforesis en segunda dimensión.

11.1. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es una técnica que va a permitir separar las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. El isoelectroenfoque se realizó con las tiras IPG de tecnología BIORAD. La muestra fue colocada en un buffer IEF RH (Urea 8M, CHAPS 2%, anfolitos (3-10) 1%, Ditriotreitol (DTT) 40mM y agua desionizada) durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió DTT 40mM y 0,1% de

azul de bromofenol, se centrifugó a 16.5 g por 10 minutos y luego se tomó 125 µl de ésta muestra para depositarla en una tira IPG de 7, 10 o 14 cm con un rango de pH 3-10. Finalmente, se añadió aceite mineral para evitar la precipitación de la urea y se inició el proceso de isoelectroenfoque en un equipo Protean IEF Cell (BIORAD) durante un lapso de tiempo de aproximadamente 18 horas. Una vez completado la primera dimensión, la tira es retirada y colocada sobre el gel concentrador para realizar la segunda dimensión.

11.2. Electroforesis en Segunda Dimensión

La electroforesis bidimensional es una metodología que va a permitir la separación de las proteínas en función a su masa molecular. Una vez culminado el proceso de isoelectroenfoque, la tira IPG fue colocada en un tampón de equilibrio I (Urea 6M, 2% SDS, Tris-HCl 0,375M, 20% glicerol y DTT 130mM) durante 15 minutos y luego en un tampón de equilibrio II (Urea 6M, 2% SDS, Tris-HCl 0,375M, 20% glicerol y Iodoacetamida 300mM) por 15 minutos. La tira se colocó en un gel de poliacrilamida con SDS y se realizó la corrida electroforética a 100 V durante aproximadamente 2 horas. Posteriormente, el gel se colocó en una solución colorante con azul de Coomassie R 250 durante 30 minutos y fue sometido a un proceso de decoloración para la visualización de las *spots* proteicos.

Adicionalmente, se realizó Western blotting y ligand blotting del gel bidimensional usando la metodología descrita anteriormente y las proteínas con capacidad de unir plasminógeno pueden ser cortadas o extraídas del gel para su posterior identificación por espectrometría de masa.

11.3. Espectrometría de masas

Un Orbitrap es un analizador de masas que consiste en un electrodo exterior en forma de barril y un electrodo interior coaxial con forma de huso, que genera un campo electrostático con distribución potencial cuadro-logarítmica. Los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga; los iones dan vueltas alrededor del electrodo central y así los iones con una relación específica masa-carga se mueven en anillos oscilantes alrededor del huso central. La frecuencia de las oscilaciones es independiente de la velocidad del ión e inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga (m/z). Tiene un alto poder de resolución (200.000), rápida velocidad de escaneo, una alta precisión de masa (1-2 ppm) y sensibilidad, y un límite de detección en el orden de sub-fentomol (Hu *et al.*, 2005). Esto permite la detección de proteínas que se encuentren en bajas concentraciones así como analizar mezclas de proteínas más complejas y una mayor precisión en la determinación de la masa de los fragmentos peptídicos analizados.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. Estudio comparativo de la interacción del sistema fibrinolítico con *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*

www.bdigital.ula.ve

1. Purificación del plasminógeno humano

Se procedió a realizar la purificación del plasminógeno a partir de plasma sanguíneo humano, con la finalidad de llevar a cabo diversos ensayos asociados con la interacción de los promastigotes de *Leishmania* spp. en las diferentes fases de la curva de crecimiento.

El primer paso de purificación del plasminógeno consistió en realizar una cromatografía de afinidad utilizando una columna L-lisina Sefarosa 4B, en la cual plasminógeno quedó retenido en la resina y luego fue eluido con un compuesto análogo a la lisina, ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -ACA), que permitió obtener un grupo de fracciones conteniendo el plasminógeno (Figura 9).

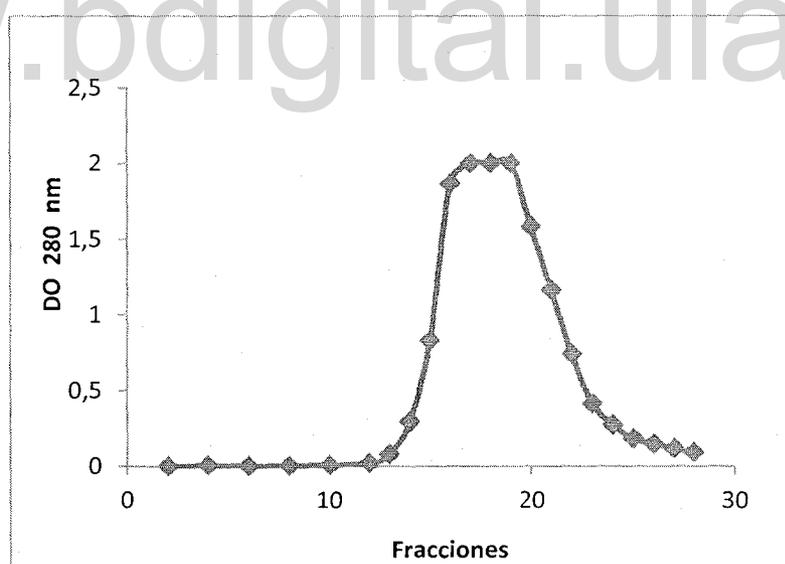


Figura 9. Perfil de elución del plasminógeno de una cromatografía de afinidad con una columna L-lisina Sefarosa 4B (dimensiones: 8 cm x 2,5 cm). El plasma humano fue sometido a una cromatografía de afinidad y el plasminógeno fue eluido con ácido ϵ -aminocaproico. Las fracciones (4,5 ml) fueron colectadas después de añadir el ácido ϵ -ACA. La densidad óptica fue medida en cada fracción a 280 nm.

Posteriormente, las proteínas contenidas en estas fracciones agrupadas fueron precipitadas con sulfato de amonio y sometidas a una cromatografía de exclusión molecular en una columna Sefarosa 6B, mediante la cual se obtuvo un nuevo grupo de fracciones (31-40) que contenía al plasminógeno (Figura 10). Se realizó una segunda precipitación con sulfato de amonio y luego un proceso de diálisis que permitió obtener el plasminógeno con alto grado de pureza.

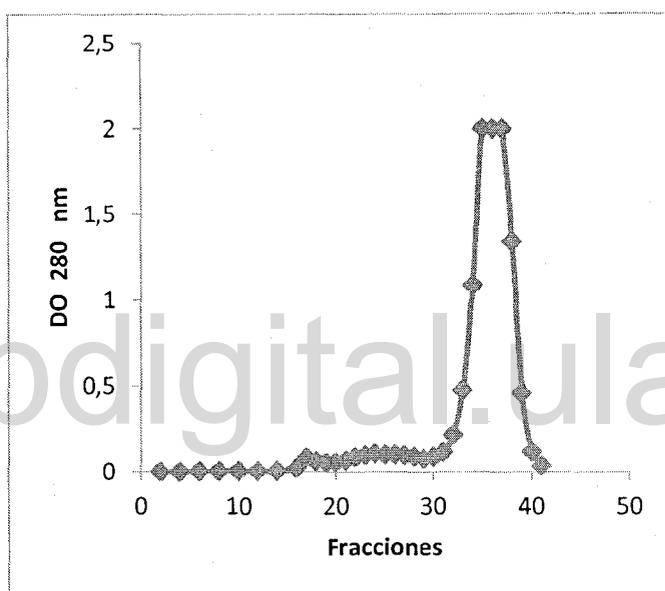


Figura 10. Perfil de elución del plasminógeno de una cromatografía de exclusión molecular con una columna Sefarosa 6B (dimensiones: 58 cm x 2 cm). Las fracciones agrupadas obtenidas mediante cromatografía de afinidad, fueron precipitadas y sometidas a una cromatografía de exclusión molecular para obtener un nuevo grupo de fracciones se sometieron a un proceso de precipitación y posteriormente de diálisis, que permitió obtener el plasminógeno puro.

Finalmente, se determinó la concentración de proteínas del plasminógeno y mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes se constató la pureza del plasminógeno. Adicionalmente, se

corroboró que el plasminógeno fuera activable por el activador estreptoquinasa (SK) con el uso del sustrato cromogénico para la plasmina.

1.1. Unión de plasminógeno en tres especies de *Leishmania*: *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*.

Se realizaron ensayos de unión al plasminógeno en las distintas fases de la curva de crecimiento de tres especies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*), basados en el conocimiento previo que los promastigotes en fase estacionaria y los sometidos a choque térmico constituyen las formas del parásito con mayor capacidad de unión al plasminógeno (Calcagno *et al.*, 2002).

El análisis de la densidad óptica a 600 nm, realizado diariamente del crecimiento de los promastigotes en medio Schneider a 28°C en agitación, permitió obtener los promastigotes en las diferentes fases de la curva de crecimiento: fase exponencial y fase estacionaria. Adicionalmente, los parásitos en las distintas fases fueron sometidos a choque térmico durante 12 horas a 32°C, lo que indujo una diferenciación de los promastigotes hacia morfotipos conocidos como amastigotes *like*, que es la forma más cercana a los verdaderos amastigotes que constituyen la forma clínicamente relevante. La unión de plasminógeno de los promastigotes en las distintas fases de la curva de crecimiento y los sometidos a choque térmico, se determinó directamente en un ensayo midiendo la actividad plasmina, generada al activar el plasminógeno con la estreptoquinasa, evidenciándose por la hidrólisis del sustrato cromogénico, que es específico para la plasmina.

1.2. Constante de disociación (K_d) de la unión de plasminógeno con las tres especies de *Leishmania*.

A las formas de los promastigotes que resultaron tener mayor capacidad de unión al plasminógeno (promastigotes en fase estacionaria y los sometidos a choque térmico), se les determinó la constante de disociación o (K_d) con la finalidad de dilucidar si realmente existen diferencias en la capacidad de unión al plasminógeno entre las tres especies de *Leishmania*, es decir, conocer si los K_d de *L. braziliensis* y de *L. infantum* son iguales o diferentes al K_d reportado para *L. mexicana*, además de dilucidar si se encuentran dentro del rango fisiológico de la concentración de plasminógeno sanguíneo. Para determinar la constante de disociación, los promastigotes de *Leishmania* spp. en fase estacionaria, fueron incubados con concentraciones crecientes de plasminógeno (0-4 μ M), luego sometido a varios lavados y el sedimento se incubó con ϵ -ACA para disociar el plasminógeno unido, posteriormente, al sobrenadante se le añadió estreptoquinasa y sustrato cromogénico para medir la actividad plasmina a 405 nm/min. Los resultados obtenidos de la cinética fueron procesados con el propósito de realizar las curvas de unión para dilucidar la afinidad de los receptores presentes en la superficie de los parásitos con el plasminógeno.

Una vez realizadas las curvas de unión plasminógeno-*Leishmania* spp., se utilizó el programa Sigma Plot versión 7.0, que permitió realizar una regresión no lineal (con la ecuación de una hipérbola) para determinar los valores de K_d y el número de sitios de unión por célula para las tres especies de *Leishmania* (Figura 11, 12 y 13).

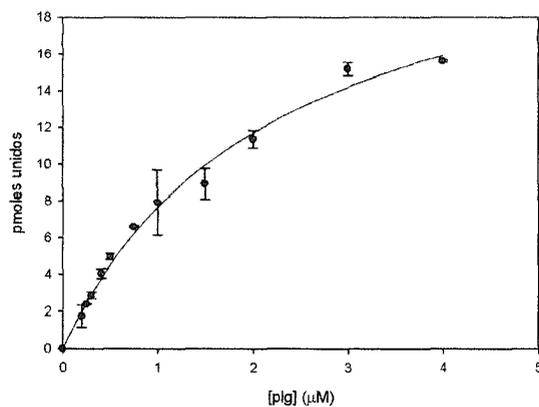


Figura 11. Unión del plasminógeno con los promastigotes de *L. mexicana*. Plg: plasminógeno.

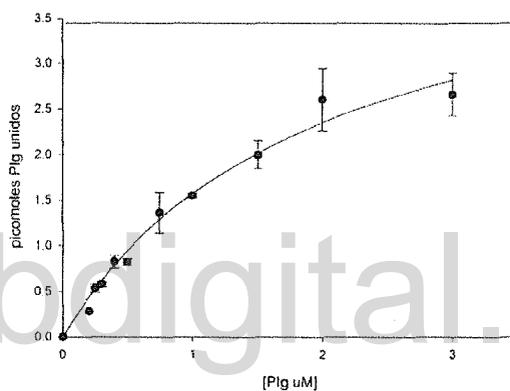


Figura 12. Unión del plasminógeno con los promastigotes de *L. braziliensis*. Plg: plasminógeno.

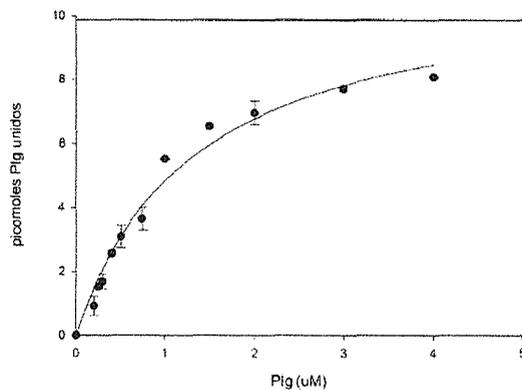


Figura 13. Unión de plasminógeno de los promastigotes de *L. infantum*. Plg: plasminógeno.

En la Tabla IV, se resumen los resultados obtenidos en relación a los K_d y las moléculas de plasminógeno que puede unir cada parásito en las tres especies de *Leishmania*. En este sentido, se puede observar que los K_d se encuentran en el mismo orden de magnitud (μM), es decir no hay diferencias considerables en la capacidad de unión al plasminógeno entre las especies de *Leishmania* estudiadas, tal como se muestra en la Tabla IV. Estos hallazgos sugieren que a pesar de existir diferencias en relación a las manifestaciones clínicas, su comportamiento es similar con respecto a la capacidad de interacción con el plasminógeno humano.

Tabla IV. Constante de disociación o K_d de *Leishmania* spp.

<i>Leishmania</i>	K_d (μM)	Moléculas plasminógeno/parásito
<i>L. mexicana</i>	2.22	1.98×10^5
<i>L. braziliensis</i>	1.34	0.91×10^5
<i>L. infantum</i>	1.96	0.37×10^5

2. Fracción microsomal obtenida de promastigotes de *Leishmania* spp en fase estacionaria.

Los ensayos para determinar la constante de disociación están íntimamente relacionados con los receptores de plasminógeno que se encuentran en la membrana plasmática de los parásitos, por lo tanto, una manera de obtener esas fracciones ricas en membrana, fue realizando un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial como se describió previamente en la sección de metodología, con la finalidad de buscar posibles candidatos receptores en membrana que tengan la capacidad de unir plasminógeno.

Mediante el fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial, se logró obtener diferentes fracciones enriquecidas: fracción nuclear, fracción granular gruesa rica en mitocondrias, fracción rica en glicosomas, fracción microsomal y el citosol de las tres especies de *Leishmania*.

Las fracciones microsomales de *Leishmania* spp. fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes tal como se muestra en la Figura 14. Se puede observar un perfil de bandas proteicas similar entre *L. mexicana* y *L. braziliensis*, destacándose la presencia de dos bandas mayoritarias de 65 kDa y 50 kDa presentes también en *L. infantum* y una banda minoritaria cercana a los 28 kDa. Sin embargo, cabe señalar que el perfil de bandas proteicas en *L. infantum* es diferente al de las especies causantes de manifestaciones cutáneas y mucocutáneas, respectivamente.

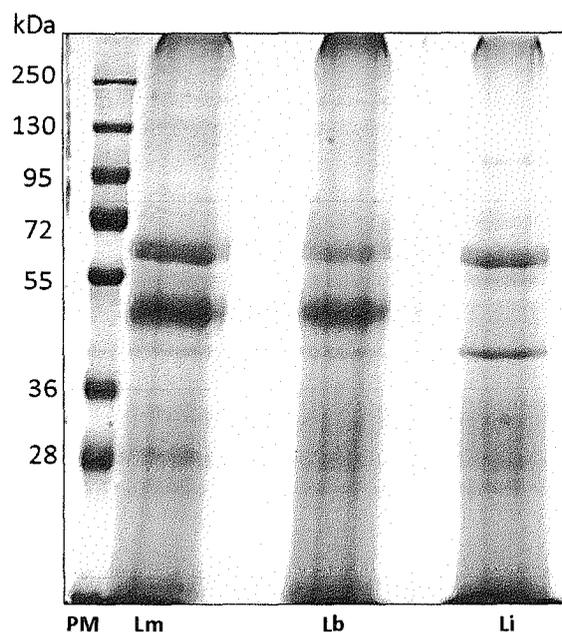


Figura 14. Fracción microsomal de las tres especies de *Leishmania*. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 12%. **PM:** marcadores de peso molecular (kDa), **Lm:** *L.mexicana*, **Lb:** *L. braziliensis* y **Li:** *L. infantum*

2.1. Proteómica de la fracción microsomal de *L. mexicana*

Se realizó un análisis proteómico de la fracción microsomal de *L. mexicana*, que consistió principalmente en un proceso de isoelectroenfoque (primera dimensión) utilizando una tira IEF en un gradiente lineal de pH entre 3-10, mediante el cual se separaron las proteínas en función de su punto isoeléctrico y posteriormente, estas proteínas fueron sometidas a una electroforesis en segunda dimensión que permitió la separación de las mismas en función de su masa molecular.

En la Figura 15, se puede observar el gel que corresponde al perfil de proteínas individuales obtenidas de la fracción microsomal de *L. mexicana*, sus posiciones relativas y sus intensidades. Aproximadamente se pueden visualizar 65 spots,

distribuidos en un rango de masa molecular entre 15 y 50 kDa y en un rango de punto isoelectrico que va principalmente desde 3.5 a 7.5.

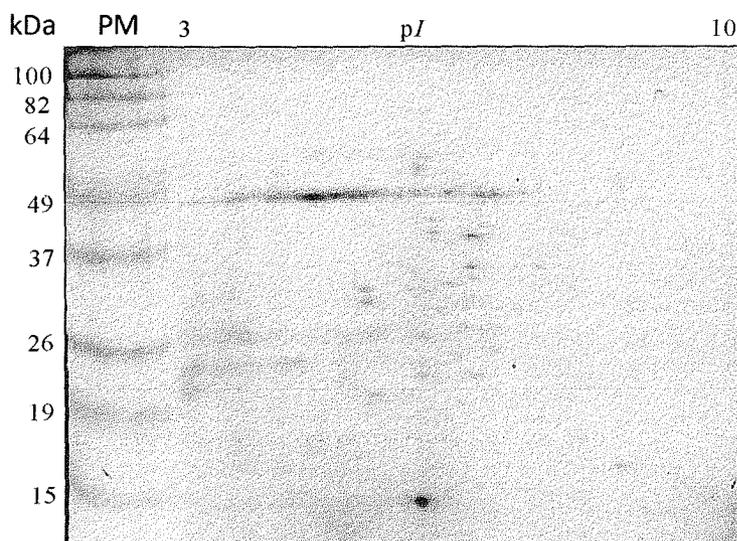


Figura 15. Electroforesis Bidimensional de la fracción microsomal de *L. mexicana*. Gel de poliacrilamida con SDS al 15%, tira de isoelectroenfoque con un rango de pH 3-10, *pI*: punto isoelectrico, *PM*: marcadores de peso molecular (kDa). La fracción microsomal fue sometida a una electroforesis bidimensional y posteriormente, el gel fue teñido con Coomassie coloidal.

En la búsqueda de nuevos receptores de plasminógeno en la fracción microsomal de *L. mexicana*, las proteínas individuales obtenidas en la electroforesis bidimensional fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante la técnica de Western blotting y luego fueron sometidas a un Ligand blotting utilizando plasminógeno como ligando y revelado con el sustrato de la fosfatasa alcalina. El resultado del Ligand blotting revelado con fosfatasa alcalina, se muestra en la Figura 16, donde se puede apreciar la presencia de una proteína individual de moderada intensidad que tiene la capacidad de unir plasminógeno y que se corresponde con una masa molecular aproximada de 15 kDa.

