

## Perfil proteico de aislados de *Leishmania mexicana* con diferente virulencia.

Edith A. Fernández Figueroa<sup>1</sup>, Said A. Muñoz Montero<sup>1,2</sup>, César A. Ríos-Muñoz<sup>3,4</sup>, Ingeborg Becker<sup>5</sup>, Claudia Rangel Escareño\*<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Genómica Computacional e Integrativa, Instituto Nacional de Medicina Genómica. México <sup>2</sup>MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, UK. <sup>3</sup>Centro de Estudios Mexicanos UNAM-Costa Rica, Universidad Nacional Autónoma de México, San José, Costa Rica. <sup>4</sup>Secretaría de Desarrollo Institucional, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. <sup>5</sup>Centro de Medicina Tropical, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México. <sup>6</sup>Ciencias Básicas, Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro, Querétaro, Mexico.

### ABSTRACT

#### Protein profile of *Leishmania mexicana* isolates with different virulence

**Introduction.** *L. mexicana* can cause two clinical forms of cutaneous leishmaniasis: localized (LCL) and diffuse (DLC). Gene expression in trypanosomatids is highly regulated at the post-transcriptional level, a massive and systematic analysis of proteins is a good approach to understand better those mechanisms that parasites have developed for increase survival and to become more pathogenic in the human host.

**Objective.** To analyze the protein profile of *L. mexicana* isolates that produce LCL and DCL.

**Material and methods.** Total protein extracts from 10 isolates of promastigotes in stationary phase were used and processed in a Q-Exactive plus mass spectrometer, bioinformatic analysis was performed.

**Results.** 779 proteins were identified, of which 57 were differentially expressed and were used for enrichment analysis, representing the pathways of aminoacylase activity, hydrolase activity, those associated with binding to cofactors, and chaperonins.

**Conclusion.** The proteins, FKBP and HSP60, can be studied for their clinical potential are due to the importance for parasite survival.

#### Historial del artículo

Recibido: 23 feb 2022

Aceptado: 16 jun 2022

Disponible en línea: 1 ene 2023

#### Palabras clave

Leishmaniasis, espectrometría de masas, proteínas, virulencia, *Leishmania mexicana*.

#### Keywords

Leishmaniasis, mass spectrometry, proteins, virulence, *Leishmania mexicana*.

Copyright © 2023 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia:

Claudia Rangel Escareño, Genómica Computacional e Integrativa, Instituto Nacional de Medicina Genómica. Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610, Ciudad de México, México. +525555082966  
E-mail: [crangel@inmegen.gob.mx](mailto:crangel@inmegen.gob.mx)  
<https://revistabiomedica.mx>.

## RESUMEN

**Introducción.** *Leishmania mexicana* puede causar dos formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y cutánea difusa (LCD). Si se considera que, la expresión génica en tripanosomátidos está altamente regulada a nivel post-transcripcional, un análisis masivo y sistemático de proteínas es una buena aproximación para conocer mejor los mecanismos que el parásito ha desarrollado para sobrevivir dentro del hospedero y aumentar su virulencia.

**Objetivo:** Analizar el perfil proteico de aislados de *L. mexicana* que generaron en pacientes diferentes lesiones cutáneas.

**Material y métodos.** Se utilizaron extractos totales de proteína de 10 cultivos de promastigotes en fase estacionaria y se procesaron en un espectrómetro de masas Q-Exactive plus, se realizó el análisis bioinformático.

**Resultados.** Se lograron identificar 779 proteínas, de las cuales 57 estaban diferencialmente expresadas como conjunto de datos para el análisis de enriquecimiento siendo representativas las vías de la actividad de aminoacilasa, hidrolasa, unión a cofactores y chaperoninas.

**Conclusión.** Las proteínas que pueden ser estudiadas para su potencial clínico son las FKBP y HSP60 por la importancia que tienen para la supervivencia del parásito.

## INTRODUCCIÓN

La infección por *Leishmania mexicana* puede causar dos formas clínicas de la enfermedad: Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) y Difusa (LCD). La primera está caracterizada por úlceras en el sitio de inoculación del parásito, mientras que la LCD, la forma más invasiva de la enfermedad, está caracterizada por macrófagos altamente parasitados y la formación de nódulos en todo el tegumento. La causa de la progresión de la enfermedad es aún desconocida, pero se sospecha que los eventos de la respuesta inmune temprana durante el desarrollo de la enfermedad podrían establecer las condiciones que posiblemente determinan el resultado de la infección (1).

En México, se han reportado las cuatro formas clínicas de leishmaniasis: 1) LCL, 2) LCD, 3) Mucocutánea (MC) y 4) Visceral (LV), siendo la cutánea, la forma más común (2). La mayoría de los casos reportados se ubican en el sureste del país, en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Nayarit, Yucatán, Quintana Roo y Campeche, lo que constituye el foco sur (3).