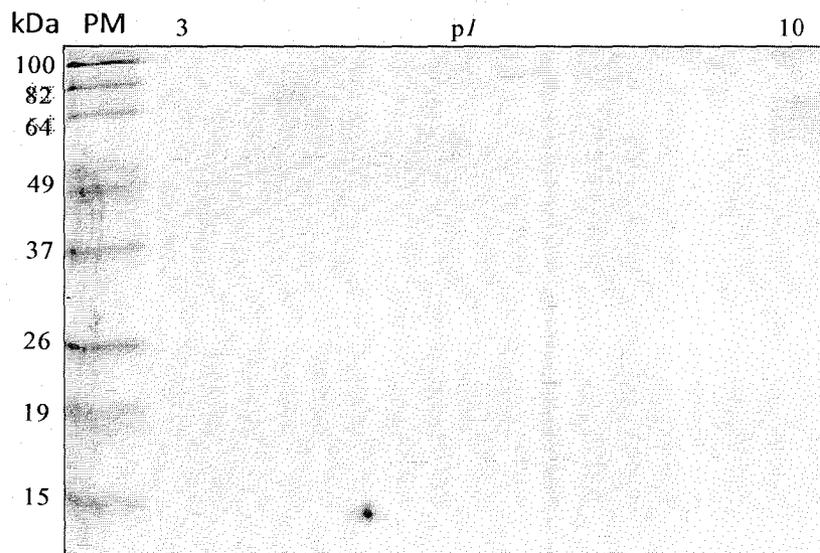


Figura 16. Ligand blotting de la Electroforesis Bidimensional de la fracción microsomal de *L. mexicana*. Gel de poliacrilamida con SDS al 15% , tira de isoelectroenfoque con un rango de pH 3-10, *pI*: punto isoelectrónico, *PM*: marcadores de peso molecular (kDa). La fracción microsomal fue sometida a una electroforesis bidimensional y posteriormente a un ligand blotting utilizando plasminógeno como ligando. La unión de plasminógeno fue revelado mediante un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina.

www.bdigital.ula.ve

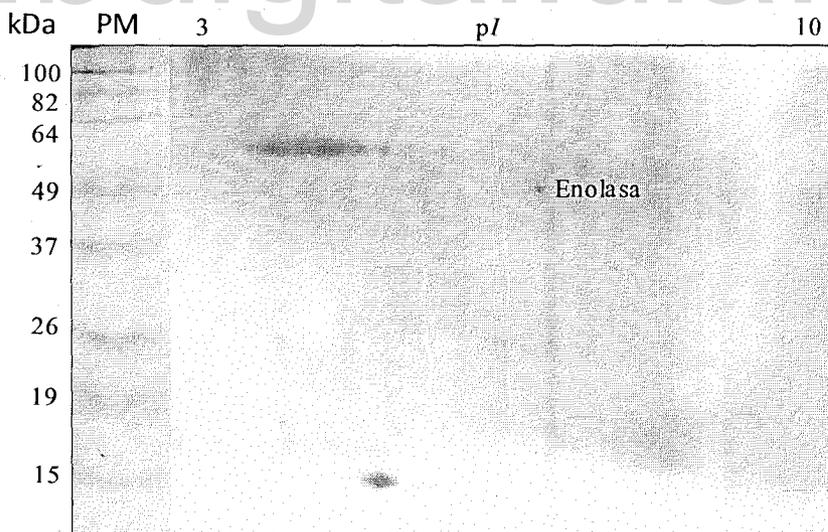


Figura 17. Ligand blotting de la Electroforesis Bidimensional de la fracción microsomal de *L. mexicana*. Gel de poliacrilamida con SDS al 15% , tira de isoelectroenfoque con un rango de pH 3-10, *pI*: punto isoelectrónico, *PM*: marcadores de peso molecular (kDa). La fracción microsomal fue sometida a una electroforesis bidimensional y posteriormente a un ligand blotting utilizando plasminógeno como ligando. La unión de plasminógeno fue revelado mediante la técnica de quimioluminiscencia con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

Adicionalmente, se ensayó el método de quimioluminiscencia para el revelado del Ligand blotting utilizando peroxidasa, que resultó ser más sensible, permitiendo visualizar otras proteínas con capacidad de unión al plasminógeno, entre ellas enolasa, corroborada por un Western blotting (Figura 17).

En síntesis, el análisis realizado por Ligand blotting utilizando plasminógeno como ligando, permitió demostrar la presencia de varias proteínas en la fracción microsomal de *L. mexicana* que tienen la capacidad de unir plasminógeno humano. Sin embargo, es importante destacar que en todos los ensayos realizados, se visualizó una proteína de bajo peso molecular que coincide con la misma masa molecular (15 kDa) de la proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1), previamente identificada por espectrometría de masas en las vesículas de membranas secretadas por *Leishmania* spp (ver capítulo II). En este sentido, con la finalidad de corroborar si ese punto correspondía a la proteína SMP-1, se seleccionó una de las membranas de PVDF que contenía las proteínas transferidas de la electroforesis bidimensional sometidas al ligand blotting y a esa membrana se le realizó un “stripping” para remover anticuerpos y otros ligandos asociados a las proteínas unidas a la membrana. Luego se logró identificar mediante un Western blotting utilizando el anticuerpo anti-SMP1 que la proteína de bajo peso molecular de 15 kDa con capacidad de unión al plasminógeno corresponde a la proteína miristoilada pequeña 1 (Figura 18).

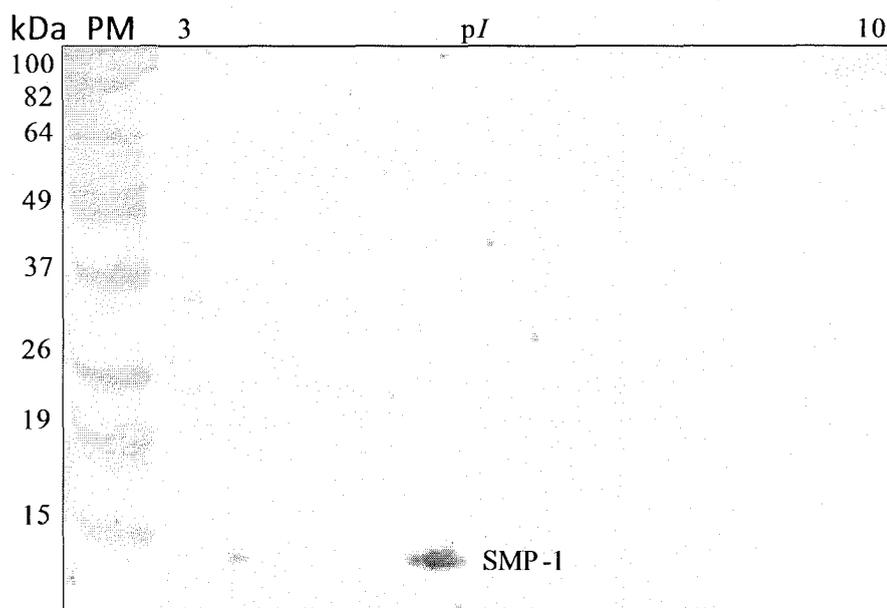


Figura 18. Western blotting de la fracción microsomal de *L. mexicana* obtenida de la Electroforesis Bidimensional donde se confirma la presencia de SMP-1. Gel de poliacrilamida con SDS al 15% , tira de isoelectroenfoque con un rango de pH 3-10, **pI**: punto isoeléctrico, **PM**: marcadores de peso molecular (kDa). La fracción microsomal fue sometida a una electroforesis bidimensional y posteriormente se realizó un Western blotting, cuya membrana fue incubada con los anticuerpos policlonales anti SMP-1 y revelado con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina. Este ensayo permitió confirmar la presencia de la proteína SMP-1 en la fracción microsomal de *L. mexicana*.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, los ensayos de unión de plasminógeno en las distintas fases de la curva de crecimiento de tres especies de *Leishmania*, permitieron corroborar que los promastigotes en fase estacionaria y los promastigotes sometidos a choque térmico, constituyen las formas del parásito con mayor capacidad de unión al plasminógeno humano. Estos hallazgos coinciden con los reportados previamente por Calcagno *et al.*, 2002, quienes estudiaron sistemáticamente la interacción del plasminógeno con los diferentes morfotipos de *L. mexicana*, destacando la mayor interacción con los promastigotes que adoptan formas redondeadas u ovoides con o sin flagelo visualizadas por inmunotinción. Asimismo, demostraron que los amastigotes aislados de lesiones de hámster, tienen también la capacidad de unir plasminógeno (Calcagno *et al.*, 2002).

En el orden de establecer las implicaciones fisiológicas asociadas con la mayor capacidad de interacción de los promastigotes en fase estacionaria y los sometidos a choque térmico con el plasminógeno en *Leishmania* spp., se cuentan con evidencias obtenidas por diferentes investigadores. Mullane y Baker, 1999 señalaron un incremento de la expresión de los receptores de plasminógeno durante la apoptosis, sugiriendo un posible rol del plasminógeno en este proceso celular. Basados en estos resultados, cabe destacar que los promastigotes en fase estacionaria, son parásitos envejecidos cuya condición favorece la transformación hacia formas infectivas y que están sometidos a stress por el agotamiento de los nutrientes, lo que podría inducir en un gran número de ellos a un proceso de apoptosis, tal como fue demostrado por Zangger *et al.*, 2002 en promastigotes en fase estacionaria de *L. major* y *L. mexicana*.

Por otra parte, el choque térmico también constituye un factor generador de stress en los promastigotes, cuya respuesta es un mecanismo homeostático que protege a las células del efecto deletéreo del incremento de la temperatura y que a su vez induce apoptosis como fue reportado por Moreira *et al.*, 1996 en promastigotes de *L. amazonensis*, al demostrar que los parásitos sometidos a choque térmico presentaron características ultraestructurales y moleculares de células apoptóticas. De acuerdo a lo planteado anteriormente, sería importante realizar a futuro ensayos que nos permitan discernir si en éstas condiciones de stress se encuentran subpoblaciones de parásitos apoptóticos que podrían estar implicados en la unión de plasminógeno y dilucidar si les confiere alguna ventaja en potenciar la capacidad de infección al hospedador. Otra posibilidad podría atribuirse a la presencia de promastigotes altamente virulentos en la fase estacionaria con gran potencial para transmitir la enfermedad, aunado a la existencia de promastigotes metacíclicos. Esto es muy interesante al analizarlo desde el punto de vista fisiológico de la interacción parásito-hospedador, debido a que los promastigotes metacíclicos constituyen las formas infectivas que inocula el vector en el hospedador, por lo tanto, una vez que penetran serían capaces de unir plasminógeno facilitando así el proceso de invasión y diseminación. Asimismo, Van Zandbergen *et al.*, 2006, reportaron que el desarrollo de la Leishmaniasis depende estrictamente de la presencia de promastigotes apoptóticos en el inóculo virulento de *L. major*, quienes encontraron una subpoblación de parásitos apoptóticos caracterizados por tener forma redondeada, condensación nuclear y kinetoplasto hinchado, los cuales indujeron *in vitro* la secreción del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) mediante el silenciamiento de los macrófagos, conllevando a la

sobrevivencia de la subpoblación de los parásitos virulentos. Resultados similares fueron reportados por Wanderley *et al.*, 2009 en *L. amazonensis*, quienes describieron que existe una cooperación entre los promastigotes apoptóticos y los promastigotes metacíclicos, estrategia conocida como mimetismo apoptótico, el cual desempeña un papel muy importante en la transmisión e incremento de la patogénesis de la Leishmaniasis (Alfonzo *et al.*, 2008; Wanderley y Barcinsky, 2010; El-Hani *et al.*, 2012).

El rol fisiológico de la interacción de *Leishmania* spp. con el plasminógeno aun no está claro, debido a que es un parásito intracelular que vive en el interior de los macrófagos. Una posible explicación es que cuando el flebótomo infectado pica a un hospedero susceptible inocular las formas infectivas (promastigotes metacíclicos) y en el sitio de inoculación se produce una respuesta inflamatoria como mecanismo de defensa del hospedero, hay un incremento de la permeabilidad capilar, reclutamiento de macrófagos y formación de una red de fibrina que desfavorece el encuentro de los parásitos con el macrófago. Luego, los promastigotes con sus receptores de plasminógeno presentes en la superficie celular, secuestran el plasminógeno del hospedero y el t-PA que se encuentra en la piel y activan el plasminógeno, transformándolo en plasmina, lo que le va a permitir degradar la fibrina, facilitando el encuentro con el macrófago. En este sentido, Maldonado *et al.*, 2006, con la finalidad de demostrar la función que desempeña la unión del plasminógeno en *L. mexicana*, realizaron ensayos con ratones knock-out para el plasminógeno ($\text{plg}^{-/-}$), encontrando que los parásitos se limitaron a focos aislados, tenían menor capacidad de infección y

se observó depósitos de fibrina en el tejido; en contraste, en los ratones controles se observó un patrón disperso de los parásitos.

En el caso de las formas amastigotes en el hospedero mamífero, la posibilidad de interaccionar con el plasminógeno humano es en el momento cuando son liberados del macrófago y en el hospedero invertebrado (flebotomo), la unión de plasminógeno probablemente desempeña un papel fisiológico a pesar de que estos parásitos no necesitan atravesar el epitelio del intestino del vector, pero si requieren digerir el coágulo sanguíneo y escapar de la matriz peritrófica originada para realizar el proceso de digestión (Handman, 2000). Por lo tanto, la actividad proteasa derivada del plasminógeno del hospedero mamífero, localizada en la superficie de los amastigotes ingeridos por el vector, podría ser utilizada para degradar fibrina y otras proteasas secretadas.

Por otra parte, en relación a los ensayos de la constante de disociación (K_d), se observó que no existen diferencias considerables entre los K_d determinados en las tres especies de *Leishmania* estudiadas, debido a que se encuentran dentro del mismo orden de magnitud (μM), lo que nos indica que no existen diferencias en la capacidad de unión al plasminógeno entre estas especies de *Leishmania*, sugiriendo que a pesar de producir manifestaciones clínicas diferentes, su comportamiento es similar con respecto a la capacidad de interacción con el plasminógeno humano. Cabe destacar que en el caso de *L. mexicana*, el valor de K_d es similar al reportado por Avilán *et al.*, 2000.

Con la finalidad de buscar nuevos candidatos receptores de plasminógeno en la membrana plasmática, se obtuvo la fracción microsomal de las tres especies de

Leishmania. Esta corresponde a una fracción enriquecida en membranas, principalmente de membrana plasmática, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, visualizándose un patrón de bandas proteicas similar entre las especies causantes de las manifestaciones cutáneas (Figura 14). Al realizar una electroforesis bidimensional de la fracción microsomal, se lograron observar proteínas individuales y mediante la técnica de Ligand blotting se demostró la presencia de proteínas con capacidad de unión al plasminógeno (enolasa y LACK). Adicionalmente, es importante mencionar que en el estudio realizado en las vesículas de membrana de *L. mexicana*, la proteína con capacidad de unión al plasminógeno detectada en los exosomas, fue identificada por espectrometría de masas como una proteína miristoilada pequeña (SMP-1), con la cual se produjeron los anticuerpos policlonales y finalmente, se logró corroborar que esa proteína de bajo peso molecular (15 kDa) observada inicialmente en los Ligand blotting obtenidos de los geles bidimensionales de la fracción microsomal de *L. mexicana* efectivamente correspondía a la proteína SMP-1.

En síntesis, las tres especies de *Leishmania* estudiadas: *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*, son capaces de unir plasminógeno con la misma afinidad. En la fracción microsomal de *L. mexicana*, se identificaron tres proteínas con capacidad de unión al plasminógeno humano: enolasa, LACK y SMP-1.

RESULTADOS

CAPÍTULO II. Estudio de la interacción del sistema fibrinolítico con vesículas de membranas secretadas por *Leishmania* spp.

www.bdigital.ula.ve

1. Caracterización de las vesículas de membrana secretadas

Las vesículas de membrana secretadas por los promastigotes de *L. mexicana* fueron obtenidas por ultracentrifugación, tal como se describió detalladamente en la sección de metodología. Estas fueron utilizadas en diferentes ensayos con la finalidad de realizar una caracterización de las mismas, abordando aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares.

1.1. Morfología de las vesículas de membrana secretadas

Las vesículas de membrana secretadas fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (MET), con la finalidad de evaluar los aspectos ultraestructurales de las mismas. En la Figura 19, se puede visualizar una población heterogénea de vesículas de formas redondeadas, electrón-densas, con tamaños que oscilan entre 50 a 600 nm, algunas de estas con características ultraestructurales semejantes a los exosomas secretados por diferentes células (Qu *et al.*, 2009, Duijvesz *et al.*, 2011). Las vesículas de membrana secretadas fueron obtenidas en el inicio de la fase estacionaria, sugiriendo que la mayor parte, podrían corresponder a exosomas, aunque no se descarta que esa heterogeneidad sea debido a la presencia de vesículas de otros orígenes: microvesículas de desprendimiento y cuerpos apoptóticos (Théry *et al.*, 2009, Mathivanan *et al.*, 2010). Adicionalmente, se observaron estructuras similares a cuerpos multivesiculares (Figura 20), localizadas en el bolsillo flagelar de los promastigotes de *L. mexicana* sometidos a un proceso de secreción.

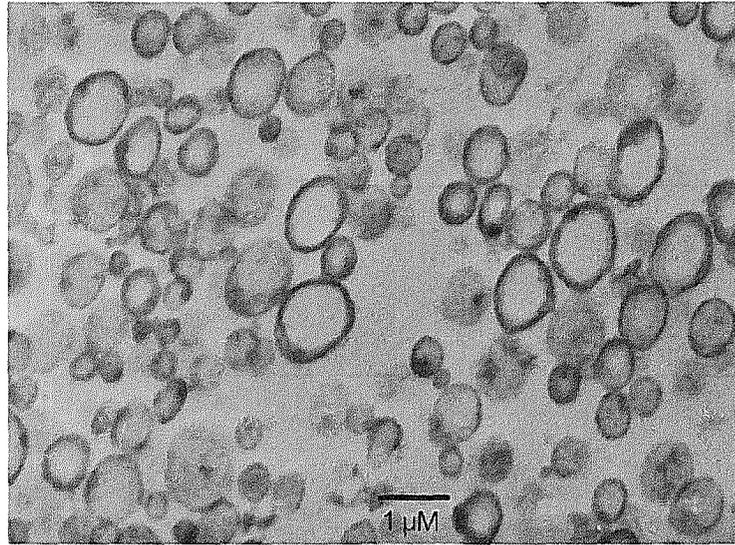


Figura 19. Microscopía electrónica de transmisión de las vesículas de membrana secretadas por *L. mexicana*. Formas redondeadas, electrón-densas y de tamaños heterogéneos (50-600 nm).

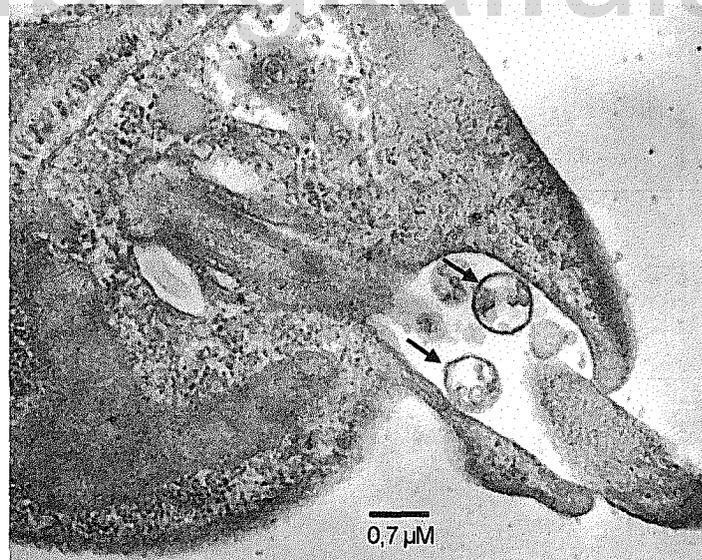


Figura 20. Microscopía electrónica de transmisión de promastigotes de *L. mexicana*. Se observan cuerpos multivesiculares presentes en el interior del bolsillo flagelar.

Asimismo, se logró observar la formación de vesículas brotando o desprendiéndose de la membrana plasmática del parásito durante el proceso de secreción, tal como se muestra en la Figura 21, estructura con un tamaño superior a los 1000 nm de diámetro.



Figura 21. Microscopía electrónica de transmisión de las vesículas o brotes que emergen de la membrana plasmática, visualizado en promastigotes de *L. mexicana*.

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* fueron analizados antes y después del proceso de secreción, por microscopía electrónica de barrido (MEB). El análisis permitió dilucidar diferencias notorias y evidentes en la morfología externa de los parásitos, específicamente, cambios en la superficie después de ser sometidos a un proceso de secreción, destacando la presencia de numerosas exovesículas adosadas a lo largo de todo el cuerpo; en contraste, a los promastigotes antes del proceso de

secreción, los cuales presentaron una superficie lisa a lo largo de todo el cuerpo fusiforme. Estas diferencias se muestran en las Figuras 22 y 23.

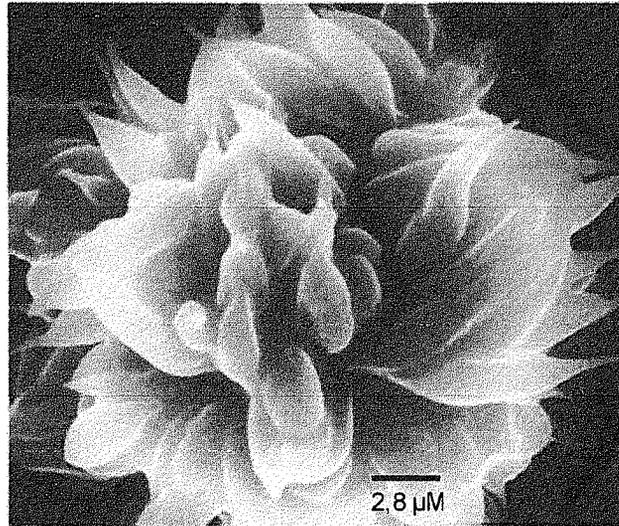


Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de los promastigotes de *L. mexicana* antes del proceso de secreción.

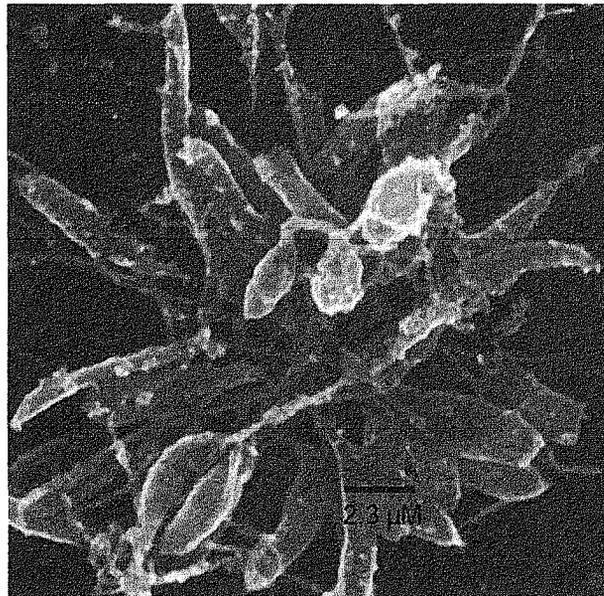


Figura 23. Microscopía electrónica de barrido de los promastigotes de *L. mexicana* después del proceso de secreción.

1.2. Purificación de las vesículas de membrana secretadas

Se logró la purificación de las vesículas de membrana de las tres especies de *Leishmania*: *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*. Después de someter los parásitos a un proceso de secreción en el medio mínimo RPMI, sin agitación a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, después de varias centrifugaciones se colectó el sobrenadante y se sometió a un proceso de ultracentrifugación hasta obtener la fracción correspondiente a las vesículas de membrana secretadas.

Las vesículas de membrana fueron colectadas cuando los parásitos alcanzaron una densidad óptica de 0.9 (inicio de la fase estacionaria), correspondiente a 7×10^8 células/ml. El contenido de proteínas obtenido por cada 60 ml de cultivo fue de 40 ± 0.12 µg. Para examinar la integridad de los parásitos durante el proceso de secreción, se realizaron tinciones con el colorante azul de tripano, evidenciándose una viabilidad del 98%, lo que permitió indicar que la presencia de proteínas en el sobrenadante del cultivo, corresponde al producto de un mecanismo de secreción y no a una disrupción de la membrana plasmática debido a la lisis de los parásitos, sin embargo, no se descarta que la preparación contenga vesículas de diversos orígenes.

Con la finalidad de comparar el patrón de bandas proteicas de las vesículas de membrana secretadas de las tres especies de *Leishmania*, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, tal como se muestra en la Figura 24.

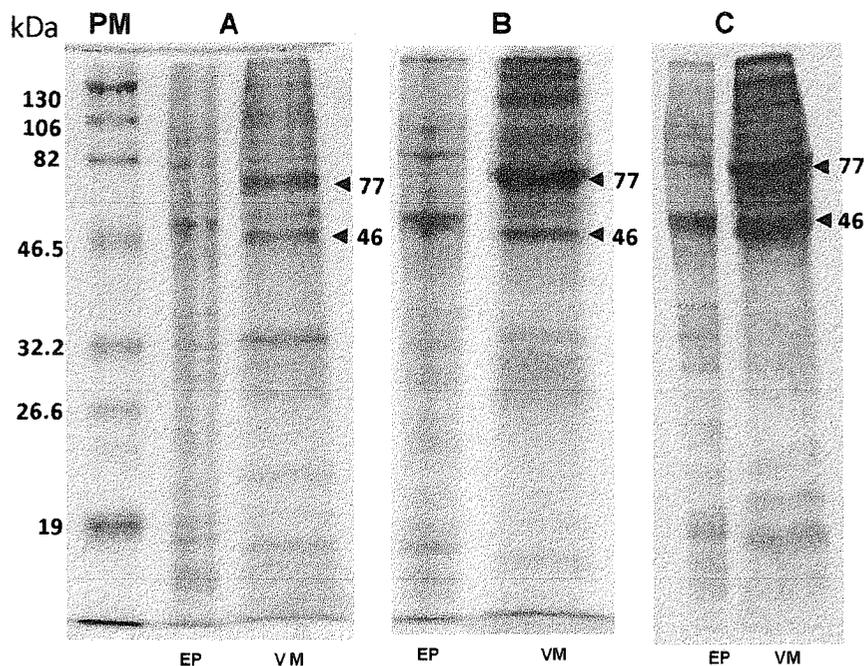


Figura 24. Patrón de bandas proteicas de *Leishmania* spp. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. **A:** *L. mexicana*, **B:** *L. braziliensis*, **C:** *L. infantum*. **PM:** marcadores de peso molecular (kDa), **EP:** extracto de parásitos, **VM:** vesículas de membrana, las flechas señalan las bandas proteicas mayoritarias.

El patrón de bandas proteicas de las vesículas de membrana resultó ser relativamente similar entre las tres especies de *Leishmania*, observándose mayoritariamente la presencia de proteínas en el orden de los 77 y 46 kDa, difiriendo del patrón de bandas proteicas presentes en el extracto de los parásitos.

1.3. Caracterización bioquímica de las vesículas de membrana secretadas

Las proteínas presentes en las vesículas de membrana de *L. mexicana* obtenidas de la corrida electroforética fueron evaluadas por Western blotting con la finalidad de determinar la presencia de algunas proteínas, entre ellas marcadores de exosomas en

diversos organismos en general, receptores de plasminógeno, proteínas de secreción que han sido previamente reportadas y, proteínas de la glicólisis, entre otras. Para ello, las vesículas fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF) e incubadas con diferentes anticuerpos policlonales disponibles en el Laboratorio de Fisiología Animal y Enzimología de Parásitos de la Facultad de Ciencias de la ULA.

El análisis realizado con los anticuerpos (Figura 25), reveló la presencia de proteínas que participan en diversos procesos biológicos: (i) El factor de elongación 1 alfa (Figura 25A), asociado con la síntesis de proteínas, constituye un marcador exosomal en células de mamíferos (Théry *et al.*, 1999, Soo *et al.*, 2012) y también ha sido reportado en exosomas de *Leishmania* spp. (Silverman *et al.*, 2010, Lambertz *et al.*, 2012). (ii) Enolasa (Figura 25B), enzima relacionada con el metabolismo de carbohidratos e identificada como una proteína de unión a plasminógeno en muchas células y organismos patógenos, incluyendo a *L. mexicana* (Vanegas *et al.*, 2007). (iii) El receptor de proteína quinasa C activada (LACK), visualizándose una señal débil (Figura 25C). Este receptor está implicado en procesos de transducción de señales, ha sido obtenido tanto en el secretoma como en el medio condicionado de parásitos del género *Leishmania* (Cuervo *et al.*, 2009, Hassani *et al.*, 2011) y también constituye un receptor de plasminógeno en *L. mexicana* (Gómez-Arreaza *et al.*, 2012). Adicionalmente, se demostró la presencia de dos enzimas importantes de la glicólisis: fosfoglicerato quinasa (PGK) (Figura 25D) y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) glicosomal (Figura 25E). Otra proteína encontrada en las vesículas fue la

glicoproteína 63 (GP63) (Figura 25F), conocida como un factor de virulencia en *Leishmania* y como una proteína de secreción. Es importante señalar que en el caso de GP63, se visualizaron dos isoformas en el extracto de parásitos antes del proceso de secreción, y una sola forma de GP63 en el extracto de parásitos después del proceso de secreción (Figura 25F). También se evaluó la presencia de la enzima glucoquinasa (GlcK), proteína presente exclusivamente en el glicosoma, detectándose solo en el extracto de los parásitos.

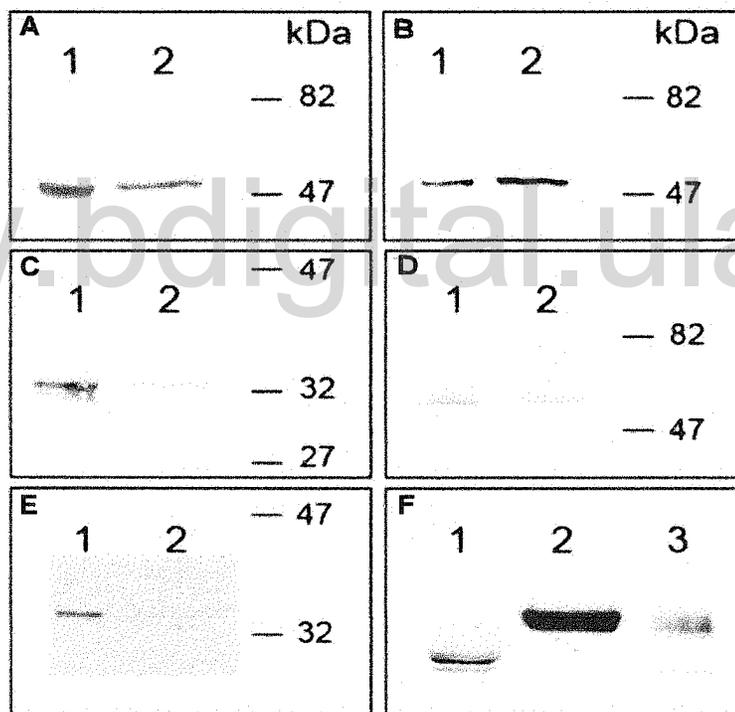


Figura 25. Western blotting de las vesículas de membrana de *L mexicana* revelado con diferentes anticuerpos de parásitos de la familia *Trypanosomatidae*. A: anti-factor de elongación 1 alfa de *T.evansi*, B: anti-enolasa de *L. mexicana*, C: anti-LACK de *L.mexicana*, D: anti-PGKc de *T. cruzi*, E: anti-GAPDH de *T. brucei* y F: anti-GP63 de *L. mexicana*. 1: extracto de parásitos, 2: vesículas de membrana, 3: extracto de parásitos antes de secretar.

1.4. Interacción de las vesículas de membrana con el plasminógeno humano

Se realizaron ensayos de unión *in vitro* con la finalidad de determinar si las vesículas de membrana de *L. mexicana* tenían la capacidad de interactuar con el plasminógeno. Para esto, las vesículas de membrana (0,1 mg) fueron incubadas con plasminógeno (2 μ M) durante 2 horas a temperatura ambiente y luego fueron sometidas a varios lavados con PBS utilizando ultracentrifugación (Beckman Airfuge). Se sensibilizaron placas de microtitulación con las vesículas previamente tratadas (2 μ g) y la unión de plasminógeno fue revelada mediante un anticuerpo primario (anti-plasminógeno) y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Se demostró que las vesículas tenían la capacidad de unir plasminógeno humano y que esa interacción fue inhibida por el compuesto análogo de la lisina conocido como ácido ϵ -aminocaproico (Figura 26), sugiriendo que en la unión están involucrados residuos de lisina.

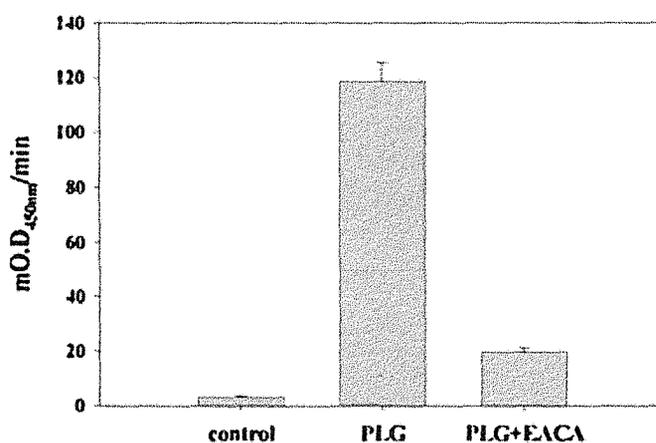


Figura 26. Interacción de las vesículas de membrana con el plasminógeno en *L. mexicana*. PLG: plasminógeno. PLG+EACA: plasminógeno+ ácido epsilon aminocaproico.

1.5. Identificación de un receptor de plasminógeno

En la búsqueda de nuevos receptores de plasminógeno en las vesículas de membrana secretadas, las proteínas obtenidas de la electroforesis fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) y posteriormente, se realizó un Ligand blotting utilizando plasminógeno como ligando. Este permitió revelar la presencia de varias proteínas que tienen la capacidad de unir plasminógeno (Figura 27), observándose principalmente dos bandas proteicas: una de 57 kDa identificada como enolasa, corroborada por Western blotting y otra banda de mayor intensidad correspondiente a proteínas no identificadas de bajo peso molecular (15 kDa). La banda de 15 kDa está presente en las vesículas de membrana secretadas por las tres especies de *Leishmania*, siendo la señal más intensa en *L. mexicana* y *L. infantum* (Figura 28).

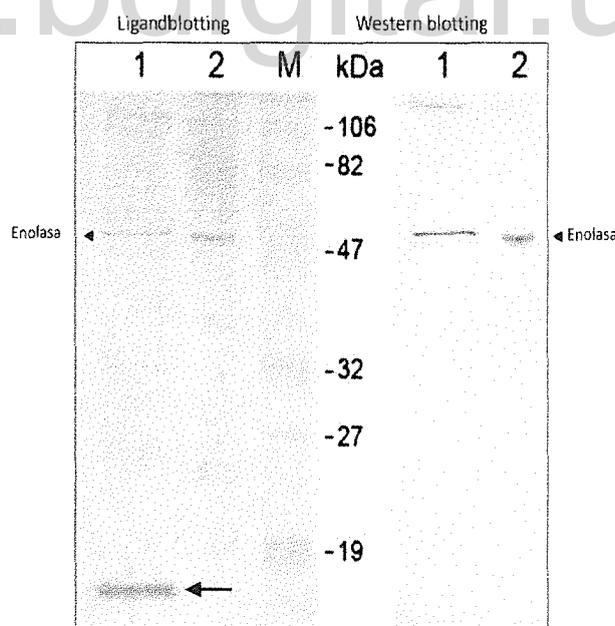


Figura 27. Ligandblotting y Western blotting de las vesículas de membrana secretadas por *L. mexicana*. 1: vesículas de membrana, 2: extracto de parásitos. Flecha: banda proteica de 15 kDa.

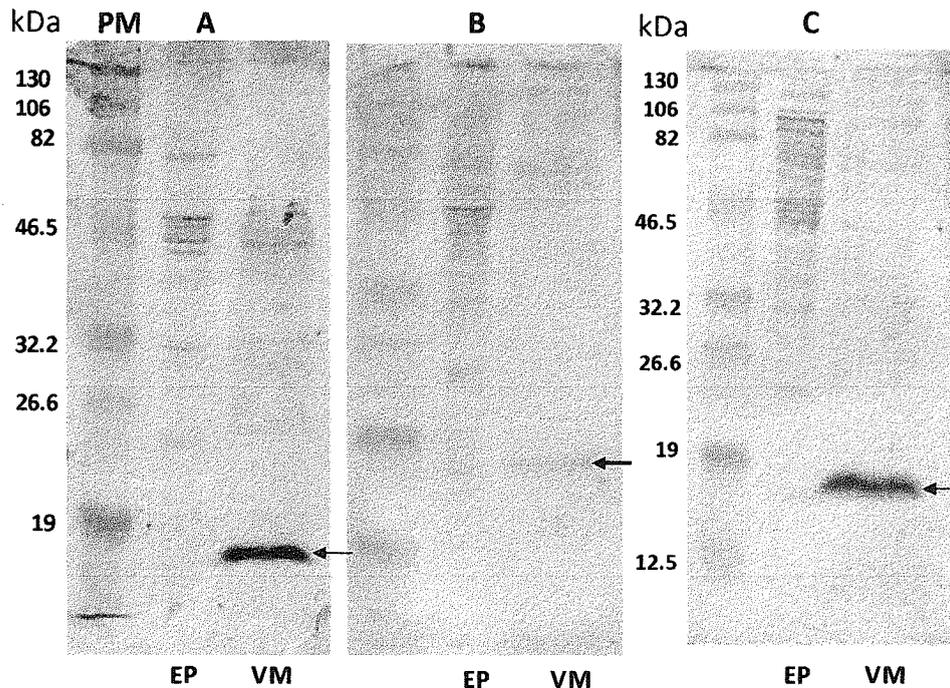


Figura 28. Ligand blotting de las vesículas de membrana de *Leishmania* spp. **A:** *L. mexicana*, **B:** *L. braziliensis*, **C:** *L. infantum*. **EP:** extracto de parásitos, **VM:** vesículas de membrana, **PM:** marcador de peso molecular, **Flechas:** banda proteica de 15 kDa.

1.6. Identificación por Espectrometría de Masas

La banda proteica de bajo peso molecular (15 kDa) obtenida para las tres especies de *Leishmania*, fue cortada del gel y sometida a digestión con tripsina para su análisis por espectrometría de masas, utilizando un espectrómetro de masas tipo Orbitrap (Centro Plate-forme Protéomique, IBiSA Marseille-Protéomique, France). Una vez obtenidos los pesos moleculares de los péptidos, se realizó la comparación de los resultados con la información almacenada de las secuencias de proteínas disponibles en las bases de datos (GenBank, Swiss Prot, NCBI, EMBL) utilizando el motor de búsqueda MASCOT (versión 2.1, Matrix Science, London, U.K.) que constituye una poderosa herramienta bioinformática para la identificación de las proteínas.

El análisis bioinformático permitió identificar diversas proteínas en *L. mexicana* y *L. infantum*, ya que en el caso de *L. braziliensis*, la banda proteica extraída del gel no pudo ser analizada debido a su contaminación con queratina. De las proteínas identificadas, dos correspondían a las proteínas más abundantes: una Triparedoxina citosólica (número de acceso del *GenBank* GI:157781821, *score*: 791) y una Calpaína like cisteín peptidasa Clan A de la familia C2, conocida también como proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1) (número de acceso del *GenBank* GI: 322491430 y *score*:394) (Figura 29).

<p>>gi 157781821 gb ABV72236.1 Triparedoxina citosólica [<i>Leishmania donovani</i>] MSGVSKHLGDVVKLQKQNEVDTSLSGKTVFFYFSASWCPPCRGFTPQLVEFY DKHHVSKNFEILLASWDEEEEDFNGYYAKMPWLALPFEKRNIVEALTKVFKVESIP TLIGLNADTGEIVTTRARHALTQDPEGAQFPWRDE</p>
<p>>gi 322491430 emb CBZ26701.1 Calpaína-like cisteín peptidasa, Clan CA, family C2 [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103] o SMP-1 MGC GASSENGSVTYVNGKPTFVGEEVTKGFEKDNGLLFRIVNRKKRQWAY YNDTTQYEMHVLVTFNEDCDIKALGNTKLEQQENGEWVASLVVYPCETEM FIEGRVNGFKSKMDALPLSEEYRQRQGEKEK</p>

Figura 29. Resultados obtenidos de la Espectrometría de Masas utilizando la tecnología Orbitrap. Secuencias de aminoácidos de las proteínas: Triparedoxina citosólica de *L. donovani* y Calpaína like cisteín-peptidasa clan CA, familia C2 de *L. mexicana*.

Para realizar la selección de una de las proteínas como un posible candidato a ser receptor de plasminógeno en *L. mexicana*, se analizaron ambas secuencias. Debido a que la secuencia de la Triparedoxina citosólica no posee lisina en el extremo

carboxiloterminales, se realizó un alineamiento de la secuencia de la proteína con los motivos clásicos de unión a plasminógeno no carboxiloterminales de diferentes organismos previamente reportados en la literatura con el propósito de verificar la presencia de alguno de ellos. No se encontró ninguno de los motivos presentes en enolasa de diversos organismos patógenos ni en la proteína LACK de *L. mexicana*, todos implicados en la unión de plasminógeno.

Sin embargo, al analizar la secuencia de la proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1), se encontró que posee un residuo de lisina en el extremo carboxiloterminales, característica importante de las proteínas ya conocidas que unen plasminógeno humano, seleccionándola como un posible candidato a ser receptor de plasminógeno en *L. mexicana*. Posteriormente, se procedió a realizar la clonación, sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante con la finalidad de corroborar si realmente SMP-1 es un receptor de plasminógeno presente en las vesículas de membrana de *L. mexicana*.