*L. mexicana*, es la cuarta especie del género en haber sido secuenciada en 2011, tiene un tamaño de genoma de 32 Mb, con 34 cromosomas. El genoma tiene un contenido de guanina (G) y citocina (C) de aproximadamente 59%. La cepa secuenciada fue *L. mexicana* MHOM/GT/2001/U1103, que se obtuvo del laboratorio de Byron Arana en Guatemala (4). Los genomas de *Leishmania* spp. incluyendo a *L. mexicana*, se caracterizan por su alta densidad de genes, presentes en arreglos largos de genes policistrónicos y la ausencia de intrones (5,6). En la última actualización, 2016, en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>) se reportaron 8,044 genes que codifican a proteínas anotadas para *L. mexicana*, de los cuales 5,398 están marcadas como no caracterizadas.

Considerando que la expresión génica en tripanosomatidos está altamente regulada a nivel post-transcripcional, un análisis masivo y sistemático de proteínas es una buena aproximación para conocer mejor los mecanismos que han llevado a sobrevivir y mantener y/o aumentar la virulencia de estos patógenos (7). Por esta razón, en el presente estudio se analizó el perfil proteico de aislados de *L. mexicana* que generan en los pacientes diferentes lesiones cutáneas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas en este trabajo son muestras históricas, donadas por el Centro de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, y se utilizaron promastigotes en fase estacionaria, asumiendo que la mayoría los mismos se encontraron en estadio metacíclico.

### Extracción de proteínas

Los botones de parásitos donados a nuestro laboratorio fueron antes descongelados, expandidos en medio 199 con 10% de suero fetal bovino y cosechados en fase estacionaria, los cuales se resuspendieron en amortiguador RIPA (*Radio Immunoprecipitation Assay*) que contenía inhibidores de proteasas. Se incubaron en hielo por 10 minutos y se homogeneizaron por sonicación durante 10 minutos a 4 °C. Las muestras se incubaron 30 minutos en hielo agitando en *vortex* durante 20 segundos cada 5 minutos. Se centrifugó a 10,000  $\times$  g por 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos. La concentración de proteína en las muestras se cuantificó utilizando un método compatible con detergentes (RC-DC de BioRad), utilizando albúmina como curva patrón.

Las muestras fueron ajustadas a 25  $\mu$ g y se diluyeron 1:2 usando amortiguador Laemmli 2X con beta-mercaptoetanol y hervidas por 5 minutos. Posteriormente fueron separadas usando geles SDS-PAGE al 10%; los geles obtenidos fueron teñidos con azul de Coomassie.

#### LC-MS/MS (Liquid chromatography–mass spectrometry, por sus siglas en inglés)

Para cada muestra, se utilizaron 100  $\mu$ g de proteínas las cuales fueron reducidas con una solución de urea 8 M, 100 mM Tris. Posteriormente, las proteínas se alquilaron con iodoacetamida y se digirieron con tripsina. Después de la digestión, se limpiaron las muestras por extracción en fase sólida (SPE). Los péptidos de cada muestra se solubilizaron en amortiguador de carga (3% acetonitrilo complementado con 0.1% ácido acético y 0.01% ácido trifluoroacético). Un total de 10  $\mu$ L fueron inyectados al nano LC-MS/MS usando un sistema automático Easy-nLC 1000 acoplado a un espectrómetro de masas Q-Exactive plus (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Para la cromatografía líquida se utilizó una pre-columna (20 mm  $\times$  75  $\mu$ m-C18) y una columna analítica EASY-Spray (50 cm  $\times$  75  $\mu$ m ID, PepMap C18, 2  $\mu$ m de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro; Thermo Fisher Scientific) con una fase móvil A (0.1% ácido fórmico en agua) y una B (0.1%

ácido fórmico en acetonitrilo). Los péptidos se separaron en condiciones estándar, con un flujo de 350 nl/minutos usando el gradiente: 2–40% de fase móvil B de 0–30 minutos, 40–98% fase móvil B de 30–170 minutos y 98% de fase móvil B de 170–240 min. Los espectros se procesaron en la modalidad adquisición dependiente de datos por 240 minutos utilizando los 10 mejores picos. Los datos se colectaron a una razón de 400–2000 m/z, con una resolución de 70,000 y Max IT 100 ms. Para MS/MS, se utilizó una resolución de 17,500 y Max IT 64 ms, con una ventana de 2 m/z y energía normalizada de colisión de 28.

#### Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas

Para la búsqueda en las bases de datos e identificación de las proteínas obtenidas se descargó la base de datos UniProt (*Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103) la cual contiene 8,044 proteínas, misma que fue actualizada por última vez el 9 de julio de 2016. Se complementó esta base de datos con las secuencias resultantes de la predicción en el genoma y transcriptoma de *L. mexicana* desarrollado a partir de los 10 aislados por nuestro mismo grupo de trabajo (datos no publicados). El identificador de las secuencias provenientes de genómica-transcriptómica empieza con el código “LMEX”. Para evitar redundancias en la base de datos se utilizó el algoritmo CD-HIT, descartando aquellas secuencias con un 90% de similitud o mayor. El resultado final es una base de datos con 8,924 proteínas, 155 contaminantes comunes y 9,079 decoys (secuencias de proteínas y contaminantes en reversa).