2. Amplificación, clonación y análisis bioinformático del gen SMP-1

2.1. Amplificación y clonación del gen SMP-1

Con los oligonucleótidos diseñados (Figura 30), se amplificó mediante la técnica de PCR, el gen que codifica para SMP-1 a partir del ADN genómico de *L. mexicana*, cepa AZV, obteniéndose luego de varios ensayos una única banda de 361 pb que se muestra en la Figura 31.

Oligonucleótido sentido:
5'- GCA TAT GGG CTG CGG TGC TTC GT-3'
Rojo: sitio de restricción > NdeI, T_m : 68.1°C, %GC: 60.9

Oligonucleótido antisentido:
5'- GGA TCC CTA CTT TTC CTT CTC CCC CTG ACG CT-3'
Azul: sitio de restricción > BamHI, T_m : 72.3°C, %GC: 56.2

Figura 30. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen que codifica para la proteína SMP-1.

www.bdigital.ula.ve

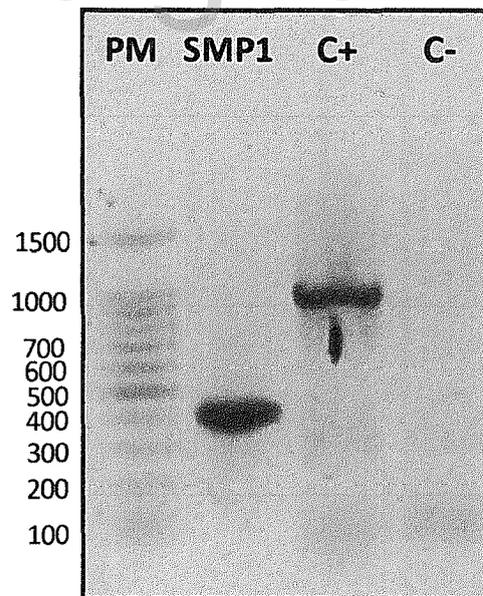


Figura 31. Amplificado de SMP-1 obtenido por la técnica de PCR. Gel de agarosa al 1%. PM: marcadores de peso molecular (pb), C+: amplificado del gen LACK (1000 pb), C-: sin ADN.

El producto amplificado por PCR fue purificado e insertado en el vector de clonación pGEM-T, con el cual fue transformada la cepa *E. coli* XL1Blue. Las colonias transformantes obtenidas, fueron reaisladas y sus plásmidos purificados con la finalidad de confirmar la presencia del inserto mediante los ensayos de digestión con las enzimas de restricción BamHI y NdeI (Figura 32). Una vez identificados los clones que contenían el inserto, se seleccionaron dos clones y posteriormente fueron enviados para su secuenciamiento. La secuencia obtenida (Figura 33) se utilizó para realizar los análisis bioinformáticos.

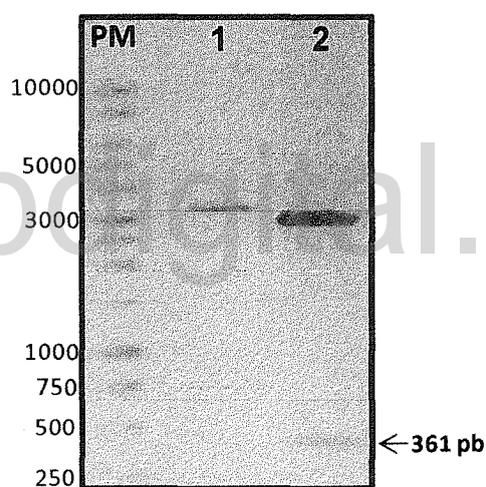


Figura 32. Digestión del vector pGEM-T con las enzimas de restricción BamHI y NdeI. Gel de agarosa al 1%. PM: marcadores de peso molecular (pb), 1: vector linearizado con BamHI, 2: vector digerido con ambas enzimas.

```

1 atgggctcgc gtgcttcgtc tgagaacggc agcgtcacgt acgtgaacgg caagcccacc
61 tttgtgggtg aggaggtgac gaagggcttt gagaaggaca atgggctgct tttccgcatc
121 gtgaacagga agaagaggca gtgggcgtac tacaacgaca cgacgcagta cgaaatgcac
181 gtgctgtgca ccttcaacga ggactgtgac atcaaggctc ttggcaacac gaagctggag
241 cagcaggaga acggcgagtg ggtagctccc ttggtgggtg acccgtgcga gacggagatg
301 ttcattgagg gcccggtgaa cggcttcaag tcgaagatgg acgccctgcc gctctcggag
361 gagtaccgcc agcgtcaggg ggagaaggaa aagtag

```

Figura 33. Secuencia nucleotídica obtenida para el gen SMP-1.

2.2. Análisis Bioinformático

El alineamiento realizado con el programa CLUSTALW de las secuencias de aminoácidos del gen que codifica para la proteína SMP-1 entre diferentes especies de tripanosomatídios, permitió revelar que SMP-1 es una proteína altamente conservada en los miembros de la familia *Trypanosomatidae* (Figura 34).

L. donovani	HCCGASSESSVTVVNGRPTFVGEVTRGFEKDNGLLFRIVNKKKKQAYYNDTTQYENH	60
L. infantum	HCCGASSESSVTVVNGRPTFVGEVTRGFEKDNGLLFRIVNKKKKQAYYNDTTQYENH	60
L. major	HCCGASSESSVTVVNGRPTFVGEVTRGFEKDNGLLFRIVNKKKKQAYYNDTTQYENH	60
L. braziliensis	HCCGASSESSVTVVNGRPTFVGEVTRGFEKDNGLLFRIVNKKKKQAYYNDTTQYENH	60
L. mexicana	HCCGASSESSVTVVNGRPTFVGEVTRGFEKDNGLLFRIVNKKKKQAYYNDTTQYENH	60
T. cruzi	HCCGASSKPTVEYVNGRPSFRGDEIVRGFDEGNGLLFRIVNKKKKQAYYNDTTEYENH	60
	***** : : * * ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
L. donovani	VLVTFNEDCDIALGKTELEQQENGEMVASVVVYPCETENFIEGRVNGFKSKDADALPSE	120
L. infantum	VLVTFNEDCDIALGKTELEQQENGEMVASVVVYPCETENFIEGRVNGFKSKDADALPSE	120
L. major	VLVTFNEDCDIALGKTELEQQENGEMVASVVVYPCETENFIEGRVNGFKSKDADALPSE	120
L. braziliensis	VLVTFNEDCDIALGKTELEQQENGEMVGSVVVYPCETELFIEGRVNGFKSKDADALPSE	120
L. mexicana	VLVTFNEDCDIALGKTELEQQENGEMVASVVVYPCETENFIEGRVNGFKSKDADALPSE	120
T. cruzi	VEVTFGECDDIALGKTHLEKLESGEHLATIVVHPCETENFIEGRVNGFKVWDVAVTEK	120
	* ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
L. donovani	EYFQRQAEHEK	131
L. infantum	EYFQRQAEHEK	131
L. major	EYFQRQAEHDK	131
L. braziliensis	EYFQRQAEHEK	131
L. mexicana	EYFQRQAEHEK	131
T. cruzi	MEFPAEEEEEK	131
	: * : : * : *	

Figura 34. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de SMP-1 de *L. mexicana* con otros miembros de la familia *Trypanosomatidae*.

Las secuencias de SMP-1 fueron comparadas utilizando el programa WU-BLAST, encontrándose que SMP-1 de *L. mexicana* comparte la mayor identidad con las SMP-1 de otras especies del género como *L. infantum* y *L. donovani* (95%), *L. braziliensis* y *L. major* (92%), y le siguen sus homólogos *T. cruzi* y *T. brucei* (64%).

SMP-1 es un miembro de la familia de proteínas miristoiladas pequeñas, que existen solamente en protozoarios de la familia *Trypanosomatidae* y que comparte cierta identidad con la región N-terminal (dominio I) de las calpaínas de los kinetoplastidas (Tull *et al.*, 2004). El genoma de *Leishmania* contiene cuatro genes localizados en el cromosoma 20 que codifican para esta familia de proteínas miristoiladas pequeñas encontrándose: SMP-1, SMP-2, SMP-3 y SMP-4, las cuales difieren en el estado de acilación. SMP-1 está miristoilada y palmitoilada *in vivo*, SMP-2 y SMP-4 solo presentan un motivo de miristoilación y SMP-3 carece de sitios acilados (Tull *et al.*, 2012).

Adicionalmente, el programa bioinformático DELTA-BLAST, disponible en la base de datos del NCBI, permitió dilucidar que la proteína SMP-1 posee en su secuencia un dominio conservado que se encuentra entre el aminoácido 15 y 117, correspondiente a un dominio de función desconocida (DUF 1935), localizado también en otras proteínas similares a calpaínas de tripanosomatidios y en el receptor tipo adenilato ciclasa *a* de *Leishmania* (Geer *et al.*, 2002, Marchler-Bauer *et al.*, 2011). Este dominio DUF 1935, también ha sido reportado en diversas especies bacterianas y en proteínas hipotéticas de eucariotes, así como en calpaínas *like* cisteín proteasas.

2.3. Modelado molecular de SMP-1

Se logró obtener un modelo para la estructura 3D de SMP-1 realizando un modelaje molecular que se muestra en la Figura 36 con el programa RasMol versión 2.6, utilizando como patrón la estructura cristalina de la proteína miristoilada pequeña 1 de *L. major* (PDB ID: 2FEO), (Gooley *et al.* 2006). La estructura secundaria de la proteína corresponde a un monómero que presenta una estructura clásica barril β -sandwich con una topología de remolino, caracterizada principalmente por 9 láminas beta formando arreglos antiparalelos y 1 α -hélice, localizada hacia el extremo carboxiloterminal. En la Figura 35 se muestra en color verde, la lisina que se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína.

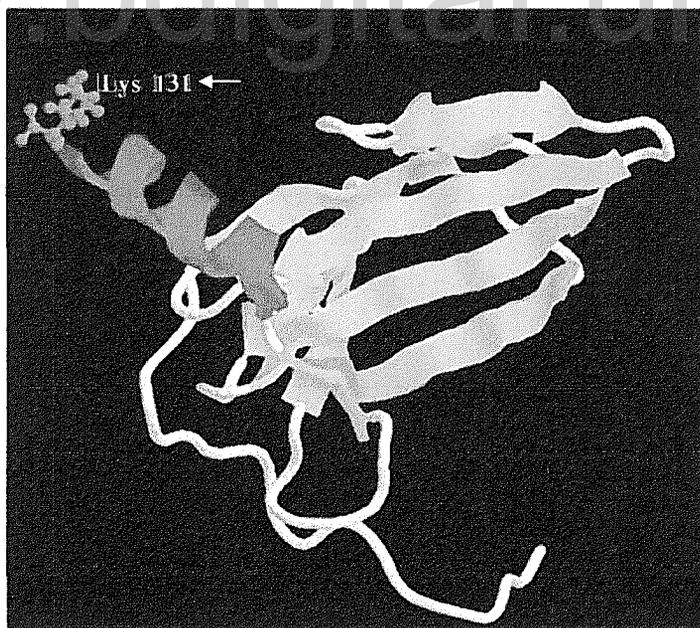


Figura 35. Modelo tridimensional de la proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1). Verde: residuo de lisina localizado en el extremo carboxiloterminal, Rojo: alfa hélice, Amarillo: láminas beta-plegadas.

3. Expresión y purificación de SMP-1

3.1 Subclonación en pET28a+

Después de realizar el secuenciamiento y corroborar que el inserto clonado en el vector pGEM-T correspondía al gen de interés y que la secuencia se encontraba en marco de lectura y no contenía codones de terminación, se procedió a realizar la subclonación en el vector de expresión pET28a+. Este sistema de expresión inducible con lactosa o sus análogos, permite la sobreexpresión de la proteína recombinante con un péptido que contiene seis histidinas (His)₆ fusionadas a su extremo N terminal, facilitando la purificación de la proteína a través de una cromatografía de afinidad a metales.

El vector de subclonación pET28a+ fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (BamHI y NdeI) utilizadas para la clonación en el vector de pGEMT y posteriormente insertado el gen de interés. Para verificar la presencia del gen SMP-1 se realizaron ensayos de digestión del ADN plasmídico para la liberación del inserto de 361 pb.

Adicionalmente, con el plásmido se realizó la transformación de la cepa de expresión de *E.coli* BL21(DE3), que contiene el plásmido pRARE (plásmido que codifica para los ARN de transferencia de los codones raros de *E. coli*), porque al analizar la secuencia de SMP-1, se encontró la presencia de 11 codones raros (Figura 36) que podían interferir en la sobreexpresión de la proteína recombinante.

```

ATG GGC TGC GGT GCT TCG TCT GAG AAC GGC AGC
GTC ACG TAC GTG AAC GGC AAG CCC ACC TTT GTG GGT GAG
GAG GTG ACG AAG GGC TTT GAG AAG GAC AAT GGG CTG CTT
TTC CGC ATC GTG AAC AGG AAG AAG AGG CAG TGG GCG TAC
TAC AAC GAC ACG ACG CAG TAC GAA ATG CAC GTG CTG GTC ACC
TTC AAC GAG GAC TGT GAC ATC AAG GCT CTT GGC
AAC ACG AAG CTG GAG CAG CAG GAG AAC GGC GAG TGG GTA
GCC TCC TTG GTG GTG TAC CCG TGC GAG ACG GAG ATG TTC ATT
GAG GGC CGC GTG AAC GGC TTC AAG TCG AAG ATG GAC GCC
CTG CCG CTC TCG GAG GAG TAC CGC CAG CGT CAG GGG GAG
AAG GAA AAG TAG

N° bases = 393
N° codones = 132, N° codones raros = 11

```

Figura 36. Codones raros presentes en la secuencia nucleotídica de la proteína SMP-1.

Algunas de las colonias transformantes, seleccionadas al azar y reaisladas, fueron analizadas mediante un PCR de colonia, corroborándose la presencia del gen SMP-1 en varios clones tal como se muestra en la Figura 37.

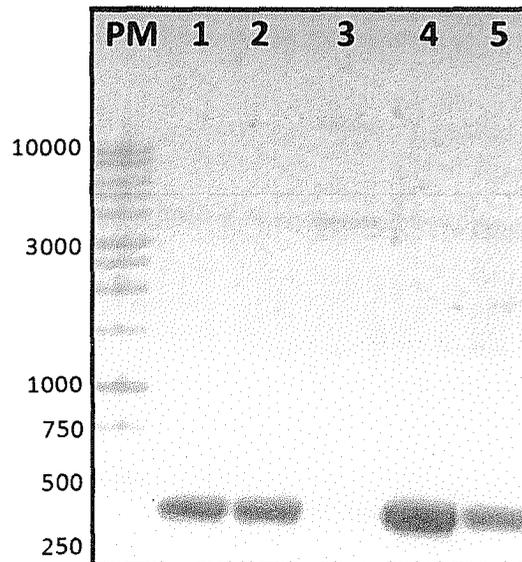


Figura 37. PCR de Colonia. Gel de agarosa al 1%. PM: marcadores de peso molecular (pb), 1, 2, 4, 5: clones positivos. 3: control negativo.

3.2. Ensayos de sobreexpresión de la proteína recombinante SMP-1

Se realizaron los ensayos de sobreexpresión de la proteína SMP-1 mediante inducción con IPTG, observándose al cabo de tres horas la expresión evidente de una proteína con el peso molecular esperado (15 kDa) tal como se observa en la Figura 38.

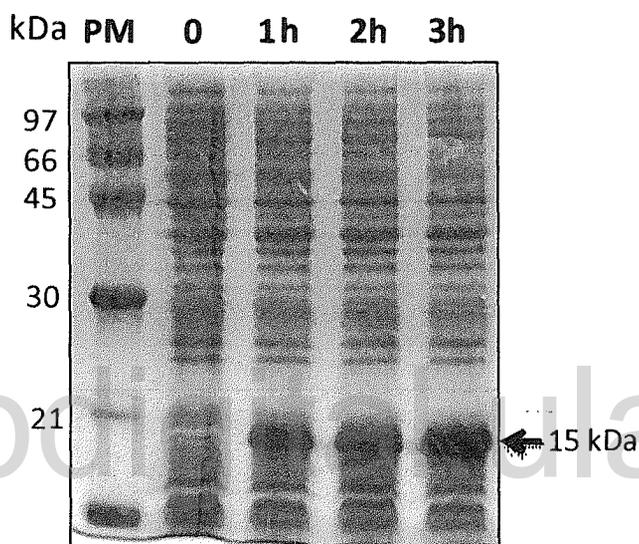


Figura 38. Ensayos de sobreexpresión de SMP-1 con IPTG. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 15%. PM: marcadores de peso molecular (kDa), Flecha: indica una proteína de 15 kDa.

Con la finalidad de dilucidar si la proteína SMP-1 se expresó de forma soluble o insoluble, las células bacterianas fueron sometidas a un proceso de sonicación y posterior centrifugación para la obtención del homogenato, encontrándose que la proteína se expresó parcialmente soluble, una parte en el sobrenadante y otra parte en el sedimento, tal como se visualiza en el gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (Figura 39).

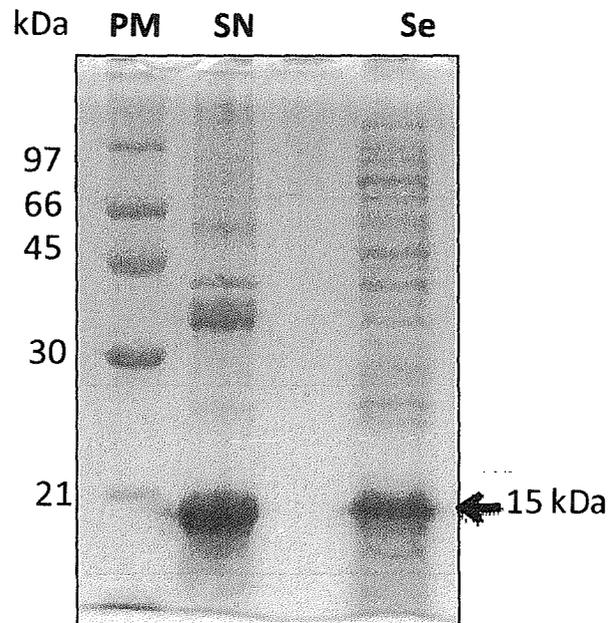


Figura 39. Ensayo de solubilidad de SMP-1 con IPTG. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 15%. **PM:** marcadores de peso molecular (kDa), **SN:** sobrenadante, **Se:** sedimento, **Flecha:** indica una proteína de 15 kDa.

Posteriormente, con la finalidad de obtener la proteína SMP-1 recombinante soluble, se ensayó el método de sobreexpresión por autoinducción en el medio ZYM-5052 (Studier, 2005), utilizado principalmente para disminuir la formación de los cuerpos de inclusión, obteniendo un máximo de la proteína a las 34 horas de cultivo a temperatura ambiente.

3.3. Purificación de la proteína SMP-1

Para la purificación de la proteína recombinante se empleó una cromatografía de afinidad a metales, utilizando una columna de afinidad *His-link*, la cual tiene acoplada a la resina iones metálicos de níquel divalentes. Se logró obtener la proteína

con alto grado de pureza eluyendo con 500 mM de imidazol (Figura 40). El rendimiento de SMP-1 purificada a partir de un cultivo de 50 ml fue de 35.5 mg.

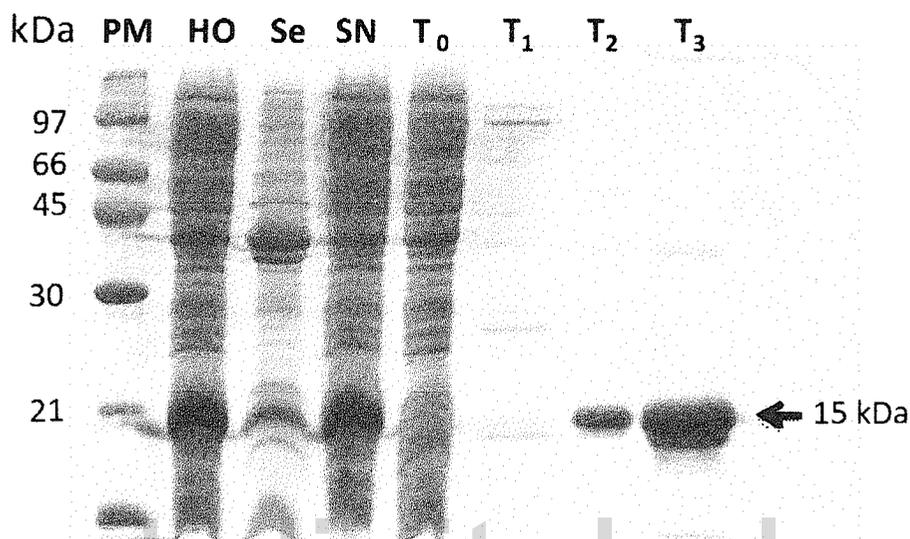


Figura 40. Perfil de purificación de SMP-1. PM: marcadores de peso molecular (kDa), HO: homogenato, Se: sedimento, SN: sobrenadante, T₀: primer eluato, T₁: 10 mM imidazol, T₂: 75 mM imidazol y T₃: 500 mM imidazol. Flecha: banda proteica de 15 kDa.

Adicionalmente, es importante destacar que SMP-1 después de su purificación y almacenamiento, tiene la tendencia de formar dímeros estables, aun en presencia de SDS y agentes reductores, y que los dímeros solo fueron capaces de disociarse con 50 mM de DTT durante 1 hora (Figura 41), indicando que la formación de estos dímeros son producto de la presencia de puentes disulfuros. La proteína purificada se utilizó para la producción de los anticuerpos anti SMP-1 en conejo y para realizar los diferentes ensayos que involucran la interacción de SMP-1 con el plasminógeno humano.

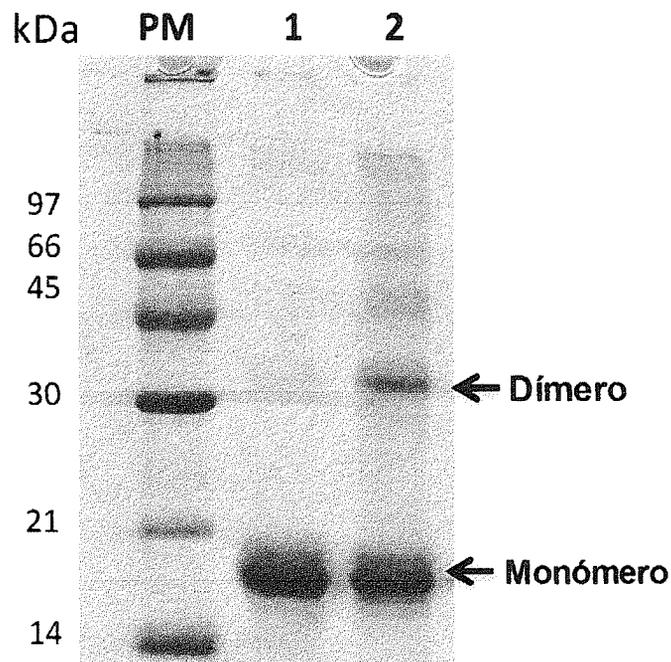


Figura 41. Oligomerización de SMP-1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 15%. PM: marcadores de peso molecular (kDa), 1: Tratamiento con 50 mM de DTT, 2: sin tratamiento. Flechas: formación de oligómeros.

3.4. Producción de los anticuerpos en el conejo

Se produjeron anticuerpos policlonales anti SMP-1 después de haber realizado un protocolo de inmunización de tres meses en conejo, tal como fue descrito previamente en la metodología. Una vez obtenido el suero que contiene los anticuerpos policlonales, se realizó un ensayo de especificidad que se muestra en la Figura 42, observándose la señal de SMP-1 en parásitos y exosomas solo cuando fue revelada con el suero anti SMP-1 y no con el suero pre-inmune, indicando por lo tanto, que se trata de un reconocimiento específico y producto de la inmunización del conejo.

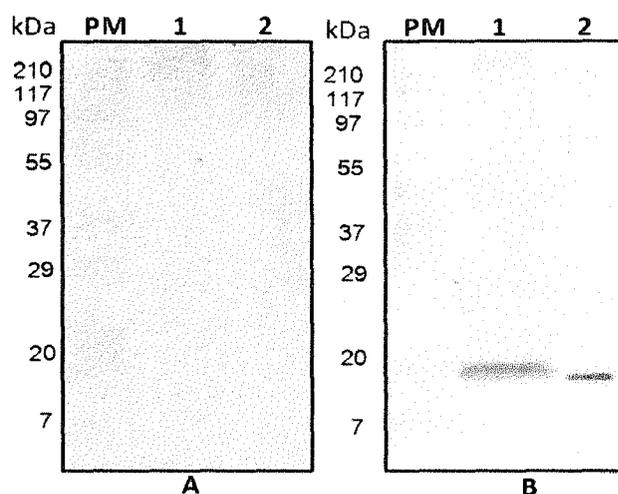


Figura 42. Ensayo de especificidad de los anticuerpos anti SMP-1. Western blotting donde se observa SMP-1. PM: marcadores de peso molecular (kDa), 1: extracto de parásitos, 2: exosomas. A: incubación con suero pre-inmune, B: incubación con los anticuerpos policlonales anti SMP-1.

Además se puede observar en la Figura 43, que el anticuerpo anti SMP-1, permitió corroborar la presencia de la proteína SMP-1 en las vesículas de membrana secretadas por las tres especies de *Leishmania*, visualizándose menos concentrada en el extracto de parásitos.

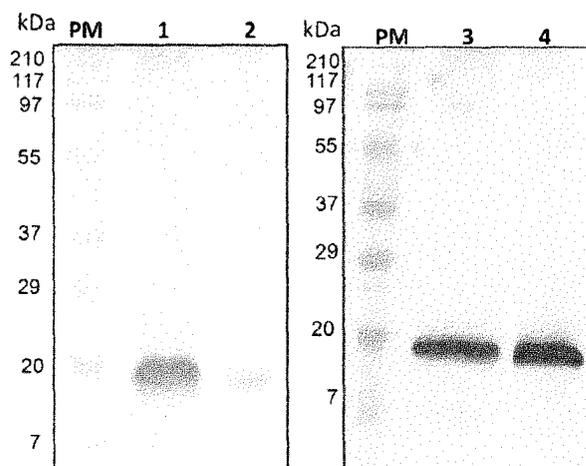


Figura 43. Western blotting revelado con anticuerpos anti SMP-1 de *L. mexicana*. PM: marcadores de peso molecular (kDa), 1: vesículas de membrana de *L. mexicana*, 2: extracto de parásitos, 3: vesículas de membrana de *L. braziliensis* y 4: vesículas de membrana de *L. infantum*.

3.5. Inmunomicroscopía de Fluorescencia

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia (Figura 44) con la finalidad de corroborar la ubicación de SMP-1 en los parásitos. Se utilizaron parásitos fijados en láminas portaobjetos con una solución de polilisina y luego fueron permeabilizados con Tritón X-100. En este caso, para detectar SMP-1 se utilizó un anticuerpo marcado secundario acoplado a Cy3, compuesto que absorbe luz a una longitud de onda de 550 nm y emite a 570 nm. Como marcador citosólico, se empleó la α -tubulina utilizando un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina y un anticuerpo secundario acoplado a FITC, que absorbe luz a una longitud de onda de 492 nm y emite a 520 nm.

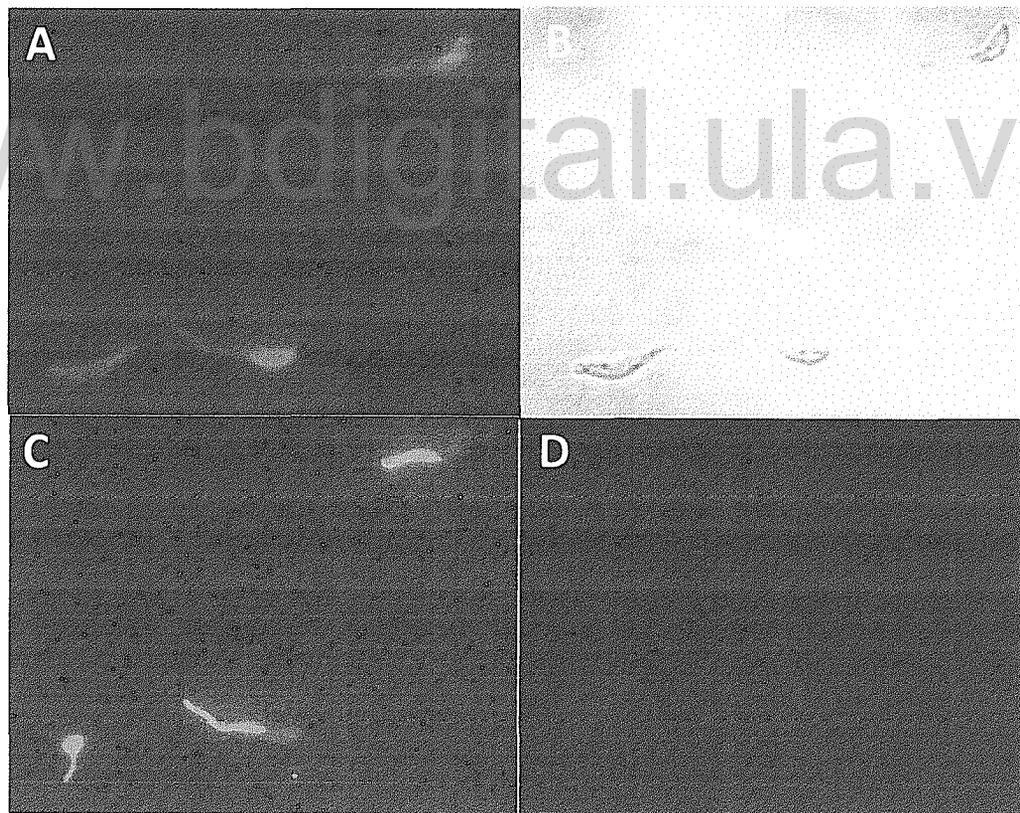


Figura 44. Inmunofluorescencia de parásitos permeabilizados con anticuerpos anti- SMP1 (rojo) y anti- α -tubulina (verde). A: anticuerpo anti- α -tubulina, B: microscopía de luz 400X, C: anticuerpo anti-SMP1. D: control sin anticuerpo primario anti-SMP1.

En la Figura 44, se puede observar en (A) que la señal de la tubulina (verde) fue detectada en todo el cuerpo del parásito como era de esperarse ya que esta proteína forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto de los tripanosomatidios, sin embargo, en (C) puede observarse claramente una intensa señal de color rojo correspondiente a la proteína SMP-1, corroborándose que solo se encuentra en el flagelo y bolsillo flagelar de los parásitos. En el presente ensayo también se visualizaron los promasigotes de *Leishmania* con su morfología típica mediante microscopía de luz (B) y se usaron los respectivos controles del experimento tal como se muestra en la Figura 44 D.

4. Localización de SMP-1 y enolasa en las vesículas de membrana

Mediante los ensayos de digestión con proteasas, se demostró que SMP-1 es una proteína que se encuentra localizada en el interior de las vesículas, debido a que al someter las vesículas de membranas a digestión con las proteasas: bromelina (ananase), proteinasa K y tripsina, no ocurrió degradación de la proteína. Sin embargo, SMP-1 fue digerida por estas proteasas al solubilizar las membranas con el detergente Tritón X-100 (Figura 45).

Las vesículas de membrana secretadas por *L. mexicana* también contienen proteasas. Esto fue determinado al realizar un zimograma (Figura 46), el cual permitió visualizar una banda transparente en el gel de poliacrilamida superior a 100 kDa, que estaba presente solo en las vesículas de membrana y no en el extracto de los parásitos.

En relación a la enolasa, a diferencia de SMP-1, no se pudo conocer su localización en las vesículas de membrana, debido a que la enolasa resultó ser resistente a la digestión por las diferentes proteasas utilizadas: tripsina, bromelina y proteinasa K, aun en presencia de Tritón X-100. Solamente se observó un cambio en la movilidad de la enolasa en el gel en presencia del detergente (Figura 47). Sin embargo, la enolasa recombinante obtenida de *L. mexicana* y de vesículas de membranas secretadas sometidas a tratamiento con tripsina y luego a ebullición por 10 minutos, previo a la acción de la tripsina respectivamente, sí fue digerida, sugiriendo que la enolasa localizada en las vesículas de membrana podría estar asociada a otras proteínas que la protegen de la acción de las proteasas utilizadas (Figura 47).

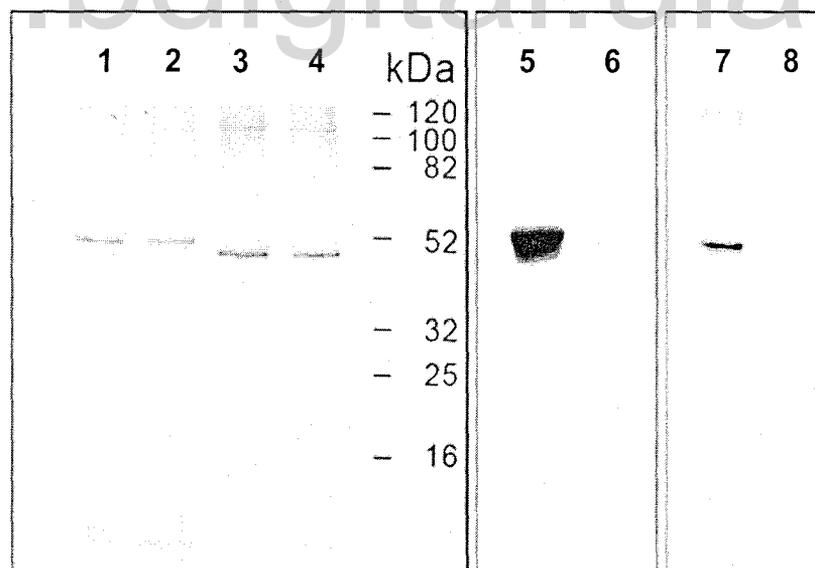


Figura 47. Western blotting de los ensayos de digestión por proteasas de Enolasa en vesículas de membrana. PM: marcadores de peso molecular (kDa), **1:** Vesículas de membrana, **2:** Vesículas de membrana+proteasas,**3:**Vesículas de membrana+Tritón X-100, **4:** Vesículas de membrana+Tritón X-100 + proteasas, **5:** enolasa recombinante, **6:** enolasa recombinante tratada con tripsina, **7:** Vesículas de membrana después de ebullición, **8:** Vesículas de membranas tratadas con tripsina.

Adicionalmente, es interesante mencionar que la enolasa presente en el extracto de parásitos resultó ser sensible a la digestión por tripsina, por lo tanto, tiene un comportamiento diferente a la enolasa presente las vesículas de membrana (Figura 48). Se puede observar una disminución de la intensidad de la señal de enolasa en el extracto de los parásitos enteros al ser tratados con tripsina, coincidiendo este resultado con la localización dual de esta proteína, localizada tanto en la cara externa de la membrana plasmática como en el citosol.

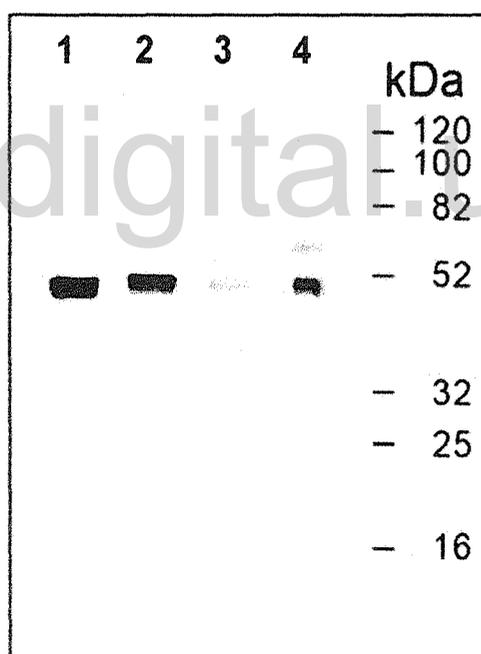


Figura 48. Western blotting de los ensayos de digestión por proteasas de Enolasa. PM: marcadores de peso molecula (kDa), 1: vesículas de membrana + Tritón X-100, 2: Vesículas de membrana+Tritón X-100 + proteasas, 3: Vesículas de membrana+ proteasas, 4: Vesículas de membrana.

5. Interacción de SMP-1 con el Plasminógeno humano

5.1. Unión de SMP-1 con el plasminógeno

Se realizaron ensayos de unión *in vitro* de la proteína recombinante, utilizando la técnica de ELISA con la finalidad de conocer si SMP-1 era capaz de interactuar con el plasminógeno. Después de la sensibilización de las placas de microtitulación con 50 ng de proteína y con concentraciones crecientes de plasminógeno, se demostró que SMP-1 une plasminógeno de manera dosis dependiente y saturable con un valor de la constante de disociación (K_d) de 0.24 ± 0.04 , valor que se encuentra dentro del rango fisiológico de la concentración de plasminógeno sanguíneo. Adicionalmente, la interacción del plasminógeno con las proteínas usadas como controles (caseína y enzima málica de *Phytophthora infestans*) resultó ser mínima (Figura 49).

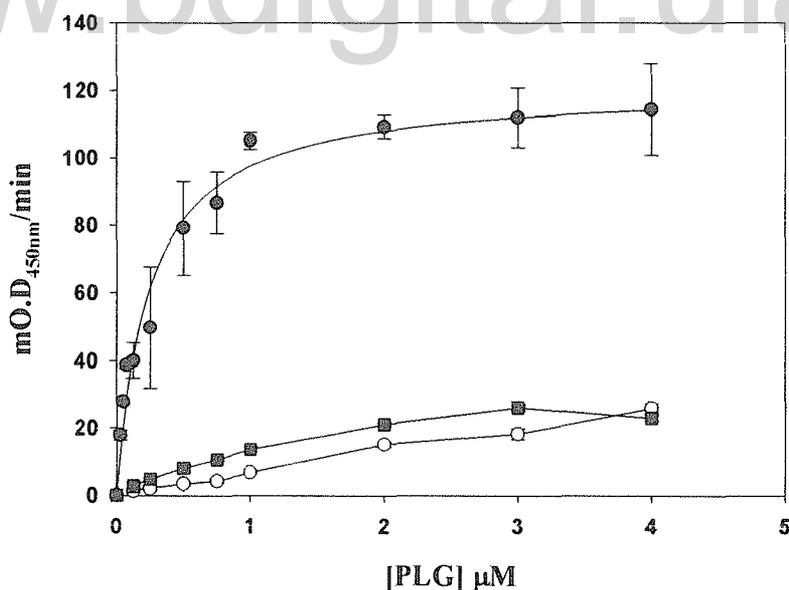


Figura 49. Interacción de SMP-1 con el plasminógeno humano (PLG): \circ (SMP-1),

\blacksquare (enzima málica de *P. infestans* recombinante con His-Tag), \circ (caseína).

5.2. Inhibición de la unión de SMP-1 con ϵ -ACA

En la Figura 50 se muestra que la unión de SMP-1 con el plasminógeno fue inhibida por un compuesto análogo a la lisina conocido como ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -ACA) en un 80% y de manera saturable. Esto sugiere que la interacción de SMP-1 con el plasminógeno es mediada por sitios de unión a residuos de lisina.

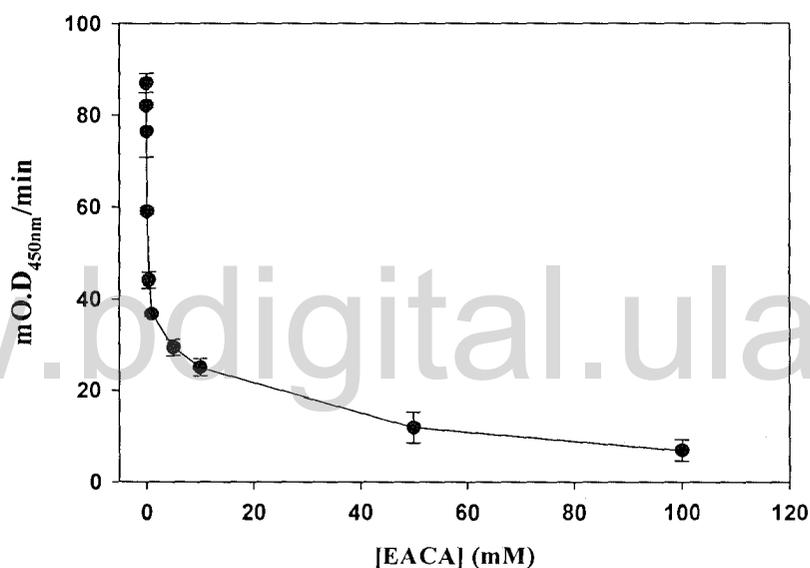


Figura 50. Inhibición de la interacción de SMP-1 con el plasminógeno por ácido ϵ -aminocaproico. Sensibilización de la placa con 50 ng de SMP-1, 1 μ M de Plg y concentraciones crecientes de ácido ϵ -aminocaproico (EACA).

5.3. Inhibición de la unión de SMP-1 con carboxipeptidasa B

Se demostró una inhibición en un 65% de la interacción de SMP-1 con el plasminógeno en ensayos realizados *in vitro* con 10 U de carboxipeptidasa B (Figura 51), indicando que el residuo de lisina que se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína SMP-1 si está involucrado en el reconocimiento con el plasminógeno.