#### Parámetros de búsqueda

Se utilizó el programa ProteomeDiscoverer v1.4 usando el algoritmo de Sequest. Los parámetros de búsqueda fueron: precursores MS1 con masa mínima de 350 Da y máxima de 5,000 Da, razón de señal/ruido de 1.5; tolerancia del precursor de 50 ppm y tolerancia del fragmento de 0.6 Da, carbamidometilación de cisteínas (+57.021 Da) como modificación estática y oxidación de

metioninas (+15.995 Da) como modificación dinámica.

Se utilizó la base de datos de *Leishmania mexicana* No Redundante con Contaminantes y *decoy* reversa (descrita anteriormente). Los espectros también se buscaron a través de X!Tandem bajo las mismas condiciones. La identificación de péptidos se aceptó si la probabilidad de asignación de Peptide Prophet era mayor a 95% con la corrección por delta-masa de Scaffold.

### Identificación de Proteínas

Scaffold (versión 4.7.2, Proteome Software Inc., Portland, OR) se utilizó para validar los patrones de fragmentación y la identificación de proteínas; las cuales fueron proteínas aceptadas si la probabilidad de asignación de Protein Prophet era mayor a 90% con al menos 2 péptidos identificados. Se consideraron como identificaciones válidas aquellas presentes en más de 2 aislados. Aquellas proteínas que estaban presentes en al menos 4 de las 5 muestras de un grupo y ausentes totalmente en el otro grupo fueron declaradas como exclusivas del grupo.

### Cuantificación y normalización

Se utilizó la cuantificación por conteos espectrales y se normalizó por el factor de abundancia espectral (NSAF). Para determinar la significancia estadística

de la diferencia de medias entre los grupos LCD y LCL se utilizó una prueba estadística t-Student para cada proteína identificada.

### Análisis de enriquecimiento

Se utilizó Blast2GO versión 4 Pro para hacer el mapeo de identificadores de InterPro y *Gene Ontology* (GO) para las 779 proteínas identificadas. Para el análisis de enriquecimiento, se seleccionaron las proteínas diferencialmente expresadas y sus respectivos identificadores de GO fueron contrastados con el perfil global de los GO de las 779 proteínas.

### Gráficos

Se utilizó R versión 3.2.1 para realizar los diagramas de Venn y el mapa de calor. Utilizando los paquetes VennDiagram y gplots.