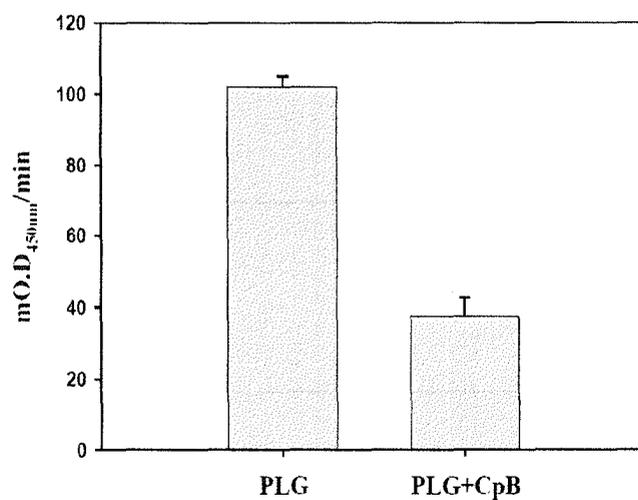


Figura 51. Inhibición de la unión de SMP-1 con el plasminógeno humano por carboxipeptidasa B. PLG: plasminógeno, PLG+CpB: plasminógeno+ carboxipeptidasa B.

www.bdigital.ula.ve

DISCUSIÓN

El análisis realizado por microscopía electrónica de transmisión de las vesículas de membrana secretadas por los promastigotes de *L. mexicana*, permitió demostrar que estas constituyen una población heterogénea de microvesículas redondeadas con un tamaño que varía entre 50-600 nm y que difieren en su electrondensidad. Las vesículas de membrana secretadas podrían tener diferentes orígenes lo cual explicaría esa heterogeneidad: Ellas podrían derivar de (i) brotes que emergen o se desprenden directamente de la membrana plasmática correspondientes a microvesículas (50-500 nm), (ii) ser cuerpos apoptóticos (100-1000 nm) provenientes de células apoptóticas (Théry *et al.*, 2009, Mathivanan *et al.*, 2010, Gyorgy *et al.*, 2011) y (iii) podrían ser exosomas (40-100 nm) ya que presentan aspectos morfológicos y ultraestructurales semejantes a los exosomas secretados por diferentes células (Gambin *et al.*, 2007, Qu *et al.*, 2009, Duijvesz *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se visualizaron estructuras similares a cuerpos multivesiculares en el bolsillo flagelar de los promastigotes de *L. mexicana*. El bolsillo flagelar en tripanosomatidios, constituye el principal sitio donde ocurre el proceso de endocitosis y exocitosis, además de ser la única región del cuerpo del parásito que no está recubierta por microtúbulos subpediculares (Souza, 2009). Estos hallazgos coinciden con los reportados por Bayer-Santos *et al.*, 2012, quienes demostraron por microscopía electrónica de transmisión en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* sometidos a un proceso de secreción, la presencia de cuerpos multivesiculares en el interior del bolsillo flagelar, sugiriendo que estos se fusionan

con la membrana del mismo con la finalidad de liberar su contenido al medio extracelular.

En este mismo orden de ideas, Silverman *et al.*, 2008 demostraron por microscopía electrónica de barrido, la presencia de vesículas de 50 nm de diámetro brotando de la membrana del bolsillo flagelar en promastigotes de *L. donovani*. Posteriormente, Silverman *et al.*, 2010, mediante un análisis ultraestructural de las vesículas liberadas por promastigotes de *L. donovani* y *L. mexicana*, visualizaron vesículas con un tamaño de 50 nm y cuerpos multivesiculares brotando o emergiendo de la membrana plasmática, indicando que las microvesículas observadas en *Leishmania* spp. poseen todas las características comparables con la de los exosomas y que las vesículas pueden ser liberadas no solo por el bolsillo flagelar sino por cualquier parte del cuerpo del parásito.

En el presente trabajo, en relación al análisis realizado por microscopía electrónica de barrido de los promastigotes de *L. mexicana* antes y después del proceso de secreción, son evidentes los cambios morfológicos observados, ya que los parásitos sometidos a un proceso de secreción en un medio mínimo sin agitación a 28 °C durante 24 horas, presentaron numerosas exovesículas adosadas en la superficie de todo el cuerpo del parásito. Estos resultados son similares a los encontrados por Hassani *et al.*, 2011, quienes observaron en promastigotes de *L. mexicana* que los cambios de temperatura inducen un rápido incremento en la liberación de proteínas, la cual está asociada a alteraciones en la morfología del parásito, que incluye principalmente un aumento en el número de exovesículas adosadas a la superficie visualizadas por microscopía electrónica de barrido.

En los últimos 5 años, numerosas evidencias experimentales relacionadas con la secreción de vesículas de membrana extracelulares tanto en organismos unicelulares como multicelulares, han permitido demostrar un nuevo mecanismo de señalización intercelular basado en la liberación de vesículas membranosas especializadas conocidas como exosomas. Estos constituyen una subclase específica de vesículas de membrana secretadas, de origen endocítico, que miden entre 40-100 nm de diámetro, implicados en diversas funciones fisiológicas y patológicas asociadas con la comunicación intercelular, (Nickel, 2005, Mathivanan *et al.*, 2010, Bang y Thum 2012); presentación antigénica, sugiriendo un rol potencial en la respuesta inmunológica (Raposo *et al.*, 1996, Théry *et al.*, 2009, Chaput y Théry, 2011); promoviendo en células tumorales la proteólisis de la matriz extracelular favoreciendo la metástasis (Rak, 2010, Hood *et al.*, 2011), y en el caso de los organismos patógenos, las vesículas están implicadas en la liberación de factores de virulencia, considerado como un mecanismo especializado que favorece el establecimiento y patogénesis de la infección en el hospedador (Torrecilhas *et al.*, 2012, Lambertz *et al.*, 2012, Hosseini *et al.*, 2013). En este sentido, Silverman *et al.*, 2010, demostraron la secreción de exosomas en *Leishmania* spp, señalando a los exosomas como vesículas efectoras que contienen proteínas que constituyen factores de virulencia (FE-1 α , CD63, aldolasa, proteínas de choque térmico 70 y 90, SAcP) asociados con la comunicación parásito-macrófago. Adicionalmente, dilucidaron que el 50% de las proteínas en *Leishmania* spp. son secretadas a través de los exosomas y que el proteoma de los exosomas tiene un 50% de similitud con las proteínas presentes en los exosomas de los mamíferos. Asimismo, Silverman *et al.*, 2008,

demonstraron que la secreción de exosomas en *Leishmania* spp. tiene importantes efectos inhibitorios tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adquirida asociados con la infección en el hospedador. Por otra parte, es importante señalar que existen controversias con respecto a ensayos preliminares de vacunación con exosomas de diferentes especies de *Leishmania* en modelos murinos. En este sentido, Silverman *et al.*, 2008, demostraron que en cepas de ratones resistentes (C57BL/6), inoculados con exosomas de *L. donovani*, se produjo una exacerbación de la infección, caracterizado por un incremento de la carga parasitaria y de la producción de IL-10, citoquina asociada con la supresión de las células T. Sin embargo, en los mismos modelos murinos inoculados con exosomas de *L. donovani* HSP100^{-/-}, se indujo una diferenciación de las células Th1, favoreciendo la resistencia a la infección por *Leishmania*. En contraste, Schnitzer *et al.*, 2010, realizaron intentos de vacunación en modelos murinos con exosomas secretados por células dendríticas estimuladas con antígenos de *L. major*, obteniéndose una respuesta inmune protectora a la infección, sugiriendo que podría desarrollarse a futuro una vacuna apropiada, útil como medida profiláctica en las regiones de alto riesgo afectadas por Leishmaniasis.

En el presente estudio, la caracterización bioquímica realizada a la población de vesículas de membrana purificadas de *L. mexicana*, permitió inferir que estas podrían corresponder a una fracción enriquecida de exosomas, al detectar la presencia del FE-1 α , ya que esta proteína constituye un marcador exosomal en células de mamíferos (Théry *et al.*, 2001, Stoorvogel *et al.*, 2002), aunado a que ha sido reportado en exosomas y en medio condicionado de *Leishmania* spp. (Silverman *et al.*, 2010). El FE-1 α desempeña principalmente funciones asociadas con la síntesis de proteínas, sin

embargo, Nandan *et al.*, 2002, demostraron en *L. donovani* que también este factor es secretado y cumple una función adicional al interaccionar y activar la fosfatasa tirosina 1 del hospedador, conllevando a la inhibición de la activación del macrófago infectado, constituyendo por tanto, un novedoso factor de virulencia en *Leishmania*.

Adicionalmente, en el presente trabajo se detectó la proteína GP63 en las vesículas de membrana de *L. mexicana* estudiadas. Es interesante destacar que en los resultados del Western blotting se observaron dos isoformas de GP63 en los parásitos antes del proceso de secreción y posteriormente, se visualizó una sola isoforma de esta proteína, por lo tanto, es evidente que una de esas isoformas fue secretada al medio después de ser inducidos los parásitos a un proceso de secreción en un medio mínimo sin agitación a 28 °C. Se han identificado dos isoformas de GP63 extracelular: una liberada directamente por proteólisis de la superficie celular con anclaje GPI y otra secretada vía tráfico vesicular a través del bolsillo flagelar (McWire *et al.*, 2001). En ese sentido, Yao *et al.*, 2004, han descrito la presencia de diferentes isoformas de GP63, las cuales son expresadas diferencialmente durante el ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania*, correlacionándose directamente con la virulencia del mismo. Mediante Western blotting de geles bidimensionales, lograron la identificación de diez isoformas en promastigotes en fase estacionaria de *L. chagasi*, distribuidas entre 58-63 kDa y puntos isoeléctricos en el rango de 5.2-6.1, mientras que, en parásitos en fase exponencial, donde se identificaron solo cuatro isoformas, las cuales en general, pueden desempeñar diferentes funciones durante la migración del parásito en el hospedador mamífero y en el vector. GP63 también forma parte de las proteínas cargo de los exosomas de *Leishmania* spp. (Silverman *et*

al., 2010), del exoproteoma de *L. mexicana* cuando los promastigotes son sometidos a choque térmico (37°C) (Hassani *et al.*, 2011) y encontrada entre las proteínas excretadas/secretadas en vesículas liberadas por epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* (Bayer-Santos *et al.*, 2013).

La proteína GP63 es una metaloproteasa dependiente de zinc de 63 kDa, la cual constituye la principal proteína de superficie (75%) expresada en los promastigotes de *Leishmania* spp. aunque en menor proporción en las formas amastigotes, reconocida como un factor de virulencia clave en *Leishmania*. Es capaz de modular la respuesta inmune innata del hospedador a nivel celular y molecular mediante diversas estrategias: evasión de la lisis mediada por el complemento (Brittingham *et al.*, 1995), interacción con el receptor de fibronectina en el macrófago facilitando la adherencia del parásito (Brittingham *et al.*, 1999), y una vez en el interior del macrófago, específicamente en el fagolisosoma, los amastigotes intracelulares son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ese ambiente hostil, gracias a la presencia de una GP63 proteolíticamente activa (McGWire y Chang, 1994).

Una ventaja adicional que le confiere la GP63 a los parásitos, es que al estar en contacto con la matriz extracelular del tejido subcutáneo, puede degradar sus componentes (laminina, fibronectina), facilitando la migración hacia los tejidos (McGWire y Chang, 2003). GP63 puede afectar directamente las funciones del macrófago favoreciendo la invasión, sobrevivencia, establecimiento y diseminación de *Leishmania* en el hospedador.

En síntesis, GP63 y el FE-1 α , no solo forman parte de las proteínas cargo de los exosomas, sino también se han encontrado en el citoplasma de los macrófagos

infectados por *Leishmania*, así como las proteínas de choque térmico 70 y 90 (Nandan *et al.*, 2002; Silverman *et al.*, 2010). Probablemente su presencia es debida a la fusión de los exosomas con la membrana plasmática del macrófago, representando otra ruta de entrada de estos factores de virulencia al interior de la célula hospedadora. GP63 y el FE- 1 α , constituyen importantes efectores responsables de cambios en el fenotipo de las células infectadas por *Leishmania*. Una vez localizados en el citoplasma del macrófago infectado, activan múltiples proteínas fosfatasa tirosinas (PTPs) del hospedador, induciendo una regulación negativa de la activación del macrófago en respuesta al interferón gamma (IFN- γ), inhibiendo así las funciones microbicidas del macrófago, mediado por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), además de generar una respuesta anti-inflamatoria que favorece la persistencia de *Leishmania* en el hospedador (Silverman y Reiner, 2012).

En relación a la caracterización bioquímica de las vesículas de membrana, también se determinó la presencia de dos proteínas que tienen la capacidad de unir plasminógeno humano: el receptor de proteína quinasa C activada (LACK) y enolasa. LACK es una proteína considerada como un factor de virulencia que ha sido reportada en el secretoma, en el medio condicionado (Silverman *et al.*, 2008, Cuervo *et al.* 2009, Silverman *et al.*, 2010, Hassani *et al.* 2011, Gómez-Arreaza *et al.* 2012) y en los exosomas de diferentes especies de *Leishmania* (Silverman *et al.*, 2010). Enolasa es una enzima glicolítica que ha sido localizada también en la superficie de *L. mexicana* (Vanegas *et al.*, 2007) y en *T. cruzi* (Almeida *et al.*, 2004), como una proteína con capacidad de unión al plasminógeno. Constituye además un receptor de

plasminógeno en células de mamíferos y en numerosos organismos patógenos (Redlitz *et al.*, 1995, Avilán *et al.*, 2011). Es secretada por organismos procariotas, eucariotas y por diversos tipos celulares (Henderson y Martin, 2011). En parásitos del género *Leishmania*, enolasa se ha encontrado formando parte del secretoma y de los exosomas de *L. donovani*, *L. major* y *L. braziliensis*. Estos resultados son similares a los reportados por Toledo *et al.*, 2012 quienes encontraron que la enolasa presente en las vesículas de membrana secretadas por *B. burgdorferi* constituye un receptor de plasminógeno.

El hallazgo de las proteínas de unión a plasminógeno humano en las vesículas de membrana de *L. mexicana*, podría constituir una estrategia adicional que utilizan estos parásitos y que están asociados al proceso de invasión y establecimiento de la infección en el hospedador. Una vez que las proteínas son secretadas/excretadas podrían actuar como “minas” ya que tienen la capacidad de unir el plasminógeno del hospedador mamífero, transformarlo en plasmina, proteasa que le va a permitir la degradación de la fibrina y proteínas de la matriz extracelular, facilitando así el encuentro del parásito con el macrófago. Todas las proteínas (FE-1 α , GP63, enolasa y LACK) reportadas en las vesículas de membrana de *L. mexicana*, también fueron encontradas en un análisis proteómico realizado recientemente por Bayer-Santos *et al.*, 2013 en vesículas de membrana secretadas/excretadas por epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*, protozoario de la misma familia Trypanosomatidae.

Adicionalmente, en las vesículas de membrana estudiadas de *L. mexicana*, se reveló la presencia de dos proteínas involucradas en la glicólisis: GAPDH y PGK,

resultados que coinciden con los reportados por Silverman *et al.*, 2010 en exosomas de *Leishmania* spp. Al igual que la enolasa, GAPDH y PGK son conocidas como proteínas “moonlighting” (Jeffery, 1999; Henderson y Martin, 2011), porque no solo participan en procesos metabólicos como la glicólisis sino que también desempeñan múltiples funciones no relacionadas y pueden tener diferentes localizaciones en la célula. Con respecto a GAPDH, es una proteína localizada en la superficie de muchas bacterias Gram positivas virulentas (Pancholi y Fischetti, 1997; Egea *et al.*, 2007), y protozoarios como *T. vaginalis* (Lama *et al.*, 2009), en el producto de excreción/secreción de tremátodos y nemátodos patógenos al hombre (Ramajo-Hernández *et al.*, 2007; González-Miguel *et al.*, 2013), en los exosomas de *Leishmania* spp. (Silverman *et al.*, 2010) y constituye un receptor de plasminógeno en algunos organismos procariotas (Winram y Lottenberg, 1996; Bergmann y Hammerschmidt, 2004; Matta *et al.*, 2010). Asimismo, en algunas bacterias participa en procesos de señalización celular (Pancholi y Fischetti, 1993), modulación de la respuesta inmune (Madureira *et al.*, 2007), receptor de transferrina (Modun *et al.*, 2000), interactúa con la fibronectina (Dallo *et al.*, 2002) y es principalmente reconocido como un factor de virulencia en diversos organismos patógenos (Henderson y Martin, 2011). En relación a PGK, ha sido identificada en los exosomas de *Leishmania* spp. (Silverman *et al.*, 2010) como un receptor de plasminógeno en estreptococos oral que forman la placa dental (Kinnby *et al.*, 2008) y han sido encontrados en la superficie celular de *Streptococcus* del grupo B, participando en la unión de la actina celular, sugiriendo que podría estar asociada con la internalización del patógeno a la célula (Burnham *et al.*, 2005). En resumen, aun se desconocen las

funciones que podrían desempeñar GAPDH y PGK en las vesículas de membrana en *L. mexicana*, pero es probable que actúen en los procesos vinculados con la interacción parásito-hospedador.

En el presente estudio se encontró que las vesículas de membrana intactas de *L. mexicana*, tienen la capacidad de unir plasminógeno humano *in vitro* y esa interacción fue inhibida por el ácido ϵ -aminocaproico, sugiriendo que en la unión están involucrados residuos de lisina. Estos resultados se corresponden con el análisis de las vesículas de membrana de *L. mexicana* realizado mediante Ligand blotting, el cual permitió revelar la presencia de proteínas identificadas como receptores de plasminógeno: enolasa (57 kDa) y LACK (36 kDa), corroborada por Western blotting y una proteína de bajo peso molecular (15 kDa), la cual fue identificada por espectrometría de masa como una proteína miristoilada pequeña 1 (SMP-1), reportada previamente por Silverman *et al.*, 2010 presente en los exosomas de *Leishmania* spp.

Por lo tanto, se recomienda realizar posteriormente ensayos para conocer la contribución de cada una de ellas en la unión de plasminógeno, aunque, no se descarta la existencia de otras proteínas con capacidad de unión al plasminógeno que aun no han sido identificadas.

SMP-1 pertenece a una nueva familia de proteínas aciladas que existen solamente en protozoarios de la familia *Trypanosomatidae*, caracterizada por estar miristoilada y palmitoilada *in vivo*, identificada inicialmente en un análisis proteómico de membranas resistentes a detergentes en *L. major* (Tull *et al.*, 2004). Es una proteína que comparte cierta identidad con la región N-terminal (dominio I) de las calpaínas de los kinetoplastidas (Ersfeld *et al.*, 2005) y una proteína del citoesqueleto

(TbCAP5.5) identificada en *T. brucei* (Hertz-Fowler et al., 2001). SMP-1 es una proteína exclusivamente localizada en el flagelo, que se extiende desde el cuerpo basal hasta el extremo distal del flagelo, no asociada al citoesqueleto. Basado en un número estimado de copias (10^5 copias/célula), es probable que ésta proteína tapice toda la cara interna de la membrana flagelar (Tull et al., 2010).

SMP-1 es expresada a altos niveles en las formas promastigotes de *Leishmania* spp., sin embargo, no ha sido detectada en las formas amastigotes que contienen un flagelo corto en el interior del bolsillo flagelar; constituye uno de los primeros marcadores específicos de la elongación del flagelo durante la diferenciación de los parásitos de amastigotes a promastigotes. En relación a su función, SMP-1 es una proteína que participa en la biogénesis, elongación y funcionamiento normal del flagelo; experimentos realizados con parásitos knock-out de esta proteína permitieron visualizar promastigotes inmóviles, exhibiendo flagelos cortos con movimientos no controlados en dirección circular y formación de estructuras aberrantes en la membrana flagelar (Tull et al., 2009).

El genoma de *Leishmania* contiene cuatro genes localizados en el cromosoma 20 que codifican para las proteínas miristoiladas pequeñas encontrándose: SMP-1, SMP-2, SMP-3 y SMP-4, las cuales difieren en el estado de acilación (Tull et al., 2011). Con respecto a SMP-1, se ha demostrado que la doble acilación es indispensable para su localización en el flagelo ya que la ausencia del anclaje de miristato y palmitato previene su asociación a la membrana flagelar resultando su ubicación en el citoplasma. SMP-2 posee un motivo de miristoilación y se encuentra localizada en el bolsillo del flagelo; SMP-3 carece de sitios acilados; SMP-4 sólo presentan un motivo

de miristoilación y se localiza predominantemente en la membrana pelicular. Estas SMPs difieren de SMP-1, también por presentar secuencias diferentes en su extremo C-terminal. Aunque las funciones de las proteínas SMPs aun no han sido dilucidadas y presentan diferentes localizaciones subcelulares, se ha sugerido que las SMPs podrían estar involucradas en diversos procesos celulares.

En una primera evaluación de SMP-1 utilizando herramientas bioinformáticas, no se encontró ninguno de los motivos internos clásicos de unión a plasminógeno previamente reportado en la literatura, sin embargo, al analizar su secuencia de aminoácidos, se observó que SMP-1 posee un residuo de lisina en el extremo carboxilterminal, característica importante reconocida de las proteínas de unión a plasminógeno humano, sugiriendo un nuevo candidato a ser receptor de plasminógeno en *L. mexicana*. Aunque el análisis estructural sugiere que SMP-1 podría ser un receptor de plasminógeno, también es importante que la proteína en su conformación nativa sea capaz de unir plasminógeno con una afinidad tal que la unión ocurra a concentraciones fisiológicas de plasminógeno. Con la finalidad de corroborar éstas afirmaciones que constituyen características importantes de las proteínas que son receptores de plasminógeno, SMP-1 fue clonada y sobreexpresada en un sistema de expresión heterólogo en *E. coli*, obteniéndose la proteína recombinante pura y en forma soluble (SMP1r). Después de su purificación y almacenamiento se observó que la proteína recombinante tiene la tendencia de formar dímeros estables, aún en presencia de SDS y agentes reductores, lo que sugiere que SMP-1 podría estar asociada a la formación de oligómeros *in vivo* (Tull *et al.*, 2010).

La obtención de la proteína SMP-1 en forma soluble permitió la producción de los anticuerpos policlonales que fueron utilizados para diferentes ensayos de ubicación subcelular e inmunomicroscopía. Se corroboró mediante Western blotting, la presencia de SMP-1 en el extracto de los parásitos y en los exosomas de las 3 especies de *Leishmania*, observándose mayormente concentrada en éstas microvesículas. Adicionalmente, los ensayos de inmunofluorescencia realizados en promastigotes permeabilizados de *Leishmania* spp., permitió confirmar que SMP-1 constituye principalmente una proteína flagelar, tal como había sido previamente descrita por Tull *et al.*, 2004.

Los ensayos de interacción SMP1r-plasminógeno demostraron que esta proteína es capaz de unir plasminógeno *in vitro*, con una constante de disociación (K_d) de 0.24 μM , valor que resultó ser inferior a la concentración fisiológica del plasminógeno sanguíneo (2 μM), indicando una alta afinidad de la proteína recombinante por su ligando. A pesar de que SMP1r no se encuentra en su conformación nativa por la presencia adicional de una cola de histidinas ($^1\text{MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH}^{20}$) en su extremo N-terminal que podría afectar de forma negativa o positiva la capacidad de unión al plasminógeno, se demostró utilizando otra proteína control (enzima mállica de *Phytophthora infestans* con His-Tag) que este factor no interfiere en la interacción y además es poco probable por la ausencia de residuos de lisina. El ensayo de inhibición con ácido ϵ -aminocaproico, reveló que la unión es específica y mediada por residuos de lisina. Adicionalmente, se demostró que el residuo de lisina (K) presente en el extremo carboxilterminal de SMP1r, está implicado en el

reconocimiento de la interacción con el plasminógeno al evidenciar una inhibición del 65% de la unión mediante el tratamiento con carboxipeptidasa B.

El tratamiento con diferentes proteasas permitió demostrar que SMP-1 se encuentra en el interior de las vesículas de membrana de *L. mexicana*, es decir, que no está expuesta en la superficie de las vesículas; estos resultados coinciden con los reportados por Tull *et al.*, 2004 donde señalan que SMP-1 está localizada tapizando toda la cara interna de la membrana flagelar en *L. major*. Al igual que enolasa, SMP-1 no tiene ningún péptido señal (secuencia de importación a membrana) que podría explicar su presencia en las vesículas, pero ha sido demostrado que SMP-1 es una proteína que está miristoilada y palmitoilada, lo que le permitiría su anclaje en la membrana del flagelo. Hasta el momento no se ha dilucidado si SMP-1 es una proteína que solamente está presente en las vesículas secretadas formadas por desprendimiento de la membrana del flagelo o si es exportada hacia las vesículas. En este sentido, Silverman *et al.*, 2010 han observado vesículas brotando o emergiendo del flagelo de *Leishmania* spp. En general, aun no están claros los mecanismos de tráfico proteico hacia las vesículas de membrana secretadas, sin embargo, se conoce que diversos anclajes a la membrana plasmática como el miristato y palmitato, permiten que ciertas proteínas citoplasmáticas altamente oligoméricas se localicen en vesículas secretadas en una línea de células T (Shen *et al.*, 2011).

Las proteínas de unión a plasminógeno secretadas en las vesículas de membrana, podrían estar implicadas en la diseminación de los patógenos en el hospedador; ya que el plasminógeno unido puede ser activado fisiológicamente por el t-PA o uroquinasa del hospedador, transformándolo en plasmina, serin proteasa que favorece

la degradación de la fibrina, matriz extracelular y activación de metaloproteasas (Sun, 2006; Bergmann y Hammerschmidt, 2007). Esto ha sido observado en vesículas secretadas por células tumorales, las cuales poseen una actividad fibrinolítica dependiente del plasminógeno debido a la presencia del complejo uroquinasa y su receptor en la superficie celular, lo que podría favorecer la invasión de las células tumorales (Ginestra *et al.*, 1997). Asimismo, vesículas que brotan de la membrana celular de células endoteliales estimuladas, promueven la conversión del plasminógeno en plasmina, ya que expresan uroquinasa y su receptor en la superficie celular, un mecanismo utilizado en la modulación de la angiogénesis (Lacroix *et al.*, 2007).

Aunque uno de los requisitos para que una proteína desempeñe la función de ser un receptor de plasminógeno, es su ubicación en la cara externa de la membrana plasmática, en el presente estudio, la localización de SMP-1 en el interior de las vesículas de membrana de *L. mexicana* contrasta con esta característica. No obstante, se podría especular que cuando las vesículas son secretadas pueden sufrir una ruptura liberando su contenido al medio extracelular (Cocucci *et al.*, 2009) y en el caso de SMP-1 podría permanecer unida a fragmentos de membrana por la presencia de anclajes y unir plasminógeno.

Enolasa fue la otra proteína de unión a plasminógeno encontrada en las vesículas de membrana de *L. mexicana*. Esta es una proteína que tiene una localización dual en parásitos de *L. mexicana*; ha sido previamente reportada tanto en el citosol como en la cara externa de la membrana plasmática (Quiñones *et al.*, 2007). En este sentido, como se ha descrito que las vesículas secretadas tienen la misma orientación de la

membrana de la célula donadora (Théry *et al.*, 2009), por lo tanto, se presume que la enolasa se encuentra en el interior y en la superficie de estas vesículas. Sin embargo, en el presente estudio se demostró que la enolasa presente en las vesículas de membranas secretadas en *L. mexicana* exhibe un comportamiento diferente a la enolasa presente en los parásitos, ya que resultó ser resistente a la digestión por diferentes proteasas. Estos hallazgos sugieren que la enolasa localizada en las vesículas de membrana secretadas podría estar asociada a otras proteínas que la protegen de la acción de estas proteasas, tal como ha sido demostrado en *T. cruzi*, donde la enolasa citosólica forma parte de un complejo multiproteico donde interactúan al menos cinco proteínas: p45, p57, p61, p64 y p75 (Domingo-Sananes, 2004). De estas cinco proteínas, p57 fue detectada en los exosomas de *L. mexicana*.

La resistencia de enolasa a la degradación por proteasas difiere con el resultado reportado por Toledo *et al.*, 2011, quienes encontraron enolasa en la cara externa de la membrana de las vesículas secretadas por *B. burgdorferi* sensible a la degradación proteolítica por proteinasa K.

En síntesis, de este trabajo se desprende que las vesículas de membrana secretadas por los promastigotes de *L. mexicana* bajo la influencia de una diversidad de microambientes celulares, tienen proteínas receptores de plasminógeno con la capacidad de unir plasminógeno, las cuales pueden actuar como “torpedos” o “minas” al adquirir actividad proteolítica por el secuestro de algunos componentes del sistema fibrinolítico del hospedador, lo que facilita el avance de los parásitos a través de la fibrina y la matriz extracelular, promoviendo así el encuentro con los macrófagos

(Figura 52), por lo tanto, los receptores de plasminógeno podrían constituir nuevos factores de virulencia que forman parte del mecanismo patogénico de *Leishmania*.



Figura 52. Esquema de interacción de *Leishmania mexicana* con el sistema fibrinolítico. Tanto los parásitos como las vesículas secretadas por estos protozoarios interactúan con el plasminógeno. Después de la activación del plasminógeno, la plasmina formada es capaz de degradar fibrina y matriz extracelular.

● : exosomas

— : fibrina

👉 : promastigotes

⊙ : amastigotes

👉 : macrófagos

CONCLUSIONES

1. En las vesículas de membrana secretadas y en la fracción microsomal de *Leishmania* spp. se identificaron tres proteínas con capacidad de unión al plasminógeno: Enolasa, LACK y SMP-1. La presencia de receptores de plasminógeno en las vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp., podrían constituir nuevos factores de virulencia que probablemente forman parte del mecanismo patogénico de *Leishmania*.
2. La proteína SMP-1 es capaz de interactuar con el plasminógeno humano a través de una lisina carboxilterminal, con una constante de disociación de 0,24 μM que se encuentra dentro del rango fisiológico de la concentración de plasminógeno.
3. *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum*, al igual que *Leishmania mexicana*, también tienen la capacidad de unir plasminógeno humano.
4. La inhibición de la interacción parásitos-plasminógeno por el ácido ϵ -aminocaproico, pone de manifiesto que en la unión están involucrados residuos de lisina.

PERSPECTIVAS

Para complementar el presente trabajo de investigación, se propone realizar a futuro los siguientes ensayos:

1. Separar las subpoblaciones de vesículas de membrana secretadas por *Leishmania* spp. con la finalidad de obtener las fracciones correspondientes a las microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos.
2. Realizar una caracterización física y bioquímica de cada una de las subpoblaciones de vesículas de membrana purificadas en *Leishmania* spp. en la búsqueda de marcadores útiles en la identificación de las mismas.
3. Identificar otros receptores de plasminógeno en las vesículas de membrana secretadas de *Leishmania* spp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaronson, R., Graven, K., Tucci, M., McDonald, R. y Farber, H. 1995. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 27752-27757.

Alexander, J., Satoskar, A. y Russell, D. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, 112: 2993-3002.

Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P. y Dimier-Poisson, I. 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii*. *Infection and Immunity*, 72: 4127-4137.

Almeida, L., Vanegas, G., Calcagno, M., Concepción, J.L., Avilán, L. 2004. Plasminogen interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 63-67.

Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F y López-Velez, R. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Review*, 10 : 298-319.

Andronicos, N. M., Ranson, M., Bognacki, J. y Baker, M. 1997. The human ENO1 gene product (recombinant human alpha-enolase) displays characteristics required for a plasminogen binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337: 27-39.

Angles-Cano, E. 1994. Overview on fibrinolysis: plasminógeno activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chemistry and Physics of Lipids*, 67/68: 353-362.

Arraiz, G. 2011. Enolasa: un receptor de plasminógeno en la superficie de *Trypanosoma cruzi* como factor de virulencia. Trabajo Especial de Maestría. Postgrado en Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela. 138 pp.

Atyame, N., Sommerer, N. y Rofidal, V. 2010. Excreted/Secreted Proteins from *Trypanosome* Procyclic Strains. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 212817, 8 p.

Avilán, L., Calcagno, M., Figuera, M., Lemus, L., Puig, J. y Rodríguez, A.M. 2000. Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen-plasmin system. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 110: 183-193.

Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P.A.M. y Concepción, J.L. 2011. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Research*, 932549.

Bachmann, F. 1987. Fibrinolysis. In *Thrombosis and Haemostasis*, Verstraete, M., Vermynen, J., Lijnen, H. y Arnout, J. eds. (Leuven: Leuven University Press), 227-265 pp.

Bang, C. y Thum, T. 2012. Exosomes: new players in cell-cell communication. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44: 2060-2064.

Bañuls, A., Hide, M. y Prugnolle, F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64: 1-109.

Barros, X. 2011. Interacción Enolasa-plasminógeno en la superficie de la forma infectiva de *T. cruzi*. Trabajo Especial de Maestría. Postgrado en Biología Celular. Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela. 177 pp.

Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S.P., Cordero, E.M., Marques, A.F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., da Silveira, J.F. y Almeida, I. 2013. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, 12: 883-897.

Bergmann, M., Rohde, G., Chhatwal, S. y S. Hammerschmidt. 2001. α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology*, 40: 1273-1287.

Bergmann, M., Rohde, F. y Hammerschmidt, S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infection and Immunity*, 72: 2416-2419.

Bergmann, S. y Hammerschmidt, S. 2007. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thrombosis and Haemostasis*, 98: 512-520.

Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J. y Schorey, J. 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110: 3234–3244.

Bhattacharya, S., Ploplis, V.A. y Castellino, F.J. 2012. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 482096: 1-19.

Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S. y Marcilla, A. 2004. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*, 563: 203-206.

Boelaert, M., Criel, B., Leeuwenburg, J., Van Damme, W., Le Ray, D. y Van der Stuyft, P. 2000. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 465–471.

Bonfante, G. y Barroeta, S. 2002. *Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela*. Tipografía y Litografía Horizonte, C.A. 270 pp.

Borges, R. 2010. Evaluación de conocimientos de la Leishmaniasis visceral en comunidades intervenidas con el programa de control: Municipios Díaz y Gómez-Isla de Margarita del estado Nueva Esparta. *Venezuela. Espacio Abierto*, 19: 79-92.

Boyle, M. y Lottenberg, R. 1997. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thrombosis and Haemostasis*, 77: 1-10.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brendle, J., Outlaw, A., Kumar, A., Boykin, D., Donald, P., Richard, P. Tidwell, R. y Werbovets, K. 2002. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 797-807.

Brittingham, A., Morrison, C., McMaster, W., McGwire, B., Chang, S. y Mosser, D. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology*, 155: 3102–3111.

Brittingham, A., G. Chen, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser. 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection and Immunology*, 67: 4477-4484.

Burgin, J. y Schaller, J. 1999. Expression and characterization of a mutated human plasminogen kringle 3 with functional lysine binding site. *Cellular and Molecular Life of Sciences*, 55: 135-141.

Brown, C., Kuhlman, P., Mattingly, S., Slates, K., Calie, P. y Farrar, W. 1998. A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Protein Chemistry*, 17: 855-866.

Calcagno, M., Avilán, L., Colasante, C., Berruela, L. y Salmen, S. 2002. Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitology Research*, 88: 972-978.

Castellino, F. 1981. Recent advances in the chemistry of the fibrinolytic system. *Chemistry Reviews*, 81: 431-446.

Castellino, F. y Ploplis, V. 2005. Structures and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis*, 93: 647-654.

Concepción, J.L., Gonzalez-Pacanowska, D. y Urbina, J. 1998. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 352: 114-120.

Chang, K., Chaudhuri, G. y Fong, D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* Virulence. *Annual Review of Microbiology*, 44: 499-529.

Chandler, W. 1996. The human fibrinolytic system. *Clinical Reviews in Oncology/Haematology*, 24: 27-45.

Chang, Y., Mochalkin, M., McCance, S., Cheng, B., Tulinsky, A. y Castellino, F. 1998. Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen. *Biochemistry*, 37: 3258-3271.

Chang, K., Chaudhuri, G. y Fong, D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* Virulence. *Annual Review of Microbiology*, 44: 499-529.

Chaput, N., y Théry, C. 2011. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 33: 419-440.

Cocucci, E., Racchetti, G. y Meldolesi, J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, 19: 43-51.

Cohen, S., Chang, A. y Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69: 2110-2114.

Coleman, J. L. y Benach, J. L. 1999. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 134: 567-576.

Collen, D. y Lijnen, H. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, 78: 3114-3124.

Collen, D. 2001. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology, American Society Hematology and Education Program*, 1-9.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16: 10881-10890.

Croan, D.G., Morrison, D.A. y Ellis, J.T. 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 149-159.

Croft, S., Sundar, S. y Fairlamb, A. 2006. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 11-126.

Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A. y Booth, N.A. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen binding proteins. *Molecular Microbiology*, 47: 1637-1651.

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

Cuervo, P., Domont, G. y De Jesus, J.B. 2010. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*. doi:10.1016/j. j. prot.2009.12.012.

Cummins, D., Amin, S., Halil, O., Chiodini, P., Hewitt, P. y Radley-Smith, R. 1995. visceral leishmaniasis after cardiac surgery, *Archives of Diseases in Childhood*, 72: 235-236.

Dallo, S., Kannan, T., Blaylock, M. y Baseman, J. 2002. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumonia*. *Molecular and Microbiology*, 46: 1041-1051.

Davies, R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R. y Rodríguez, N. 2000. The epidemiology and control of Leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saúde Pública*, 16: 925-950.

Deatherage B. y Cookson, B. 2012. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, 80:1948–57.

De la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M. y Oleaga, A., 2010. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology*, 173: 76-84.

De Lima, H., Borges, R., Escobar, J. y Convit, J. 2010. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 43:9-20.

De Oliveira Gomes, D., Schwedersky, R., Barbosa, L., Da Silva, C., Matos, H., López, U. y Rossi-Bergmann, B. 2012. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral Leishmaniasis. *Parasitology*, 139: 1562-1569.

Desjeux, P. 2001. Worldwide increasing factors for Leishmaniasis. *Medical Microbiology Immunology*, 190: 77-79.

Deutsch, D. y Mertz, E. 1970. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, 170: 1095-1096.

Domingo-Sananes, M. 2004. Ubicación Subcelular, purificación, caracterización y estudios de interacción proteína-proteína de la enolasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Dostálova, A. y Volf, P. 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, 5: 2-12.

Duijvesz, D., Luider, T., Bangma, CH. y Jenster, G. 2011. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *European Urology*, 59: 823-31.

Dunnig, N. 2009. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology, *Biosciences Horizons*, 2: 73-82.

Ehinger, S., Schubert, W., Bergmann, S., Hammerschmidt, S. y Heinz, D. 2004. Plasmin(ogen)-binding alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 343: 997-1005.

Elamin, A. y Omer, M. 1992. Visceral leishmaniasis in a 6 week old infant: possible congenital transmission. *Tropical Doctor*, 22 : 133-135.

El-Hani, C., Borges, V. y Barcinsky, M. 2012. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 96.

Ellen, A., Albers, S., Huibers, W., Pitcher, S., Hobel, C., Schwarz, H., Folea, M., Schouten, S., Boekema, E., Poolman, B. y Driessen, A. 2009. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles*, 13: 67-79.

Ellis, T. y Kuehn, M. 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology Reviews*, 74: 81-94.

Engers, H.D., Bergquist, R., y Modabber, F. 1996. Progress on vaccines against parasites. *Developments in Biological Standardization*, 87: 73-84.

Ersfeld, K., Barraclough, H. y Gull, K. 2005. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *Journal of Molecular Evolution*, 61: 742-57.

Evans y Kedzierski, 2012. Development of vaccines against visceral Leishmaniasis. *Journal of Tropical Medicine*, 3: 1-14.

Forsgren, M., Raden, B., Israelsson, M., Larsson, K. y Heden, L. 1987. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Letters*, 213: 254-260.

Ganguly, N. 2002. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral Leishmaniasis. *Tropical Disease Research, News* 6p.

Gambim, M., Oliveira, A., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L. y Janiszewski, M. 2007. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Critical Care*, 11: R107.

Geer, L., Domrachev, M., Lipman, D. y Bryan, S. 2002. CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Research*, 12: 1619-1623.

Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G. y Peltier, J. 2010. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology*, 10: 20.

Ghandi, N., Young, K., Warmington, J. y Mancera, R. 2008. Characterization of sequence and structural features of the *Candida krusei* enolase. In *Silico Biology*, 8: 449-460.

Ghosh, A.K., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M. y Jacobs-Lorena, M., 2011. *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 17153-17158.

Ginestra, A., Monea, S., Seghezzi, G., Dolo, V., Nagase, H. y Mignatti, P. 1997. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 17216-22.

Gish, W. y States, D. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics*, 3: 266-272.

Gómez-Arreaza, A., Acosta, H., Barros-Álvarez, X., Concepción, J.L., Albericio, F. y Avilán, L. 2011. *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. *Experimental Parasitology*, 127: 752-761.

Gong, Y., Hart, E., Shchurin, A. y Hoover-Plow, J. 2008. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118: 3012-3024.

González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F. 2012. Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181: 134-140.

González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. y Simón, F. 2013. Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Veterinary Parasitology*. doi:p11: S0304-4017(13)00053-8.10.1016/j.vetpar. 01.028.

Gonzalo, R., Rodríguez, J., Rodríguez, D., González-Aseguinolaza, G., Larraga, V. y Esteban, M. 2001. Protective immune response against cutaneous Leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and Infection*, 3: 701-11.

Gooley, P., Mertens, H., Tull, D. y McConville, M. 2006. 1H, 13C and 15N resonance assignments of SMP-1: a small myristoylated protein from *Leishmania major*. *Journal of Biomolecular NMR*, 36: 1-26.