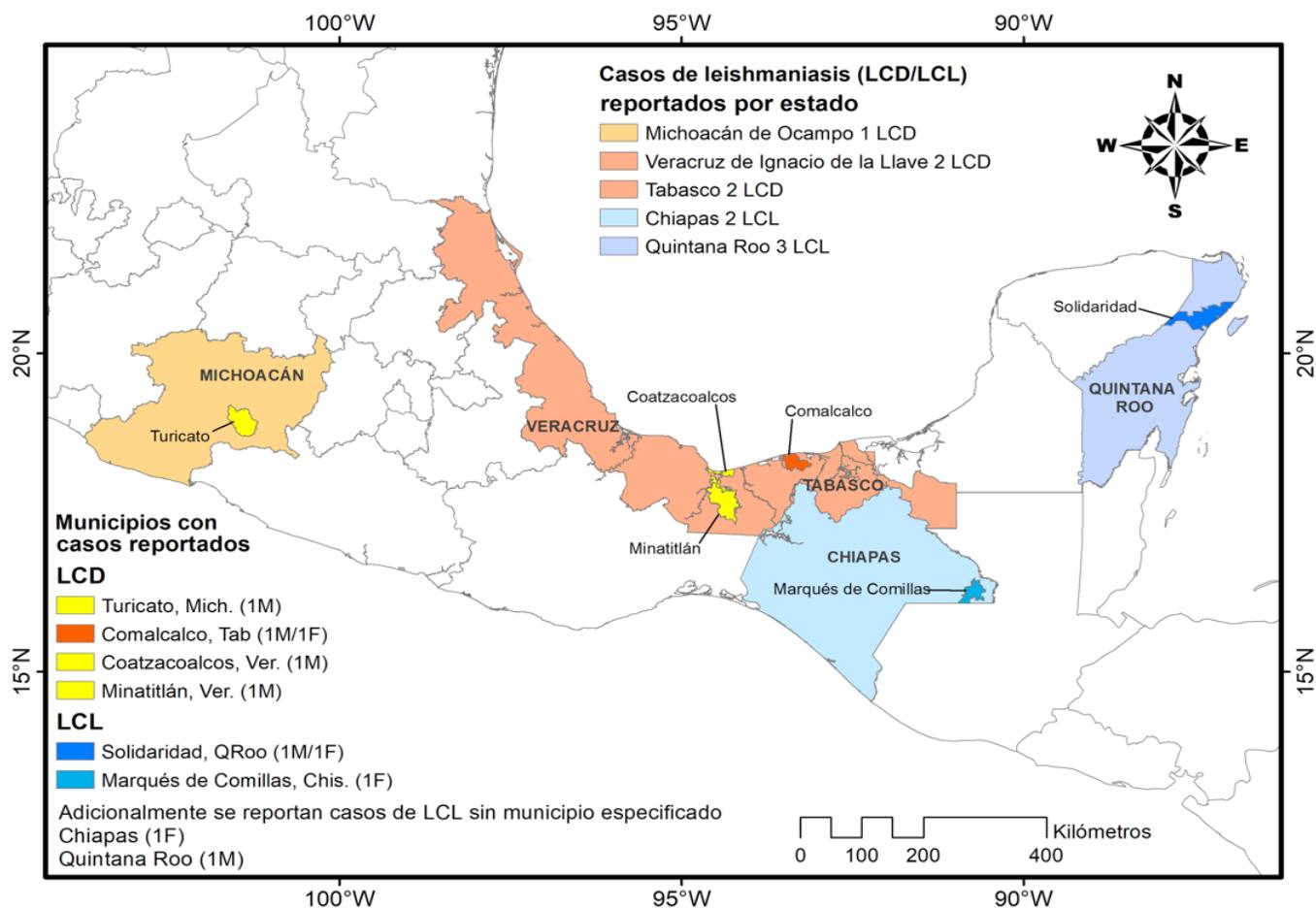
## RESULTADOS

### Aislados utilizados para el estudio

Se presenta en la tabla 1, el estado y municipio del lugar donde fueron infectados los pacientes, así como la especie de parásito, forma clínica y sexo de los mismos. Todas las muestras fueron tipificadas como *Leishmania mexicana*. Los datos fueron representados en un mapa (Figura 1).

**Tabla 1.** Datos de los pacientes de donde se obtuvieron las muestras utilizadas en este estudio.

Consecutivo	Especie (ITS/HAEIII)	Forma clinica	Sexo del paciente	Estado	Municipio
1	L. mexicana	LCD	Femenino	Tabasco	Comalcalco
2	L. mexicana	LCD	Masculino	Veracruz	Coatzacoalcos
3	L. mexicana	LCD	Masculino	Michoacán	Turicato
4	L. mexicana	LCD	Masculino	Tabasco	Comalcalco
5	L. mexicana	LCD	Masculino	Veracruz	Minatitlán
6	L. mexicana	LCL	Femenino	Chiapas	Marqués de Comillas
7	L. mexicana	LCL	Femenino	Chiapas	Sin dato
8	L. mexicana	LCL	Masculino	Quintana Roo	Solidaridad
9	L. mexicana	LCL	Femenino	Quintana Roo	Solidaridad
10	L. mexicana	LCL	Masculino	Quintana Roo	Sin dato



**Figura 1.** Distribución de casos infectados analizados en este estudio. Los pacientes LCD fueron infectados en los Estados de Veracruz (2), Tabasco (2) y Michoacán (1). Los pacientes LCL fueron infectados en Chiapas (2) y Quintana Roo (3). Los datos entre paréntesis corresponden al número de casos de pacientes masculinos (M) y femeninos (F).

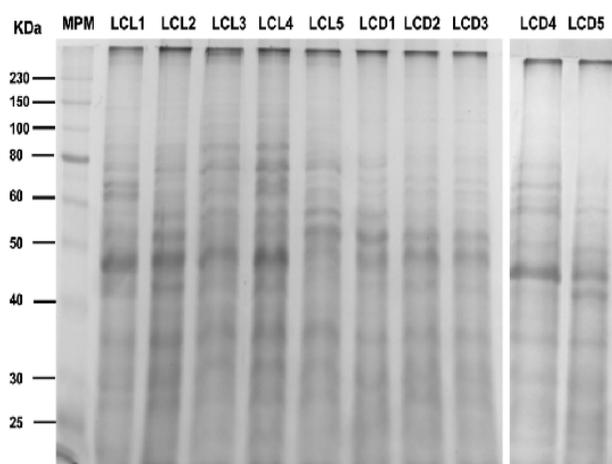
### Identificación de proteínas a partir de los datos LC-MS/MS

Después de la extracción de proteínas se verificó la integridad de las muestras utilizando geles SDS-PAGE al 10%, los cuales fueron teñidos con azul de Coomassie (Figura 2).

Del total de espectros (177,659) en los datos crudos, 43,370 cubrieron los umbrales establecidos (>95% del umbral de probabilidad para péptidos), los cuales fueron asignados a 779 proteínas identificadas (mínimo 2 péptidos identificados por

proteína y 0.43% ProteinProphet FDR). Además, se identificaron seis contaminantes: cuatro queratinas, tripsina y albúmina de suero bovino.

De las 779 proteínas, 10 fueron exclusivas para los aislados que derivan de la forma clínica localizada, mostradas en la tabla 2, mientras que tres son exclusivas para LCD, mostradas en la tabla 3. Para seleccionar las proteínas exclusivas en cada grupo se filtraron aquellas que estaban presentes en al menos cuatro de las cinco muestras de un grupo y ausentes en el otro grupo.



**Figura 2.** Perfil de proteínas de diferentes aislados de *Leishmania mexicana* en geles SDS-PAGE. MPM. Marcador de peso molecular. LCL (parásitos de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada). LCD (parásitos de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa).

**Tabla 2.** Proteínas identificadas en los cinco aislados de LCL con ausencia en todos los LCD.

Número de Acceso (UniProt)	Nombre
E9B0Q4	Piridoxal Putativa
LMEX_000153200.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa Putativa tipo FKBP
E9AU61	Proteína Chaperona Putativa de ADN
E9AWI3	Subunidad A de la ATPasa de protones tipo V
E9ALY7	Flavoproteína succinato dehidrogenasa
E9AQ14	Proteína Fosfatasa 2C Putativa
E9ALJ4	Hidrolasa Ubiquitina Putativa
E9B496	Aminopeptidasa Putativa
E9ANQ5	Proteína Putativa Transportadora Sec31
E9B4S1	p-glicoproteína

**Tabla 3.** Proteínas identificadas en los cinco aislados de LCD con ausencia en todos los LCL.

Nombre de Acceso (UniProt)	Nombre
E9APZ1_LEIMU	Proteína Putativa no caracterizada.
E9ALU6_LEIMU	Subunidad Clp de la proteasa Putativa dependiente de ATP, proteína de choque térmico 100 (HSP100)
E9ALC3_LEIMU	ATPasa transportadora de cationes

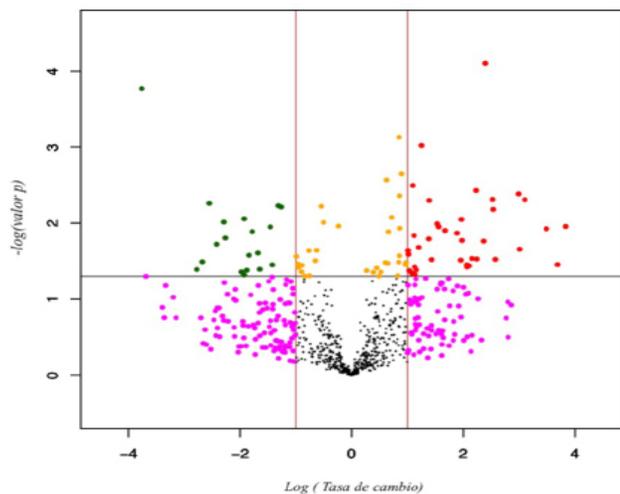
### Distribución de la expresión de proteínas por muestra

Para realizar una cuantificación relativa y normalización de los datos se optó por aplicar el algoritmo conocido como NSAF (por sus siglas en inglés *Normalized Spectral Abundance Factor*). NSAF (conteos espectrales) permite analizar la proteómica libre de marcaje de una forma robusta, obteniendo una correlación con los datos de transcriptoma. En este trabajo no se consideraron réplicas técnicas sino biológicas, por lo que de las corridas de LC-MS/MS se usaron los conteos espectrales.

### Proteínas diferencialmente expresadas

Al graficar el logaritmo (base 2) de la tasa de cambio diferencial con respecto al logaritmo del inverso del valor  $p$  (Figura 3), se puede visualizar la distribución de las proteínas diferencialmente expresadas y su nivel de significancia. Se realizó un corte considerando una tasa de cambio superior o igual a 2 ( $\log_2 FCh > 1$ ) y con una confianza del 5% (valor  $p \leq 0.05$ ). La tasa de cambio de cada proteína fue representada utilizando una gráfica de volcán (Figura 3), en el eje de las abscisas se muestra la tasa de cambio en logaritmo base 2 y en el eje de las ordenadas se representa la confianza estadística (valor  $p$ ) en logaritmo base 10. De tal forma que, aquellos puntos en color rojo son proteínas sobreexpresadas en las muestras LCD respecto a las LCL y aquellos en color verde las proteínas diferencialmente sobreexpresadas en el

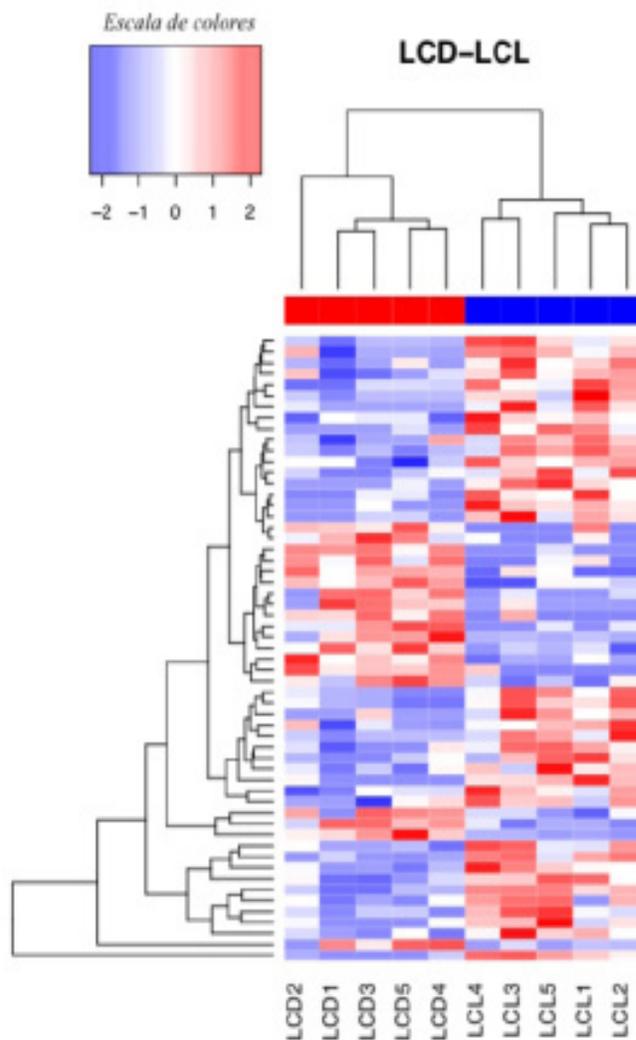
grupo LCD respecto al grupo LCL, (todas ellas con un valor  $p \leq 0.05$ ). Como resultado de este análisis se encontraron 57 proteínas diferencialmente expresadas y se calculó la razón de cambio de las proteínas entre las muestras LCD vs LCL a partir de los valores de NSAF normalizados.



**Figura 3.** Gráfico de volcán. Los puntos rojos representan las proteínas sobreexpresadas en el grupo LCD vs LCL; verde, proteínas subexpresadas en el grupo LCD vs LCL. En color amarillo se muestran las proteínas con significancia estadística, pero con una tasa de cambio menor al umbral seleccionado (logaritmo de la tasa de cambio mayor a uno). En magenta se muestran las proteínas con una tasa de cambio mayor al umbral seleccionado, pero sin significancia estadística (valor  $p < 0.05$ ). En negro se presentan aquellas proteínas que no son significativas ni tienen una tasa de cambio mayor al umbral seleccionado.

Adicionalmente se realizó un mapa de calor (Figura 4) como método de agrupamiento jerárquico no supervisado y visualización de las proteínas diferencialmente expresadas. Cada fila es una proteína diferencialmente expresada, las columnas representan cada aislado. Se observa en la barra superior roja las muestras LCD y en color azul las LCL. Los cuadros en blanco representan una proteína que no fue identificada en esa muestra, los cuadros rojos las proteínas sobreexpresadas, en azul las subexpresadas. Se puede observar que las muestras se agrupan de acuerdo al grupo al que pertenecen. Adicionalmente, podemos observar que, de acuerdo con el perfil de expresión de proteínas por cada

muestra, se agrupan proteínas sobreexpresadas en las muestras LCL y subexpresadas en las muestras LCD y viceversa.

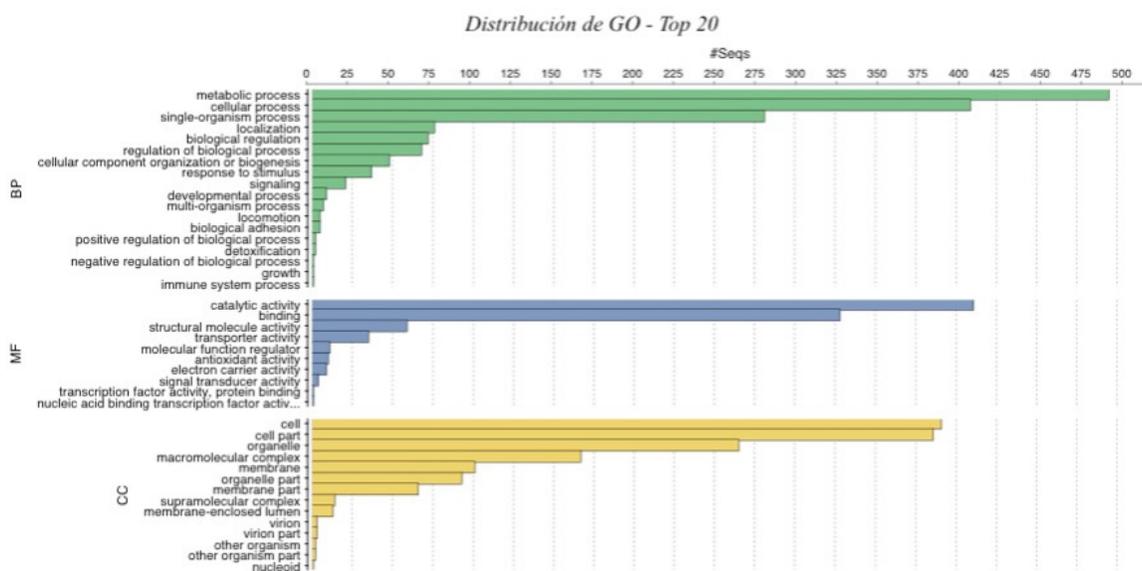


**Figura 4.** Mapa de calor de las proteínas diferencialmente expresadas. Las columnas representan cada muestra de *L. mexicana*. La barra superior indica el grupo de cada muestra, rojo para LCD y azul para LCL. En color rojo se muestran las proteínas sobreexpresadas y en azul las subexpresadas. El dendrograma vertical agrupa cada muestra de acuerdo con la similitud en el perfil de expresión de proteínas (filas), mientras que el dendrograma horizontal agrupa el perfil de expresión de las proteínas.

Dado que la anotación del genoma de *L. mexicana* no está adecuadamente curado se complementó

la anotación de las 779 proteínas identificadas por LC-MS/MS con un identificador de la base de datos de *GO* que clasifica cada proteína de acuerdo con su función molecular, componente celular y proceso biológico. Lo anterior se realizó utilizando el programa Blast2GO. Con los datos de las proteínas diferencialmente expresadas se realizó un análisis de enriquecimiento donde se identificaron aquellos procesos más representados en las proteínas diferencialmente expresadas. El proceso involucra una búsqueda en BLAST de las secuencias de proteínas, posteriormente una asociación funcional en la base de datos de *GO* e

InterPro. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos del enriquecimiento de identificadores de *GO*. El análisis de enriquecimiento busca aquellas categorías funcionales que están sobre representadas en un conjunto de datos comparándolo con la base de datos completa reportada hasta el momento. En este caso utilizamos las 57 proteínas diferencialmente expresadas como conjunto de datos para el análisis de enriquecimiento. Las vías más representadas fueron: de la actividad de aminoacilasa, la de actividad de hidrolasa, las asociadas a la unión a cofactores, y chaperonas, esto resultado del análisis en *GO*.



**Figura 5.** Distribución en *Gene Ontology* por nivel. Top 20 de las 779 proteínas identificadas por LC-MS/MS. Las gráficas con barras en color verde clasifican las proteínas de acuerdo con su proceso biológico (BP), con barras en color azul clasifica las proteínas de acuerdo con su función molecular (MF) y con barras de color amarillo clasifica a las proteínas de acuerdo a su componente celular (CC).

## DISCUSIÓN

Tomando en cuenta las evidencias en la literatura de la respuesta inmune del hospedero a la infección por *Leishmania mexicana*, se ha observado que una de las diferencias depende del cuadro clínico, lo que corresponde al tipo de respuesta inmune que se produce en la infección. Mientras que en la LCL se presenta una respuesta inmune celular que favorece

la eliminación del parásito (tipo Th1), induciendo la producción de proteínas pro-inflamatorias (TLR-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), en la LCD se desencadena una respuesta inmune celular tipo Th2, que favorece la sobrevivencia del parásito produciendo proteínas antiinflamatorias (1).

Los resultados coinciden con lo observado a nivel proteómico en el parásito, es decir, los aislados que

derivan de lesiones de pacientes con LCD tienen un perfil de expresión diferencial de proteínas relacionadas con una respuesta antiinflamatoria y que han sido reportadas en la literatura como factores de virulencia. Algunas de estas proteínas que resultan importantes para entender la diferencia entre los tipos de aislados son: proteínas de choque térmico de 100 kDa (HSP100), con un papel determinante para la inducción de la respuesta tipo Th1 cuando está subexpresada. Se observó una sobreexpresión de los procesos relacionados con la síntesis de ácidos grasos y generación de proteínas de membrana como la Glicoproteína de 63 kDa (gp63), lo cual nos indica una tendencia a la sobreexpresión en los aislados que derivan de una LCD para estas proteínas de virulencia.

El primer mapa proteómico de *Leishmania* spp. fue publicado a inicios de la década de 1980, mucho antes de que el término proteómica fuera acuñado. En total 31-35% del proteoma de *Leishmania* spp. predicho por el genoma ha sido identificado a la fecha (8).

Actualmente, se han desarrollado gran cantidad de análisis proteómicos de *Leishmania* spp., como, por ejemplo, la comparación entre el perfil proteómico de amastigotes y promastigotes de *Leishmania* spp., mostrando proteínas expresadas diferencialmente entre ambos estadios (9, 10).

Por otro lado, se ha reportado el análisis comparativo entre parásitos resistentes o susceptibles a antimoniales (11) y al estrés oxidativo (12). Adicionalmente, se han identificado fosfoproteínas en promastigotes y amastigotes de *Leishmania donovani*, que muestran el nivel de fosforilación asociado a un estadio celular (13). De la misma forma, se han identificado una gran cantidad de proteínas de membrana en promastigotes y amastigotes que regularmente serían difíciles de detectar y caracterizar por técnicas convencionales (14).

En *L. mexicana* se ha comparado el perfil proteómico entre amastigotes y promastigotes utilizando geles de 2 dimensiones (masa molecular vs punto isoeléctrico). Además, otro estudio realizado por Paape *et al.* en 2011 (8), analizó el

perfil en amastigotes usando LC-MS/MS, libre de geles. En este estudio se describen las principales proteínas identificadas en este estadio celular y puntualizan su aporte al conocimiento de las proteínas de *L. mexicana* en ese momento. En este trabajo se identificaron 1,764 proteínas, de las que 741 de ellas no habían sido descritas previamente.

*Leishmania mexicana* en México desarrolla en el hospedero vertebrado dos cuadros clínicos cutáneos con características muy diferentes, al ser una enfermedad parasitaria transmitida por un vector, cada uno de los agentes juega un papel importante dentro de la enfermedad; sin embargo, al estudiar al parásito en su forma infectiva se puede tratar de dilucidar el mecanismo por el cual el parásito genera los diferentes cuadros clínicos.

A nivel genómico, la primera referencia para *L. mexicana* se publicó en 2011. Esta misma cepa (U1103) se usa normalmente para el estudio del parásito; sin embargo, se ha observado una variabilidad genómica en aislados secuenciados que vienen directamente de biopsias de pacientes (8). Además, las herramientas bioinformáticas para la anotación de genomas han mejorado del 2011 a la fecha, lo que permite realizar una actualización y mejoramiento en los genes anotados en *L. mexicana*.

Al tener datos de diferentes plataformas ómicas (DNAseq, RNAseq y LC-MS/MS), se puede reportar una mejor referencia para el genoma de *Leishmania mexicana*, así como una mejor anotación; adicionalmente esto puede aumentar el número de proteínas encontradas en el estudio de LC-MS/MS del parásito.

El análisis genómico y proteómico permite tener una visión más amplia de los mecanismos de patogenicidad y supervivencia de *Leishmania*.

## CONCLUSIÓN

Las proteínas encontradas diferencialmente en el parásito, pueden estar modulando la respuesta inmune en el hospedero, incluso de forma diferencial para cada una de las formas clínicas.

El estudio proteómico realizado sugiere que existen proteínas que inducen o inhiben una respuesta inmune, tipo Th1 o Th2, en el hospedero

y que es clave para el entendimiento del papel del parásito en la infección. Se proponen como casos de estudio las proteínas: fosfatasa 2C (PP2C), de choque térmico 100 (HSP100), peptidasa de cisteína clan CA familia C19, metaloproteasa clan MF familia m17 (E9ANK8), p-glicoproteína (E9B4S1), Ubiquitin hidrolasa (E9ALJ4), peptidil-prolil cis-trans isomerasa putativa tipo FKBP, antígeno inmunodominante putativo tipo Tc40 (E9APT8), HSP60,  $\beta$  liasa (E9AJD5) y las proteínas no caracterizadas E9ALS6, E9B660 y E9B0I3.

Las proteínas que pueden ser estudiadas por su potencial clínico son las FKBP, HSP60 por la importancia que tienen para la supervivencia del parásito.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Doctora Laura Soto Serna y a la Maestra Rocely Cervantes Sarabia por el trabajo técnico del cultivo de parásitos. Nuestro entero agradecimiento a los pacientes que ayudan con sus muestras al avance en la investigación de la leishmaniasis en México. Al Instituto Nacional de Medicina Genómica por el donativo para el desarrollo de este proyecto interno “Asociación estructural huésped-parásito en *Leishmania mexicana*”.

## REFERENCIAS

1. Fernández-Figueroa, EA. Análisis de Genes y Proteínas de Células NK y Monocitos de Pacientes con Leishmaniasis Cutánea Localizada y Difusa. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Mayo 2013.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 2010,7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
3. Berrueta TU. Leishmaniosis o leishmaniasis. Departamento de microbiología y parasitología. Facultad de Medicina, 2015. UNAM.
4. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of leishmania. *Genome research*, 2012, 21(12):2129–2142. doi:10.1101/gr.122945.111.
5. Seidelin H. Leishmaniasis and babesiasis in Yucatan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 1912, 6(2):295–300. <https://doi.org/10.1080/00034983.1912.11687069>.
6. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 2015, 309(5733):436–442. doi: 10.1126/science.1112680.
7. Myler PJ, Fasel N. *Leishmania: after the genome*. Seattle, USA. Caizer Academic Press; 2008. <https://doi.org/10.21775/9781912530304>
8. Paape D, Aebischer T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *Journal of Proteomics*, 2012, 74(9):1614–1624. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.005>
9. Alcolea PJ, Alonso Larraga. Proteome profiling of *Leishmania infantum* promastigotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2011, 58(4):352–358. doi: 10.1111/j.1550-7408.2011.00549.x
10. Pawar H, Sahasrabudhe NA, Renuse S, Keerthikumar S, Sharma J, Kumar G, *et al.* A proteogenomic approach to map the proteome of an unsequenced pathogen—*Leishmania donovani*. *Proteomics*, 2012, 12(6):832–844. doi: 10.1002/pmic.201100505.
11. Biyani N, Singh AK, Mandal S, Chawla B, Madhubala R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2011,179(2):91–99. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.06.004
12. Sardar AH, Kumar S, Kumar A, Purkait B, Das S, Sen A, *et al.* Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *Journal of Proteomics*, 2013, 81:185–199. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.011.
13. Tsigankov P, Gherardini P F, Helmer-Citterich M, Späth G F, Zilberstein D. Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(7):3405–3412. doi: 10.1021/pr4002492.
14. Brotherton MC, Racine G, Ouameur AA, Leprohon P, Papadopoulou B, Ouellette M. Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Journal of Proteome Research*, 2012,11(8):3974–3985. doi: 10.1021/pr201248h.