Goto, H. y Lindoso, J. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8: 419-433.
Grevelink, S. y Lerner, E. 1996. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34: 257-272.

Guessow, D. y Clackson, T. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Research*, 17: 4000.

Gurunathan, S., Sacks, D., Brown, D., Reiner, S., Charest, H. y Glaichenhaus, N. 1997 Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen

confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. Journal of Experimental Medicine, 186: 1137–1147.

Gutiérrez, J. 1993. Prevalence of anti-*Leishmania* antibodies in parenteral drug addicts: yield value of 2 study techniques. Medicina Clínica, 100: 168.

György, B., Szabó, T., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E. Kittel, A. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cellular and Molecular Life of Sciences, 68: 2667–2688.

Hajjar, K., Harpel, P., Jaffe, E. y Nachman, R. 1986. Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. Journal of Biological Chemistry, 261: 11656–11662.

Hall, S.W., Humphries, J.E. y Gonias, S.L. 1991. Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by alpha 2-antiplasmin and alpha 2-macroglobulin. Journal of Biological Chemistry, 266: 12329-12336.

Hannaert, V., Albert, M. A., Rigden, D. J., da Silva Giotto, M. T., Thiemann, O., Garratt, R.C., van Roy, J., Opperdoes, F. R. y Michels, P. A. 2003. Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase. European Journal of Biochemistry, 270: 3205–3213.

Harlow, E. y Lane, D. 1999. Using antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodríguez, B. y Agabian, N. 1998. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. Journal of Clinical Microbiology, 36: 1989-1995.

Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. y Olivier, M. 2011. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. PLoS One 6:e18724.

Henderson, B. y Martin, A. 2011. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. Infection and Immunity, 79: 3476-3491.

Henkin, J., Marcotte, P. y Yang, H. 1991. The plasminogen-plasmin system. Progress in cardiovascular diseases, 34: 135-164.

Hertz-Fowler, C., Ersfeld, K. y Gull, K., 2001. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemistry Parasitology, 116: 25-34.

Hezarjaribi, H., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., Sharifi, Z. y Jorjani, O. 2013. Effect of IL-22 on DNA vaccine encoding LACK gene of *Leishmania major* in BALB/c mice. Experimental Parasitology, 134: 341-348.

Herwaldt, B. 1999. Leishmaniasis. Lancet, 354: 1191-1199.

Herwaldt, B. y Juranek, D. 1993. Laboratory-acquired Malaria, Leishmaniasis, Trypanosomiasis and Toxoplasmosis. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 48: 313-23.

Hood, J., San Roman, S. y Wickline, S. 2011. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. Cancer Research, 71: 3792-3801.

Hosseini, H., Fooladi, A., Nouranis, R. y Ghanezadeh, Z. 2013. The Role of Exosomes in Infectious Diseases. Inflammation and Allergy - Drug Targets, 12: 29-37.

Hu, Q., Noll, R., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. y Cooks, G. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. Journal of mass spectrometry, 40: 430-443.

Jeffery, C. 1999. Moonlighting proteins. Trends in Biochemical Sciences, 24: 8-11.

Jhingran, A., Chatterjee, M. y Madhubala, R. 2008. Leishmaniasis: Epidemiological Trends and Diagnosis. In: *Leishmania after the genome*. J Myler, F Nicolas Eds., pp.1-14. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S. y Brattig, N.W., 2003. Molecular cloning of an alfa-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. Biochimica et Biophysica Acta, 1627: 111-120.

Kaberdin, V. y Lin-Chao, S. 2009. Unraveling new roles for minor components of the *E. coli* RNA degradosome. *RNA Biology*, 6: 402-405.

Kelly, B., Stetson, D. y Locksley, R. 2003. *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *The Journal of Experimental Medicine*, 198: 1689–1698.

Keller, S., Sanderson, M., Stoeck, A. y Altevogta, P. 2006. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*, 107: 102-108.

Khalil, E., El Hassan, A., Zijlstra, E., Mukhtar, M., Ghalib, H., Musa, B., Ibrahim M., Kamil, A., Elsheikh, M., Babiker, A. y Modabber, F. 2000. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet*. 356: 1565–1569.

Killick-Kendrick, 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinics in Dermatology*, 17: 279-289.

Kim, J. W. y Dang, C. 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 142-150.

Kinby, B., Booth, N. y Svensater, G. 2008. Plasminogen binding by oral streptococci from dental plaque and inflammatory lesions. *Microbiology*, 154: 924-931.

Lacroix R., Sabatier, F., Mialhe, A., Basire, A., Pannell, R. y Borghi, H. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood*, 110: 2432–2439.

Laemmli, N. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 – 685.

Lähteenmäki, K., Edelman, S. y Korhonen, T. 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends in Microbiology*, 13: 79-85.

Lainson, R. y Shaw, J. 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Vol. 2, Academic Press, London and New York, 1-116 p.

Lainson, R. y Shaw, J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniasis In Biology And Medicine* (e.d. Peters, W. & Killick-Kendrick, R) 1-120 pp. Academic Press, London.

Lainson, R. y Shaw, J. 1998. New World leishmaniasis-The Neotropical *Leishmania* species.. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections* (volume 5), *Parasitology*. 9th ed. New York: Oxford University Press; p. 241-82.

Lama, A. Kucknoor, A., Mundodi, V. y Alderete, F. 2009. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 77: 2703–2711.

Lambertz, U., Silverman, J., Nandan, S., McMaster, D., Clos, W., Foster, J. y Reiner, N. 2012. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral Leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 91: 887-99.

Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., López, R., Thompson, J., Gibson, T. y Higgins, D. 2007. ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

Law, R., Caradoc-Davies, T., Cowieson, N., Quez, A., Encarnacao, J., Steer, D., Cowan, A., Zhang, Q., Lu, B., Pike, R., Smith, A., Coughlin, P. y Whisstock, J. 2012. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Press*, 1: 185-190.

Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupoti-ì, T., Bartholomeeusen, K. y Cheng, Y. 2010. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T Cells. *Traffic*, 11: 110–122.

Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., Boyle, M.D., 1994. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in Microbiology*, 2: 20-24.

Madureira, P., Baptista, M., Vieira, M., Magalhães, V., Camelo, A., Oliveira, L., Ribeiro, A., Tavares, D., TrieuCuot, P., Vilanova, M. y Ferreira, P. 2007. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *Journal of Immunology*, 178: 1379-1387.

Maldonado, J., Calcagno, M., Puig, J., Maizo, Z. y Avilán, L.A., 2006. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Experimental Molecular Pathology*, 80: 289-294.

Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Mínguez, M.T., Valero, M.L., Sánchez, M., Muñoz-Antoli, C., Toledo, R. y Bernal, D. 2012. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*, 7, e45974.

Markus, G., Priore, R. y Wissler, F. 1979. The binding of tranexamic acid to native (glu) and modified (lys) human plasminogen and its effect on conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 1211–1216.

Marangos P., Zis A., Clark R. y Goodwin F. 1978. Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Research*, 150: 117–133.

Marsden, P. 1990. Mucocutaneous leishmaniasis. *British Medical Journal*, 301: 656-657.

Mathu, P., Samantaray, J., Vajpayee, M. y Samanta, P. 2006. Visceral leishmaniasis/human immunodeficiency virus co-infection in India: the focus of two epidemics. *Journal Medical Microbiology*, 55: 919-922.

Marti, D., Schaller, J. y Llinas, M. 1999. Solution structure and dynamics of the plasminogen kringle 2-AMCHA complex: 3(1)-helix in homologous domains. *Biochemistry*, 38: 3258-3270.

Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L. y Cowman, A.F. 2005. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *Journal of Cell Biology*, 171: 587–592.

Martin-Jaular, L., Nakayasu, E., Ferrer, M., Almeida, I. y Del Portillo, H. 2011. Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One*, 6(10):e26588.

Mathivanan, S., Ji, H. y Simpson, R. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73: 1907–1920.

Matta, S., Agarwal, S. y Bhatnagar, R. Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein,” *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 2111–2120.

Mayrink, W., Magalhães, P., Michalick, M., da Costa, C., Oliveira, A., Melo, M., Toledo, V., Nascimento, E., Dias, M., Genaro, O., Hermeto, M. y Williams, P. 1992.

Immunotherapy as a treatment of American cutaneous Leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. *Parassitologia*, 34: 159-165.

McGwire, B. y K. P. Chang. 1994. Genetic rescue of surface metalloproteinase (gp63) deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, 66:345–347.

McGwire, B., Chang, K. y Engman, D. 2003. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity*, 71: 1008–1010.

Meinecke, C., Schottelius, J., Oskam, L. y Fleischer, B. 1999. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*, 104 : 1-5.

Miles, L. y Plow, E. 1985. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *Journal Biology and Chemistry*, 26: 4303-4311.

Miles, L., Ginsberg, M., White, J. y Plow, E. 1986. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *Clinical Investigation*, 77: 2001-2009.

Miles, L. y Plow, E. 1991. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*, 66: 32–36.

Miles, L., Castellino, F. y Gong, Y. 2003. Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13: 21–30.

Miles, L., Hawley, S., Baik, N., Andronicos, N., Castellino, F. y Parmer, R. 2005. Plasminogen receptors: the *sine qua non* of cell surface plasminogen activation. *Frontiers in Bioscience*, 10: 1754-1762.

Mitra, M., Alizadeh, H., Gerard, R. y Niederkorn, J. 1995. Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. *Molecular Biochemical and Parasitology*, 73: 157-164.

Monzote, L. 2009. Current treatment of Leishmaniasis: a review. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 1: 9-19.

Moreira, M., Del Portillo, H., Milder, R., Balanco, J. y Barcinski, M. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Journal of Cellular Physiology*, 167: 305–313.

Mougneau, E., Altare, F., Wakil, A., Zheng, S., Coppola, T. y Wang, Z. 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*, 268: 563–566.

Mullane, M. y Baker, M. 1999. Elevated plasminogen receptor expression occurs as a degradative phase event in cellular apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, 77: 249-255.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.

Mundodi, V., Kucknoor, A.S. y Alderete, J.F. 2008. Immunogenic and plasminogen binding surface-associated alfa-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 76: 523-531.

Nakajima, K., Hamanoue, M., Takemoto, N., Hattori, T., Kato, K. y Kohsaka, S. 1994. Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *Journal of Neurochemistry*, 63: 2048–2057.

Nandan, D., Knutson, K., Lo, R. y Reiner, N. 2000. Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 67: 464-470.

Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C., y Reiner, N. 2002. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 50190–50197.

Neer, E., Schmidt, C., Nambudripad, R. y Smith, T. 1994. The ancient regulatory protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371: 297–300.

Nickel, W. 2005. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24: 287–308.

Oliveira, D., Freire-de-Lima, C., Nosanchuk, J., Casadevall, A., Rodrigues, M. y Nimrichter, L. 2010. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infection and Immunity*, 78: 1601–1609.

Olliaro, P., Guerin, P., Gerstl, S., Haaskjold, A., Rottingen, J. y Sundar, S. 2005. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *The Lancet Infectious Diseases*, 5: 763-774.

Organización Mundial de la Salud. 2010. Technical Report Series 949. Control of the Leishmaniases. Geneva 22-26.

Pancholi, V. y Fischetti, V. 1997. Cell-to-cell signalling between group a streptococci and pharyngeal cells-role of streptococcal surface dehydrogenase (SDH),” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 418: 499–504.

Pancholi, V. y Fischetti, V. 1998. Alfa-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein of the surface of pathogenic streptococci. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 14503–14515.

Pancholi, V. 2001. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 902–920.

Pant, S., Hilton, H. y Burczynski, M. 2012. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology*, 1163: 1-11.

Pearson, R.D. y Sousa, A.Q. 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Disease*, 22: 1-13.

Pérez, H., Labrador, F. y Torrealba J. W. 1979. Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania Mexicana*. *International Journal of Parasitology*, 9: 27-32.

Ploplis, V. y Castellino, F. 2000. Nonfibrinolytic functions of plasminógeno. *Methods*, 21: 103-110.

Plow, E., Herren, T., Redlitz, L., Miles, L. y Hoover-Plow, J. 1995. The cell biology of the plasminogen system. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9: 939-945.

Ponting, C., Marshall, J. y Cederholm-Williams, S. 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 3: 605–614.

Prudencio, M., Rodríguez, A. y Mota, M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 849-856.

Qu, J., Qu, X., Zhao, M., Teng, Y., Zhang, Y., Hou, K., Jiang, Y., Yang, H. y Liu, Y. 2009. The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Acta Oncológica*, 48: 1173-1180.

Quiñones, W., Peña, P., Domingo-Sananes, M., Cáceres, A., Michels, P. y Avilan, L. 2007. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Experimental Parasitology*, 116: 241–51.

Rak, J. 2010. Microparticles in cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36: 888–906.

Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V. y Oleada, A., 2007a. *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Experimental Parasitology*, 115: 83-91.

Ramajo-Hernández, A., Oleada, A., Ramajo-Martín, V., Pérez-Sánchez, R., 2007b. Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Veterinary Parasitology*, 144: 45-60.

Raposo, G., Nijman, H., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Clifford, V. y Geuze, H. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183: 1161-1172.

Rawlings, N., Tolle, D. y Barrett, A. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378: 705–716.

Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S. y Poirot, M. 2011. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical Pharmacology*, 81: 1171-1182.

Redlitz, A., Fowler, B., Plow, E. y Miles, L. 1995. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells, *European Journal of Biochemistry*, 227: 407–415.

Rioux, J., Lanotte, G., Serres, L., Pratlong, F., Bastien, P. y Periere, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 65: 11-125.

Rodrigues, M., Nakayasu, E., Oliveira, D., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. y Almeida, I. 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*, 7: 58–67.

Rojas, M., Labrador, I., Concepción, J.L., Aldana, E. y Avilán, L. 2008. Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Acta Tropica*, 107: 54-58.

Ross, R. 1903. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal*, 2: 1261-1262.

Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3a edición, Vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sanderson-Smith, M.L., De Oliveira, D.M., Ranson, M. y McArthur, J.D. 2012. Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 272148: 1-14.

Scita, G. y Di Fiore, P. The endocytic matrix. *Nature*, 463: 464-473.

Schorey y Bhatnagar, 2008. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9: 871-881.

Shen, B., Wu, N., Yang, J. y Gould, S. 2011. Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *Journal of Biology Chemistry*, 286: 14383–14395.

Siemens, N., Patenge, N., Otto, J., Fiedler, T. y Kreikemeyer, B. 2011. *Streptococcus pyogenes* M49 plasminogen/plasmin binding facilitates keratinocyte invasion via integrin-integrin-linked kinase (ILK) pathways and protects from macrophage killing. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 21612-21622.

Silverman J.M., Chan, S.K., Robinson, D.P., Dwyer, D.M., Nandan, D., Foster, L.J. y Reiner, N. 2008. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology*, 9: R35.

Silverman, J.M., Clos, J., de Oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J. y Reiner, N.E. 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*, 123: 842-852.

Silverman, J. y Reiner, N. 2010. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology*, 13: 1-9.

Silverman, J. y Reiner, N. 2012. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1: 26.

Simpson, R., Jenseu, S. y Lim, J. 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8: 4083-4099.

Singh, S., Chaudhry, V. y Wali, P. 1996. Transfusion-transmitted kala-azar in India. *Transfusion*, 36: 848-9.

Singh, S. 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, 123: 311-330.

Smith, H. y Marschall, C. 2010. Function and regulation of uPAR in the plasminogen activation system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11: 23-26.

Solbach, W. y Laskay, T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology*, 74: 275-317.

Soo, C., Song, Y., Zheng, Y., Campbell, E., Riches, A., Gunn-Moore, B. y Powis, S. 2012. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*, 136: 192-7.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R., McKerrow, J., Reed, S. y Tarleton, R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118: 1301-1310.

Studier, F. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking

cultures. *Protein expression and purification*, 41: 207-234.

Sun, U., Ringdahl, J. y Momeister, W. 2004. "Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection". *Science*, 305: 1283–1286.

Sun, H. 2006. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology*, 21: 281-288.

Sundar, S. 2001. Drug resistance in Indian visceral Leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, 6: 849-854.

Sundar, S., Jha, T., Sindermann, H., Bachmann, P. y Berman, J. 2003. Oral miltefosine in children with mild to moderate indian visceral Leishmaniasis. *Pediatrics Infectious Disease Journal*, 22: 434-438.

Symmers, W. 1960. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet*, 1 : 127-32.

Théry, C., Regnault, S., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, Raposo, P. y Amigorena, S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. selective accumulation of the heat shock protein. *Journal of Cell Biology*, 147: 599-610.

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. y Amigorena, S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology*, 166: 7309–7318.

Théry, C., Ostrowski, M. y Segura, E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9: 581–593.

Théry, C. 2011. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *Biology Reports*, 3: 15.

Tillet, W. y Gardner, R. 1933. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 58: 485-502.

Toledo, A., Coleman, J., Kuhlrow, C., Crowley, J. y Benach, J. 2012. The enolase of *Borrelia burgdorferi* is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infection and Immunity*, 80: 359-368.

Torrecilhas, A., Schumacher, R., Alves, M. y Colli, W. 2012. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes and Infection*, In Press.

Tracy, J. y Webster, L. 2001. In: Hardman JG, Limbird LE, Eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw Hill; pp. 1097-120.

Tull, D., Vince, J.E., Callaghan, J.M., Naderer, T., Spurck, T., McFadden, G.I., Currie, G., Ferguson, K., Bacic, A. y McConville, M. 2004. SMP-1, a member of a new family of small myristoylated proteins in kinetoplastid parasites, is targeted to the flagellum membrane in *Leishmania*. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 4775-4786.

Tull, D., Naderer, T., Spurck, T., Mertens, H., Heng, J. y McFadden, G. 2010. Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. *Journal of Cell Science*, 123: 544-54.

Tull, D., Heng, J., Gooley, P., Naderer, T. y McConville, M. 2011. Acylation-dependent and-independent membrane targeting and distinct functions of small myristoylated proteins (SMPs) in *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*, doi:10.1016/j.ijpara.12.004.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. y Lötvall, J. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell Biology*, 9: 654-659.

Vanegas, G., Quiñones, W., Carrasco-López, C., Concepción, J.L., Albericio, F. y Avilán, L. 2007. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*, 101: 1511-1516.

Van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. y Raposo, G. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of Biochemistry*, 140: 13-21.

Van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Herrmann, M., Sacks, M., Solbach, M. y Laskay, T. 2006. *Leishmania* disease development

depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proceedings of the national Academy of Sciences, 103: 13837-13842.

Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Research, 31: 3688-3691.

Vlassov, A., Magdaleno, S., Setterquist, R. y Conrad, R. 2012. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions and diagnostic and therapeutic potentials. Biochimica et Biophysica Acta, 1820: 940-948.

Wallen, P. y Wiman, B. 1972. Characterization of human plasminogen. II. Separation and partial characterization of different molecular forms of human plasminogen. Biochimica et Biophysica Acta, 257: 122-134.

Wanderley, J. y Barcinski, M. 2010. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. Cellular and Molecular Life Sciences, 73: 4604-4607.

Wanderley J., Pinto da Silva, L., Deolindo, P., Soong, L., Borges, V., Prates, D., Almeida de Souza, A., Barral, A., Balanco, J., Nascimento, M., Saraiva, E. y Barcinski, M. 2009. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. PloS One, 4:e5733.

Wang, S., Ghosh, A.K., Bongio, N., Stebbings, K.A., Lampe, D.J., Jacobs-Lorena, M. 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109: 12734-12739.

Wang, G., Liu, Y., Qin, A., Shah, S., Deng, Z., Xiang, X., Cheng, Z., Liu, C., Wang, J. y Zhang, L. 2008. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. Journal of Immunology, 181: 5242-5248.

Wilson, J., Schurr, M., LeBlanc, C., Ramamurthy, R., Buchanan, K. y Nickerson, C. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgraduate Medical Journal, 78: 216-224.

Wiman, B. y Wallen, P. 1975. On the Primary Structure of Human Plasminogen and Plasmin. Purification and Characterization of Cyanogen-Bromide Fragments. European Journal of Biochemistry, 57: 387-394.

Winram, S. y Lottenberg, R., 1996. The plasmin-binding protein Plr of group A *streptococci* is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology*, 42: 2311-2320.

Wistow, G. y Piatigorsky, J. 1987. Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science*, 236: 1554-1556.

Wold, F. 1971. Enolase. In: *The Enzymes*, pp. 499-538, Boyer P. D. (ed.), Academic Press, New York.

Wubbolts, R., Leckie, R., Veenhuizen, P., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J., Geuze, H. y Stoorvogel, W. 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 10963-10972.

Yépez, J. y Scorza D., J. 2003. Quimioterapia de la leishmaniasis cutánea localizada. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, XLIII: 9-20.

Zangger, H., Mottram, J. y Fasel, N. 2002. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis?. *Cell Death and Differentiation*, 9: 1126- 1139.

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve