

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

“Participación de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania mexicana* en la morfología del flagelo y en la patogenicidad del parásito”

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental

Presenta

Biol. Exp. Sarai Calderón Morales

Matricula: 2233804041

Orcid: 0009-0008-1081-4979

Correo: saraicalderon18@gmail.com

COMITÉ TUTORAL

Co-Directora:

Dra. María Magdalena Aguirre García

Co-Director:

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Asesora:

Dra. Alma Reyna Escalona Montaña

JURADO

Presidente:

Dr. Humberto Gonzalez Marquez

Secretaria:

Dra. Alma Reyna Escalona Montaña

Vocal:

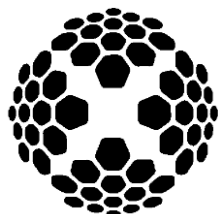
Dr. Augusto Jose Gonzalez Canto

Vocal:

Dra. Berenice Gonzalez Rete

Vocal:

Dra. Isabel Cristina Cañeda Guzman



Iztapalapa, Ciudad de México a 19 de Noviembre del 2025

DEDICATORIA

A mi madre, Rocío

Que ya no está en esta tierra, pero sigue habitando cada rincón de mi vida.

Te dedico este trabajo con el corazón en la mano, porque tu amor, tu fuerza y tu ejemplo me acompañaron incluso en tu ausencia. Porque cada logro, cada paso, cada resistencia sembrada en mí tiene tu nombre escrito.

Gracias por enseñarme a ser valiente, a no rendirme, a caminar con seguridad ante la vida.

Tu voz vive en mi memoria, y tu luz me guía, siempre.

Este logro también es tuyo, mamá.

Te extraño. Te honro. Te llevo conmigo

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis, así como la culminación de mis estudios de Maestría en Biología Experimental en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

En primer lugar, agradezco profundamente a la Dra. María Magdalena Aguirre García, directora de esta tesis, por su constante guía, confianza y compromiso durante cada etapa del desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Alma Reyna Escalona Montaña, asesora de tesis, le expreso mi reconocimiento y gratitud por su invaluable orientación, disponibilidad y aportaciones críticas, que enriquecieron significativamente el proyecto.

Asimismo, agradezco al Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo, director interno de esta tesis, por su apoyo, tiempo y asesoría técnica, en elementos clave para llevar a buen término el proyecto.

Expreso mi sincero agradecimiento a mis sinodales; Dr. Humberto González Márquez, Dr. Augusto José González Canto, Dra. Berenice González Rete y Mc. Isabel Cristina Cañeda Guzmán. Por la dedicación, los comentarios críticos y el acompañamiento brindado a lo largo de este proceso. Sus aportaciones fortalecieron significativamente la calidad académica del proyecto.

Extiendo también mi agradecimiento a todas las personas que forman parte del laboratorio de Inmunobioquímica molecular y cardiopatías, adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme

El espacio, los recursos y el respaldo institucional necesarios para el desarrollo experimental de esta investigación.

De igual forma, reconozco el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) No. de proyecto CBF 2023 – 2024 - 734 y PAPIIT IN219025 otorgado a la Dra. María Magdalena Aguirre García, el cual fue esencial para la realización de mis estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Quiero dedicar unas palabras a todas y todos quienes contribuyeron, de manera directa o indirecta, en la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunobioquímica Molecular y Cardiopatías; Ofelia, Daniel, Erick, Sandy, Estefanía, Aranza, Pamela, Itzel, Raquel, Samuel, Rodolfo, Fernanda, Pedro, Alma y Jessica. Por su acompañamiento académico y humano fue fundamental para la consolidación de este trabajo.

Extiendo también mis agradecimientos al Dr. Ricardo Mondragón Flores y la Dra. Mónica Mondragón Castelán del Departamento de Bioquímica en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco (CINVESTAV-IPN). Por su valiosa colaboración en la realización de los ensayos de microscopia electrónica de transmisión.

Asimismo, expreso mi más sincero agradecimiento a los académicos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Dr. Arturo Wilkins Rodríguez y M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia, por el valioso apoyo técnico brindado, así como por la disposición de los materiales e instalaciones que resultaron esenciales para la realización y desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Norma Salaiza Suazo quien apoyo con la realización de la toma de microfotografías de las laminillas.

Al MVZ Daniel Andrés Sánchez Almaraz por su apoyo técnico en proporcionar los ratones BALB/c que fueron utilizados para mantener el cepario de los parásitos *Knock-out*.

También quiero dedicar unas palabras a las personas que estuvieron conmigo en este camino, fuera del laboratorio y las aulas, pero siempre cerca del corazón.

A mi padre, David por el cariño, las palabras de aliento, acompañadas de apoyo y enseñarme con el ejemplo que todo esfuerzo vale la pena.

A mi familia, gracias por su amor constante, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por estar presentes en cada paso.

A mis compañeros del posgrado; Arturo, Fernanda, Addi y Danna. En los cuales encontré una amistad sincera, donde su compañía fue un respiro necesario en medio del caos.

A mis amigas, Andrea, Nayely, Areli y Donaldo. Por las risas, los mensajes y las conversaciones que me ayudaron a despejar la mente y seguir adelante.

A mi amigo, Paco. Por recordarme que la vida también se celebra con pausas, risas, conversaciones sinceras y el apoyo a seguir adelante.

A mi pareja, Salomón. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu comprensión y por tu cariño en cada etapa de este proceso. Por estar ahí, siempre, celebrando mis logros y dándome ánimo cuando más lo necesitaba. Gracias por tu paciencia, por compartir conmigo este recorrido y por recordarme, una y otra vez, que incluso en la incertidumbre, hay belleza y hay futuro.

A mis mascotas, Cloe y Junior. Más que unas mascotas son parte importante de mi familia, gracias por el cariño incondicional, la lealtad, los paseos para ayudarme a despejar la mente y las noches de desvelo que estuvieron conmigo. Gracias por ser mi motor más importante en esta etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE ABREVIATURAS	10
ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	13
RESUMEN.....	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Leishmaniasis.....	16
1.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	17
1.3. Moléculas de virulencia en <i>Leishmania</i>	19
1.4. Proteínas fosfatasas	20
1.5. Proteínas fosfatasas serina-treonina (PST)	21
1.6. Proteínas fosfatasas PP2C	21
1.7. Proteínas en la estructura flagelar de <i>Leishmania</i>	22
1.8. Parásitos <i>knock-out</i> de <i>Leishmania</i>	24
1.9. Parásitos <i>knock-out</i> de <i>Leishmania mexicana</i>	25
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo general	26
3.2. Objetivos particulares	26

4. JUSTIFICACIÓN..... 27

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... 27

5.1. Cultivo de promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble	27
5.2. Analizar el crecimiento de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble.....	27
5.3. Viabilidad celular de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble	28
5.4. Cuantificación de proteína por el método Bradford	28
5.5. Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa.....	28
5.6. Expresión de la proteína fosfatasa PP2C de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble	29
5.7. Análisis de la morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble mediante microscopia fotónica	30
5.8. Análisis de la morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble mediante microscopia electrónica de transmisión (MET)..	30

6. RESULTADOS 33

6.1. Crecimiento de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble durante los días de cultivo.....	33
6.2. Viabilidad celular de promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble durante los días de cultivo	34
6.3. Actividad enzimática de promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble durante los días de cultivo	35
6.4. Identificación de la proteína PP2C de promastigotes de <i>L. mexicana</i> wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble durante los días de cultivo.....	36
6.5. Análisis morfológico de promastigotes de <i>L. mexicana</i> mediante microscopia fotónico.....	38
6.6. Análisis ultraestructural de promastigotes de <i>L. mexicana</i> mediante microscopia electrónica de transmisión (MET).....	42

7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIÓN	51
9. PERSPECTIVAS	52
9.1. Evaluación de la virulencia <i>in vivo</i>	52
9.2. Estudio transcriptómico y proteómico comparativo.....	52
9.3. Generación de líneas <i>Knock-in</i> o de sobreexpresión	52
9.4. Caracterización funcional del dominio catalítico de PP2C	52
9.5. Análisis de interacción PP2C – cinasa flagelares	53
9.6. Validación en otras especies de <i>Leishmania</i>	53
10. REFERENCIAS.....	54

TABLA DE ABREVIATURAS

Nombre	Ingles	Español
Ácido desoxirribonucleico	DNA	ADN
Ácido desoxirribonucleico complementario	DNAc	ADNc
Ácido ribonucleico	RNA	ARN
Albúmina sérica bovina	BSA	-----
Azul alamar	AB	AA
Bolsillo paraflagelar	PFR	BF
Cinasa activada por mitógenos	MAPK	-----
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	-----
Complejo de unión tripartita	TJC	TAC
Desoxinucleótidos trifosfato	dNTP	-----
Fibronectina	FN	FR
Fosfatasa tipo 2	PP2	-----
Fosfatasas de doble especificidad	DUSP	-----
Fosfatasas tipo 1	PP1	-----
Fosfatidilserina	PS	-----
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GADPH	-----
Glicoproteína 63	GP63	-----
Glicosilfosfatidil inositol	GPI	-----
Interleucina	IL	-----
<i>Knock-out</i>	KO	-----
<i>Knock-out</i> doble	KOD	-----
<i>Knock-out</i> sencillo	KOS	-----

Leishmaniasis cutánea	LC	-----
Leishmaniasis cutánea difusa	LDL	-----
Leishmaniasis cutánea localizada	LCL	-----
Leishmaniasis visceral	LV	-----
Leishmaniasis mucocutánea	LMC	-----
Lipofosfoglicano	LPG	-----
Magnesio	Mg ⁺²	-----
Manganeso	Mn ⁺²	-----
Microscopia electrónica de transmisión	TEM	MET
Para-nitrofenil fosfato	<i>p</i> -NPP	-----
PCR cuantitativa en tiempo final	qPCR	-----
Amortiguador salino de fosfatos	PBS	-----
Potencial de hidrógeno	pH	-----
Proteína 3A	Arl-3A	-----
Proteína fosfatasa 2A	PP2A	-----
Proteína fosfatasa 2C	PP2C	-----
Proteína tirosina fosfatasa 1B humana	PTP1B	-----
Proteínas de choque térmico	HSP	-----
Proteínas de transporte intraflagelar	IFT	-----
Proteínas fosfatasas dependientes de metales	PPM	-----

Proteínas fosfatasas	serina-treonina	PST	-----
Proteínas tirosina fosfatasas		PTPs	-----
Proteofosfoglicano		PPG	-----
Reacción en cadena de la polimerasa		PCR	-----
RNA mensajero		mRNA	ARNm
Amortiguador Tris con Tween 20		TBST	
<i>Wildtype</i>		WT	-----
Zona de unión flagelar		FAZ	-----

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	18
Esquema 2. Modelo de la zona del flagelo en promastigote de <i>L. mexicana</i> , basado en tomografía electrónica de secciones seriadas	23
Esquema 3. Cromosoma 25 de promastigote de <i>L. mexicana</i>	25
Esquema 4. Metodología de la evaluación de la participación de la proteína fosfatasa PP2C en promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	32
Figura 1. Curva de crecimiento de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD	34
Figura 2. Viabilidad celular por día de cultivo de promastigotes de <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD.....	35
Figura 3. Ensayo de actividad fosfatasa en extractos (3 µg) de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> WT, KOS y KOD	36
Figura 4. Inmunodetección de la proteína PP2C en extractos de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	37
Figura 5. Morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD durante 6 días de cultivo	39
Figura 6. Longitud de los promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD	41
Figura 7. Longitud de los flagelos de promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD	41
Figura 8. Ultraestructura de promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD analizada por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	43

Figura 9. Longitud del cuerpo celular de los promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD	45
Figura 10. Ancho del cuerpo celular de los promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD	45
Figura 11. Diámetro del núcleo de los promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD	46
Figura 12. Longitud del cinetoplasto de los promastigotes <i>L. mexicana</i> WT, KOS y KOD.....	46

RESUMEN

La proteína fosfatasa PP2C pertenece a la familia de enzimas que hidrolizan residuos fosforilados de serina y treonina (PST), participando en procesos esenciales como la diferenciación y la respuesta al estrés celular. En estudios previos, la PP2C ha sido localizada en el bolsillo flagelar y a lo largo del flagelo de *Leishmania mexicana*; sin embargo, su función específica no ha sido completamente caracterizada. En el presente trabajo se evaluó la participación de la PP2C en el crecimiento, viabilidad celular, actividad enzimática y morfología del promastigote de *L. mexicana*. Para ello, se emplearon cepas *wildtype* (WT), *knock-out* sencillo (KOS) y *knock-out* doble (KOD), cultivadas *in vitro* durante seis días. Los resultados mostraron que las cepas mutantes presentaron una disminución progresiva en el crecimiento y la viabilidad a partir del cuarto día de cultivo, en contraste con la cepa WT. Asimismo, una actividad enzimática de fosfatasas donde los knock-out hidrolizan los primeros días de cultivo con mayor eficiencia el sustrato comparado con los WT, también se observaron alteraciones morfológicas evidentes en los promastigotes, con una reducción en la longitud celular y flagelar, así como desorganización de organelos como el núcleo, cinetoplasto y bolsillo flagelar. La ausencia total de la proteína PP2C en los parásitos KOD, confirmada por western-blot, sugiere que esta fosfatasa es importante para el mantenimiento estructural del parásito, de igual manera estos hallazgos indican que la PP2C podría posicionarse como un posible factor de virulencia y blanco terapéutico en la leishmaniasis cutánea.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

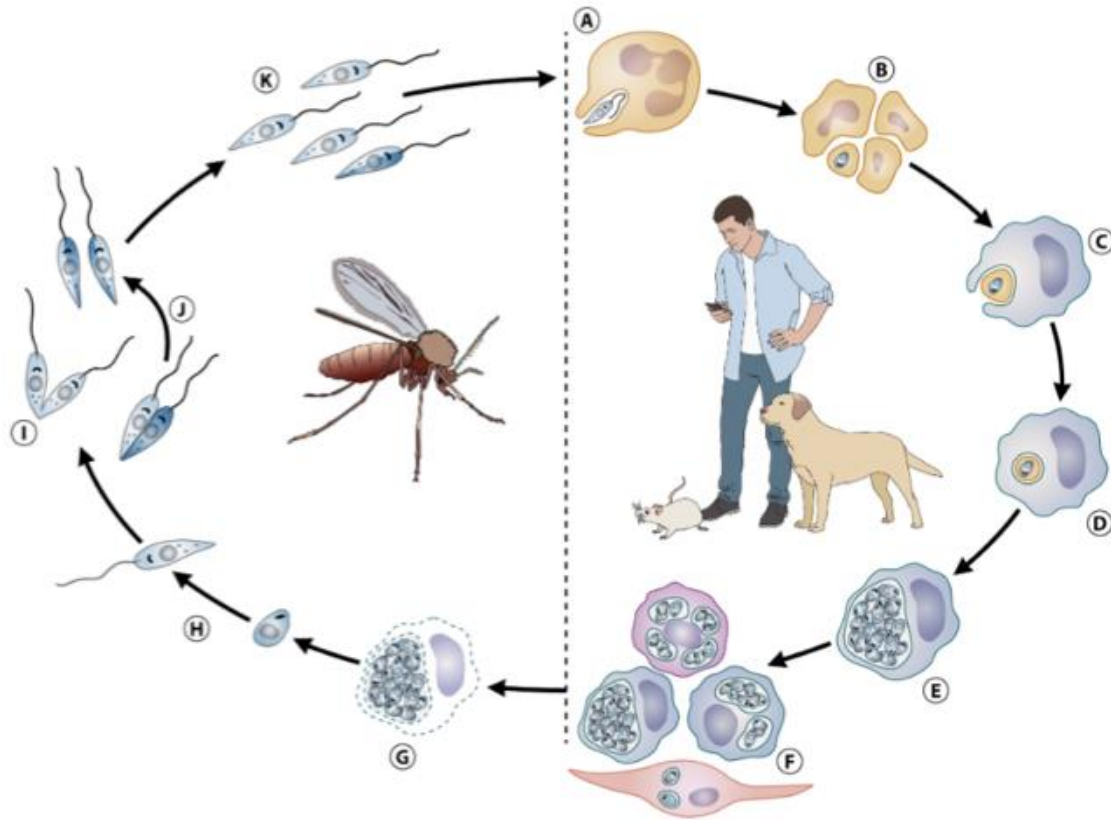
El término Leishmaniasis hace referencia al conjunto de manifestaciones clínicas causadas por diversas especies del género *Leishmania* (Choi & Lerner, 2002). Las regiones afectadas suelen ser remotas, con recursos limitados para el tratamiento de la enfermedad. La leishmaniasis se ha descrito como una de las enfermedades tropicales más desatendidas (Ghorbani & Farhoudi, 2017), es endémica en 98 países y alrededor de 350 millones de personas son susceptibles a la enfermedad (De Vries et al., 2015). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen la leishmaniasis visceral (LV, también conocida como enfermedad de Kala-Azar), cutánea (LC) y mucocutánea (LMC) (Pearson & Sousa, 1996). La LV es causada por los complejos *Leishmania infantum* (syn *L. chagasi*) y *L. donovani*. La LC es causada por *Leishmania major* y *L. tropica* en Oriente Medio y Asia central, y por el complejo *L. braziliensis* y *Leishmaniasis mexicana* (*L. mexicana*) en América (Savoia, 2015).

En México, la leishmaniasis representa un serio problema de salud, se reconoce que 25 de 32 estados en el país tiene al menos un caso reportado (Rodríguez-Serrato et al., 2020). Las zonas endémicas con mayor prevalencia de leishmaniasis incluye a los estados de Chiapas, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Veracruz, Yucatán, Campeche, Tabasco y Quintana Roo, uno de los factores actuales del aumento de las infecciones por *Leishmania*, es la deforestación de áreas silvestres para la creación de nuevas tierras agrícolas y proyectos de infraestructura, como el Tren Maya (Blum-Domínguez et al., 2024). Durante 2019 México reportó 1,014 casos de leishmaniasis cutánea (CENAPRECE, 2022). La leishmaniasis cutánea puede ser: localizada (LCL) o difusa (LDL), esta forma de manifestación es la más común en México, la cual es causada por *L. mexicana* (Abu-Dayyeh et al., 2010).

1.2 Ciclo de vida de *Leishmania*

En *Leishmania* presenta dos estadios principales: el amastigote, que corresponde a la fase intracelular presente en el hospedador vertebrado, y el promastigote, que se encuentra presente en el vector (Abdelhaleem et al., 2019).

Aproximadamente 30 especies diferentes de flebótomos pueden transmitir este parásito, ya sea de forma antroponótica o zoonótica, a través de su picadura (De Vries et al., 2015). Al alimentarse del hospedero, los flebótomos hembra de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* inoculan promastigotes metacíclicos. La lesión mecánica producida por la picadura, junto con los componentes de la saliva del flebótomo, así como la liberación local de la interleucina IL-8 quimiotáctica de neutrófilos, favorecen el reclutamiento de estas células al sitio de infección. Posteriormente, los macrófagos son atraídos por la liberación de factores quimiotácticos, como CCL2, y participan en la eliminación de los cuerpos apoptóticos. Este proceso está acompañado por la inhibición de la secreción de la interleucina (IL) IL-12 y la secreción elevada de interleucina IL-10 y Factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que juntos crean un ambiente antiinflamatorio que favorece la supervivencia del parásito. La infección inicial de los neutrófilos, continua con la acción de los macrófagos, quienes fagocitan las células infectadas, este mecanismo se conoce como “caballo de Troya” (Laskay et al., 2003). Dentro del macrófago, los promastigotes se transforman en amastigotes y se dividen en la vacuola parasitófora hasta lisis a la célula (Esq. 1). Los amastigotes liberados son fagocitados por otras células, facilitando así tanto la supervivencia como la diseminación del parásito (Silva-Moreira et al., 2025).



Esquema 1. Ciclo de vida de *Leishmania*.

(A) El flebótomo, la hembra infectada inocular en la dermis del hospedero mamífero los promastigotes metacíclicos, los cuales infectan a los neutrófilos reclutados en el sitio de la picadura. (B) Los parásitos se transforman en amastigotes intracelulares. (C) Los neutrófilos apoptóticos infectados son fagocitados por los macrófagos. (D) En el interior de los macrófagos se forma la vacuola parasitofora. (E) Los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta lisis al macrófago. (F) La infección se disemina y el número de células infectadas aumenta. (G) El flebótomo hembra se infecta al ingerir células infectadas que contienen amastigotes intravacuolares durante la ingestión de sangre de un hospedero infectado. (H) En el tracto digestivo del vector, los amastigotes se liberan y se diferencian en promastigotes. (I) Los promastigotes procíclicos se multiplican por fisión binaria. (J) Los promastigotes continúan multiplicándose hasta alcanzar un número suficiente de parásitos para infectar al hospedero. (K) Los promastigotes procíclicos pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos hasta diferenciarse en promastigotes metacíclicos altamente infectivos (Silva-Moreira et al., 2025).

1.3 Moléculas de virulencia en *Leishmania*

Leishmania tiene diversas moléculas en su superficie como; El lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (GP63), las cuales han sido postuladas en algunas especies de este parásito como posibles factores de virulencia. El LPG cubre la superficie del parásito y el flagelo formando un glicocálix. La estructura del LPG es diferente entre las especies de *Leishmania* y está formada, principalmente, por unidades repetidas de un disacárido y un fosfato unido a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta molécula es muy abundante en los promastigotes en comparación con los amastigotes (Ivens et al., 2005).

La GP63 en los promastigotes de *L. amazonensis* y *L. major* se ha reportado que ayuda al parásito a evitar la lisis mediada por el complemento. Además, actúa como una opsonina ayudando al parásito a interactuar con los macrófagos a través de los receptores del complemento 1 y 3 favoreciendo su internalización e interactúa con el receptor de fibronectina (FR) para la adherencia del parásito en los macrófagos. Estudios *in vitro* realizados con los promastigotes de *L. mexicana* han observado que la GP63 al contacto con la matriz extracelular del tejido subcutáneo degrada los componentes extracelulares favoreciendo su rápida migración (Gomez et al., 2009). Por otro lado, la fosfatidilserina (PS) tiene mayor abundancia en la forma de promastigotes metacíclicos y amastigotes, también favorece a la supervivencia intracelular del parásito, debido a que la exposición de PS en la membrana externa del parásito imita a las células apoptóticas del hospedero permitiendo “engañar” a los macrófagos. Esta molécula es secretada en el sistema digestivo del vector *Plebotomus* o *Lutzomyia* (Gomez et al., 2009).

El proteofosfoglicano (PPG) se encuentra en la superficie del promastigote metacíclico, tiene la función de inducir citocinas antiinflamatorias y limita el reclutamiento de las células inmunes en el sitio de infección, esto se debe a que forma una capa protectora que interfiere con la formación del complejo de ataque a la membrana del complemento (Kaushal et al., 2023). Las proteínas de choque térmico (HSP) participan en la diferenciación celular del parásito de promastigote a amastigote, también participa en el reciclaje y degradación de proteínas mal plegadas, al igual que ayuda al parásito a mantener su viabilidad celular

(Hombach-Barrigah et al., 2019). Las fosfatasas secretadas por el parásito interfieren con la activación de macrófagos, evadiendo así la respuesta inmune, también se disminuye la fosforilación en las vías de señalización MAPK y JAK/STAT (Norris-Mullins et al., 2014). Estas moléculas han sido postuladas en algunas especies de *Leishmania* spp. como posibles factores de virulencia.

1.4 Proteínas fosfatasas

La regulación de múltiples funciones celulares en los organismos se basa en la fosforilación y desfosforilación de proteínas, procesos mediados por cinasas y fosfatasas que actúan de forma opuesta para mantener el equilibrio de fosforilación (Anwar & Gourinath, 2016). Las fosfatasas se clasifican en tres familias basadas en la especificidad de sustrato, estructura y mecanismo catalítico, como se presentan a continuación:

A) Tirosinas fosfatasas (PTPs), son enzimas que desfosforilan residuos de tirosina fosforilados específicos (Lillo et al., 2014): Con base en sus dominios catalíticos y en su especificidad de sustrato, las PTP se clasifican en Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV (Andreeva & Kutuzov, 2008). Estas enzimas se caracterizan por la presencia de un motivo altamente conservado en su sitio catalítico, con la secuencia consenso (I/V)HCXXGXXR(S/I), donde “C” corresponde a una cisteína, “R” a una arginina y “X” puede ser cualquier aminoácido (Tonks, 2003).

La gran mayoría de las PTPs de *Leishmania* pertenecen al grupo de Clase I, que se subdivide en PTPs clásicas y de especificidad dual (Szöör, 2010). Las PTPs clásicas incluyen fosfatasas homólogas a la proteína tirosina fosfatasa 1B humana (PTP1B). A diferencia de las presentes en eucariotas superiores, en *Leishmania* y otros parásitos cinetoplastos, este grupo no contiene receptores de PTPs. Las fosfatasas de doble especificidad (DUSP) son capaces de desfosforilar una amplia variedad de sustratos fosforilados, además de la fosfotirosina (Soulat & Bogdan, 2017).

B) La actividad catalítica depende de la presencia de la cisteína (Tonks, 2003).

C) Las proteínas serina-treonina fosfatasas (PST) son enzimas que se encargan de hidrolizar específicamente los aminoácidos fosforilados en serina - treonina (Anwar & Gourinath, 2016).

1.5 Proteínas fosfatasas serina-treonina (PST)

Inicialmente, las proteínas PST se dividieron en dos tipos: las fosfatasas tipo 1 (PP1), responsable de desfosforilar la subunidad β de la cinasa fosforilasa, y la fosfatasa tipo 2 (PP2), encargada de desfosforilar la subunidad α de la misma enzima (Djeghader et al., 2013).

En un estudio de análisis bioinformático se demostró que ninguna de las proteínas fosfatasas de histidina utilizan el mecanismo clásico de secreción (Silverman et al., 2008). Sin embargo, se encontraron diferentes proteínas con posibles funciones, entre las más importantes: proteínas que participan en el proceso de transporte vesicular; involucradas en la sobrevivencia del parásito; posibles candidatos factores de virulencia; y proteínas que participan en la transducción de señales. De entre estas, se encuentra la proteína fosfatasa 2C (PP2C), la fosfatasa de piruvato deshidrogenasa y otras PST están estrechamente relacionadas y no comparten homología de secuencia con PPP, formando así una familia distinta llamada proteínas fosfatasas dependiente de metales (PPM) (Barford et al., 1998), la cual dependen principalmente, de magnesio (Mg^{+2}) y manganeso (Mn^{+2}) para su actividad enzimática (Escalona-Montaña et al., 2016).

1.6 Proteínas fosfatasa PP2C

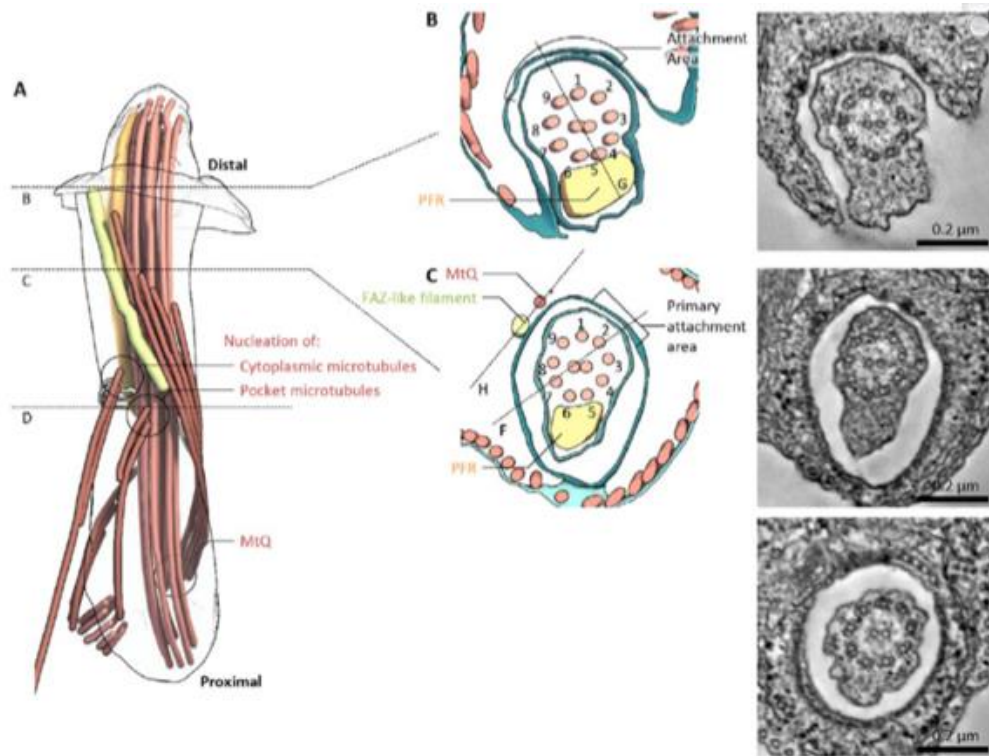
Las proteínas fosfatasas PP2C constituyen una amplia familia de enzimas altamente conservadas, con 16 genes distintos en el genoma humano que generan al menos 22 isoformas diferentes (Lagorgette et al., 2024). En plantas, el número de genes de PP2C es aún mayor, alcanzando 80 en *Arabidopsis thaliana* (Shi, 2009). Estas proteínas participan en diversas cascadas de señalización celular, y sus funciones principales incluyen la regulación de las respuestas al estrés, la senescencia y el ciclo celular (Lagorgette et al., 2024). En eucariotas PP2C se

localiza en el núcleo y presenta una secuencia líder mitocondrial (Joshi et al., 2007). En *L. mexicana* se ha observado la secreción de fosfatasa tipo PP2C por los promastigotes (Escalona-Montaña et al., 2016). Asimismo, en *L. major* se han identificado fosfatasa asociadas a la membrana, cuya expresión proteica es mayor en los promastigotes metacíclicos en comparación con los procíclicos (Aguirre-García et al., 2006). Entre estas fosfatasa destaca una fosfatasa serina/treonina del tipo PP2C codificada por el gen LmjF 25.0750 de *L. major*, (Escalona-Montaña et al., 2021). Se ha demostrado que dicha proteína se encuentra localizada en el bolsillo flagelar de amastigotes y el flagelo de los promastigotes (Escalona-Montaña et al., 2016). Con la finalidad de conocer la función de la fosfatasa PP2C en el parásito, Escalona-Montaña (2018) generó promastigotes de *L. mexicana* con delección del gen Lmx250750 (localizado en el cromosoma 25). En los cuales se observó un acortamiento del flagelo y una forma celular irregular. En otros modelos de estudio como en *Trypanosoma cruzi*, se han identificado fosfatasa de tipo serina/treonina en el flagelo y el bolsillo flagelar (Orr et al., 2000), y se ha observado que, al inhibir estas fosfatasa con una concentración mayor del inhibidor ácido okadaico, afecta la morfología del flagelo (González et al., 2003).

1.7 Proteínas en la estructura flagelar de *Leishmania*

El flagelo de *Leishmania* es considerado un orgánulo multifuncional, debido a que sufre cambios estructurales durante el ciclo de vida del parásito (Gossage et al., 2003). Existen dos estadios celulares en el ciclo de vida de *Leishmania*: la forma amastigote, la cual prolifera en macrófagos de mamíferos, pose un axonema de microtúbulos 9+0 de tipo sensorial corto, y promastigote con un axonema 9+2 móvil largo canónico. La estructura del axonema es fundamental para el mantenimiento y la motilidad del flagelo, y se ha confirmado que la mayoría de los axonemas están delimitados por una membrana. El flagelo de promastigote de *Leishmania*, tiene una zona de unión flagelar (FAZ), se encarga de conectar el citoesqueleto del cuerpo celular con el citoesqueleto del flagelo a través del cuerpo celular y la membrana del flagelo (Esq. 2). Esta zona consta de 3 dominios; (1) el dominio del cuerpo

celular, (2) el dominio intermembrana, y (3) el dominio flagelo (Wheeler et al., 2015). El flagelo en *Leishmania* y *Trypanosoma* desempeña una amplia variedad de funciones biológicas, entre ellas la motilidad, la adhesión a las membranas del hospedero (tanto en el vector como en el mamífero), las interacciones entre parásitos, como la motilidad social, y la secreción de vesículas (Beneke et al., 2019).



Esquema 2. Modelo de la zona del flagelo en promastigote de *L. mexicana*, basado en tomografía electrónica de secciones seriadas. (A) Vista general de las estructuras no membranosas en la bolsa flagelar. (B) Axonema con su estructura 9 + 2 (pares de microtúbulos) y su barra paraflagelar (PFR). (C) Axonema con el filamento de la zona de unión a flagelo (FAZ), junto al cuarteto de microtúbulos (MtQ). (Landfear, 2022).

El proteoma flagelar del promastigote se han definido en; axonema, barra paraflagelar (PFR), punta flagelar, membrana flagelar asignadas a los cuadrantes FI y FS, cuerpo basal, FAZ y complejo de unión tripartita (TAC). Se han incluido 19 proteínas del axonema altamente conservadas que están involucradas en la regulación del latido flagelar, 3 proteínas de transporte intraflagelar (IFT), 60 proteínas flagelares relacionadas con la transcripción en promastigotes y 8

proteínas flagelares solubles, además de 4 insolubles adicionales (Fiebig et al., 2015).

En *L. donovani* se identificó la fosfatasa LdTyrPIP₂, con actividad de fosfatasa P-Tyr en el bolsillo flagelar adyacente al cinetoplasto. Se ha propuesto la hipótesis de que esta enzima podría estar involucrada en la regulación del transporte intraflagelar o en la remodelación del flagelo durante la diferenciación de promastigotes metacíclicos a amastigotes (Papadaki et al., 2021).

Por otro lado, en *L. mexicana* se identificó una fosfatasa tipo PST, la proteína fosfatasa PP2C, localizada en el bolsillo flagelar del parásito. Esto sugiere que la enzima probablemente se libera desde cuerpos multivesiculares derivados del aparato de Golgi en la misma región, lo que explicaría el marcaje observado en las vesículas de promastigotes y amastigotes. En consecuencia, este trabajo postula que la fosforilación sea llevada a cabo por cinasas en el aparato de Golgi, participando en una regulación recíproca con LmxPP2C (Escalona-Montaña et al., 2021).

1.8 Parásitos *knock-out* de *Leishmania*

Con el propósito de realizar investigaciones más precisas, se han utilizado modelos de parásitos *knock-out* para evaluar la importancia de diversas proteínas presentes en el flagelo de *Leishmania* spp. En *L. amazonensis* se identificó en la estructura paraflagelar la proteína axonemal de bastón paraflagelar 2 (PRF2), una de las diversas proteínas estructurales del citoesqueleto del parásito (Beneke et al., 2019). Su importancia en la motilidad del flagelo se demostró al observar los parásitos KO no lograron desplazarse al intestino del flebótomo. Por otro lado, la proteína 3A (Arl-3A), que actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanina en el transporte de lipoproteínas hacia la membrana flagelar, también ha sido descrita como un componente fundamental del flagelo, debido a que su KO ocasionó la formación de flagelos cortos (Beneke et al., 2019).

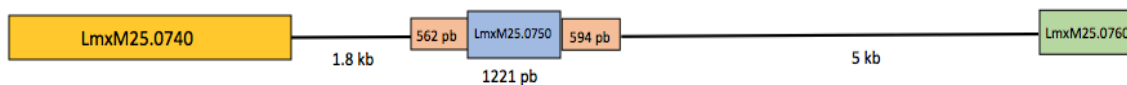
En *L. mexicana*, la cinesina LmxKIN29 (LmxM.29.03.50), también llamada “Cinesina Death”, es fosforilada por la cinasa MAP que activa a LmxMPK3, la cual regula la longitud del flagelo en *Leishmania*. Se observó que los promastigotes KO de

LmxKIN29 no causaron la enfermedad en ratones infectados, mientras que la supresión de un solo alelo produjo lesiones en las almohadillas plantares (Al Kufi et al., 2022).

Una molécula reportada como factor de virulencia es el LPG, localizado en la superficie celular del parásito, incluido el flagelo. Esta molécula es fundamental para la unión de *Leishmania* al intestino de los flebótomos. En estudios con el modelo KO en *L. mexicana*, se observó una disminución en la infección a partir del segundo día (Beneke et al., 2019).

1.9 Parásitos *knock-out* de *Leishmania mexicana*

Escalona-Montaña (2018) caracterizó la proteína fosfatasa PP2C. Para ello, se generaron promastigotes de *L. mexicana* KO para el gen Lmx.25.07.50, el cual se encuentra en el cromosoma 25 del parásito (Esq. 3).



Esquema 3. Cromosoma 25 de promastigote de *L. mexicana*

Diagrama del cromosoma 25 de promastigotes de *L. mexicana*, se encuentra el gen LmxM25.0750 (Proteína putativa de reparación de DNA), LmxM25.0750 (Proteína fosfatasa tipo 2C) y LmxM25.0760 (ncRNA).

Para analizar el papel de esta proteína en la fisiología del parásito, se elaboraron tanto en formato *knock-out* sencillo (KOS, un solo alelo) como en *knock-out* doble (KOD, ambos alelos), donde el gen para PP2C se reemplazó con *cassette* de

resistencia a Puromicina en el caso de los KOS, mientras que para el caso de KOD se reemplazó con *cassette* de resistencia a Puromicina e Higromicina.

Se observó que, durante los primeros días de cultivo, los promastigotes carecían de flagelo; sin embargo, conforme avanzaban los días, este fue desarrollándose progresivamente. Hasta el momento, no se han realizado más estudios para evaluar el modelo KO de PP2C en promastigotes de *L. mexicana*.

2. HIPÓTESIS

La fosfatasa PP2C interviene en establecimiento de la morfología del flagelo de los promastigotes de *L. mexicana*. Se espera que la eliminación de PP2C (*knock-out*), demuestre cambios en la morfología del flagelo, lo cual podría estar relacionado con la disminución de la patogenicidad de los promastigotes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Conocer la participación de la proteína fosfatasa PP2C de los promastigotes de *L. mexicana* en la morfología del flagelo.

3.2 Objetivos particulares

1. Determinar la participación de PP2C de los promastigotes de *L. mexicana* de acuerdo con los días de desarrollo de los parásitos *Wildtype*, *knock-out sencillo* y *knock - out* doble en el:
 - a) Crecimiento celular
 - b) Viabilidad celular
 - c) Expresión de la proteína fosfatasa
 - d) Actividad enzimática
2. Evaluar los cambios morfológicos en el flagelo de los promastigotes *wildtype*, *knock-out sencillo* y *knock-out* doble.

4. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, se ha demostrado que la proteína fosfatasa PP2C se localiza en el flagelo y el bolsillo flagelar de los promastigotes de *L. mexicana*. Esto sugiere que dicha proteína podría desempeñar un papel importante en la morfología y función del flagelo, así como en la patogenicidad del parásito. En consecuencia, el uso de parásitos *Knock-out* PP2C nos permitirá analizar si la proteína está involucrada en el desarrollo del flagelo en los promastigotes de *L. mexicana*, así como en las funciones relacionadas con la patogenicidad del parásito.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1. Cultivo de promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble

Se realizó el cultivo axénico de promastigotes de *L. mexicana* wildtype (WT) en medio 199 suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% de vitaminas y 1% de estreptomicina / penicilina. A los promastigotes *knock-out* sencillo (KOS) se les añadió una concentración de 24 μ M de puromicina, mientras que a los promastigotes *knock-out* doble (KOD) se les administraron 32 μ g / mL higromicina y 24 μ M puromicina. Los cultivos, con una concentración inicial de 2.5×10^6 parásitos / 5 mL, se incubaron a 26 °C.

5.2 Analizar el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble

Se realizó el conteo de parásitos con el fin de determinar la concentración de *L. mexicana* WT, KOS y KOD durante los días 1 a 6 de cultivo. Para ello, se empleó una dilución 1:50 y se utilizó una cámara Neubauer. Con base en los resultados obtenidos, se construyó la curva de crecimiento correspondiente.

5.3 Viabilidad celular de los promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble

Para determinar la viabilidad celular de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD, se empleó el ensayo de reducción del azul alamar (AA). Se sembraron 1×10^5 parásitos / 200 μ L por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron durante seis días de cultivo (Triplicado por cepa). Posteriormente, se añadió el reactivo de AA y se incubó durante 4h a 26°C. La fluorescencia se cuantificó con un fluorómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems, MA, EUA) a 485 nm (excitación) y 590 nm (emisión).

5.4 Cuantificación de proteína por el método Bradford

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* WT, KOS y KOD fueron recolectados diariamente a partir de cultivos axénicos de 5 mL, lavados por triplicado con PBS y almacenados a -80 °C. Las seis muestras (pastillas) obtenidas por cepa se lisaron por sonicación y se cuantificó el contenido proteico total mediante el método de Bradford. Para ello, se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en una placa de 96 pozos (0–15 μ g), completando a 160 μ L con amortiguador de lisis. En los pozos correspondientes a las muestras, se mezclaron 5 μ L del extracto proteico con 155 μ L del amortiguador de lisis (Leupeptina 2 μ g/mL, Aprotinina 10 μ g/mL, Benzamidina 2 mM). Posteriormente, se adicionaron 40 μ L del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Las lecturas se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Biotek Quant (Winooski, VT, EUA) con el programa KC4, en triplicado.

5.5 Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa

Se determinó la actividad enzimática de fosfatasa en presencia de cationes de magnesio en los extractos de los promastigotes WT, KOS y KOD. Se colocó 2 μ g de proteína de los promastigotes en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se adicionó el amortiguador de acetato de sodio 0.2 M y 0.1 M del sustrato de fosfatasa *p*-NPP en un volumen final de 100 μ L. La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 20 μ L de hidróxido de sodio 2 N. La absorbancia de cada

reacción se midió por espectrofotometría en placa (Biotek Quant) a una longitud de onda de 405 nm. Escalona-Montaña y colaboradores (2018) evaluaron la inhibición de la actividad enzimática de la fosfatasa PP2C en promastigotes de *L. mexicana* utilizando el compuesto *Sanguinarina Canadensis*.

5.6 Expresión de la proteína fosfatasa PP2C de los promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble

Se identificó la presencia de la proteína PP2C por la técnica de Western-blot reportado previamente (Escalona-Montaña et al., 2016). Los extractos totales de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD, se ajustaron a 10 µg de proteína. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida SDS – PAGE al 10%, se aplicó un voltaje de 80 V por 30 min y después a 120 V hasta finalizar. Una vez transcurrido el tiempo, el gel fue equilibrado con amortiguador de transferencia por 10 min, posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore), la cual previamente se activó con metanol por 5 min y se lavó con agua desionizada tres veces cada 5 min, para después equilibrarla con el amortiguador de transferencia. La membrana PVDF fue colocada en una cámara de transferencia húmeda (Bio–Rad Laboratories) a 80 V durante 1 h. La membrana fue bloqueada con leche semidescremada (Bio–Rad Laboratories) al 5% en TBST 1X durante 1 h. Posteriormente, la membrana fue lavada con solución amortiguadora TBST 1X seis veces cada 10 min, después se incubó con el anticuerpo primario α -PP2C policlonal de *L. mexicana* en una disolución (1:1000) en agitación constante a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la membrana fue lavada con TBST 1X cada 10 min durante 1 h. Posteriormente, fue incubada con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Cell signaling, Danvers MA, EUA) a una dilución (1:5000) en 5% de leche durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación la membrana se lavó cada 10 min durante 2 h con TBST 1X. La membrana fue incubada durante 5 min con un sustrato Immobilon Forte Western HRP (Millipore) y se reveló en ChemiDoc Imaging System (Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

5.7 Análisis de la morfología de los promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble mediante microscopia fotónica

Se elaboraron laminillas de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD, de acuerdo con el día de cultivo. Los tubos con los promastigotes se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min, las pastillas obtenidas se lavaron con PBS 1X (Triplicado). Posteriormente, se diluyeron las pastillas con PBS 1X y se colocó en un portaobjetos, dejándose secar a temperatura ambiente, se fijó con metanol y se tiñó con Giemsa a una dilución 1:20 durante 30 min, al finalizar se montaron con resina. Las laminillas, se observaron en un microscopio Axio Imager.M1 (Zeiss, Jena, DE) con una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss, Jena, DE) con la asesoría de la Dra. Norma Salaiza Suazo, en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM Unidad Hospital General de México.

Las longitudes de los promastigotes y de sus flagelos se cuantificaron a partir de imágenes obtenidas del microscopio fotónico empleando el programa Image J (Schneider et al., 2012), la escala se calibró en nanómetros. Las mediciones se realizaron de forma manual desde el extremo anterior hasta el posterior del parásito, y de igual manera con el flagelo. Se analizaron 10 promastigotes por cepa cada día de cultivo, los valores promedio se procesaron mediante ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey.

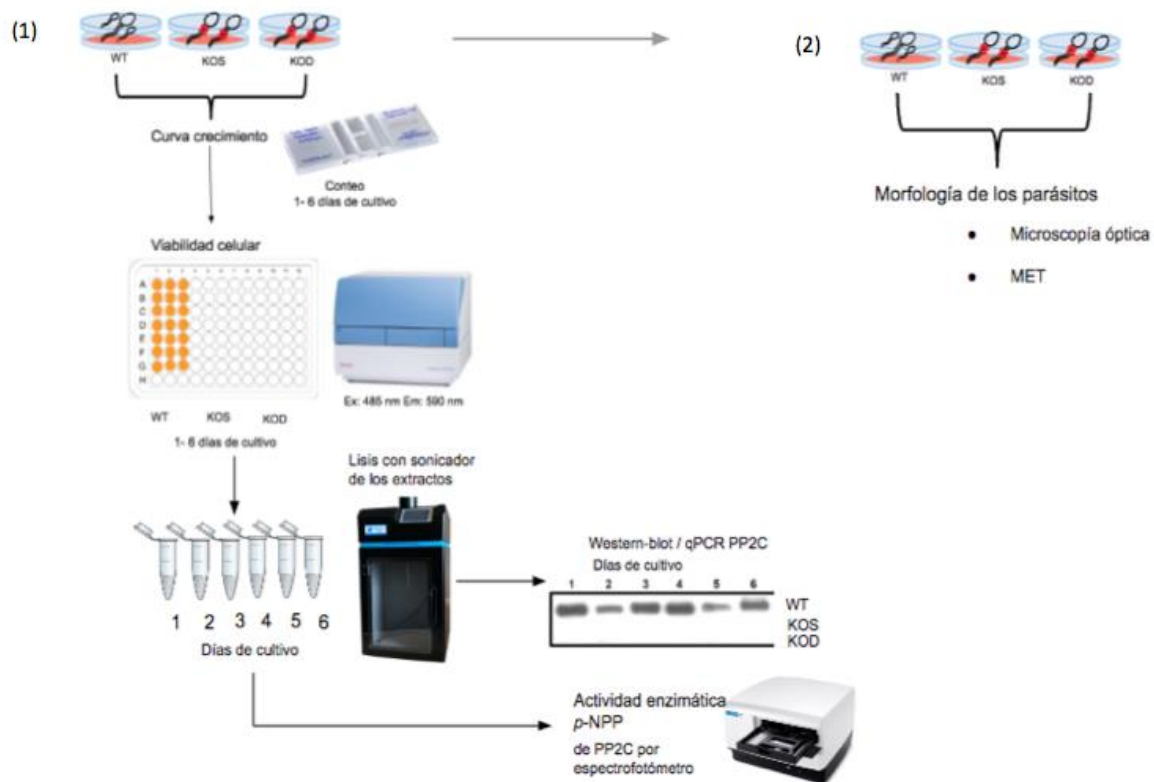
5.8 Análisis de la morfología de los promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble mediante microscopia electrónica de transmisión (MET)

Se prepararon cultivos de promastigotes *L. mexicana* KOS y KOD en los que se sembraron 50×10^6 de parásitos en 100 mL en el día 2 de cultivo, del día 3 al 6 de cultivo se sembraron 25×10^6 de parásitos en 50 mL. Mientras que el cultivo de promastigotes de *L. mexicana* WT se realizó en el día 4 de cultivo en 50 mL con 25×10^6 de parásitos. Los cultivos fueron tratados con la asesoría del Dr. Ricardo Mondragón Flores en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Zacatenco, donde se observó la ultraestructura de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS

y KOD, mediante microscopia electrónica de transmisión (MET). Los promastigotes fueron lavados con PBS y fijados con una mezcla de 4% paraformaldehído y 0.1 % glutaraldehído en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Una vez lavados los promastigotes fueron deshidratados gradualmente con etanol y luego embebidos en resina LR (London Resin, Polysciences, Inc. EUA).

Los promastigotes en resina se depositaron en moldes de plástico y se polimerizaron durante la noche bajo luz ultravioleta a 4 °C. Los bloques se utilizaron para obtener secciones delgadas en un ultramicrotomo Ultracut E (Reischert Jung, Austria), posteriormente las laminillas fueron examinadas con un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEOL 1400 X, JEOL Ltd. Japón).

Las longitudes, el ancho y las dimensiones de los organelos (núcleo y cinetoplasto) de la ultraestructura de los promastigotes se cuantificaron a partir de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), utilizando el programa Image J (Schneider et al., 2012). La escala de medición fue calibrada en micrómetros. Las mediciones se realizaron manualmente, determinando la longitud desde el extremo anterior hasta el posterior del parásito, así como el ancho celular, el diámetro nuclear y la longitud del cinetoplasto. Se analizaron 10 promastigotes por cepa en cada día de cultivo, y los valores promedio se sometieron a un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey.



Esquema 4. Metodología de la evaluación de la participación de la proteína fosfatasa PP2C en promastigotes de *Leishmania mexicana*

(1) Análisis del crecimiento, viabilidad celular, expresión y actividad enzimática a lo largo del desarrollo de los parásitos *wildtype* y *knock-out*. (2) Observación de los cambios morfológicos del flagelo y de la motilidad en promastigotes *wildtype* y *knock-out*.

6. RESULTADOS

Para contestar nuestro primer objetivo que se centra en determinar la participación de PP2C de los promastigotes de *L. mexicana* en el; crecimiento, viabilidad celular, expresión proteica y actividad enzimática de acuerdo con los días de cultivo de los parásitos *wildtype* (WT), *knock-out* sencillo (KOS) y *knock-out* doble (KOD).

6.1. Crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* *wildtype*, *knock-out* sencillo y *knock-out* doble durante los días de cultivo

Los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD, presentaron un crecimiento similar de parásitos, sin embargo, en el día tres de cultivo los promastigotes WT, presentaron 36 millones de parásitos, un número mayor de promastigotes con respecto a KOD con 31 millones de parásitos, mientras que en el día cuatro de cultivo se observa que el número de promastigotes KOS es de 50 millones, mayor con respecto a los 40 millones de parásitos WT (Fig. 1). Esta tendencia se mantiene hasta el sexto día de cultivo, momento en el que se observa una disminución en el crecimiento de las tres cepas, registrándose aproximadamente 32 millones de parásitos en KOS, 31 millones en KOD y 30 millones en la cepa WT. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las cepas en el día cuatro de cultivo, de acuerdo con el análisis de varianza de una vía (ANOVA, medias $\pm$ DE) ($p > 0.05$).

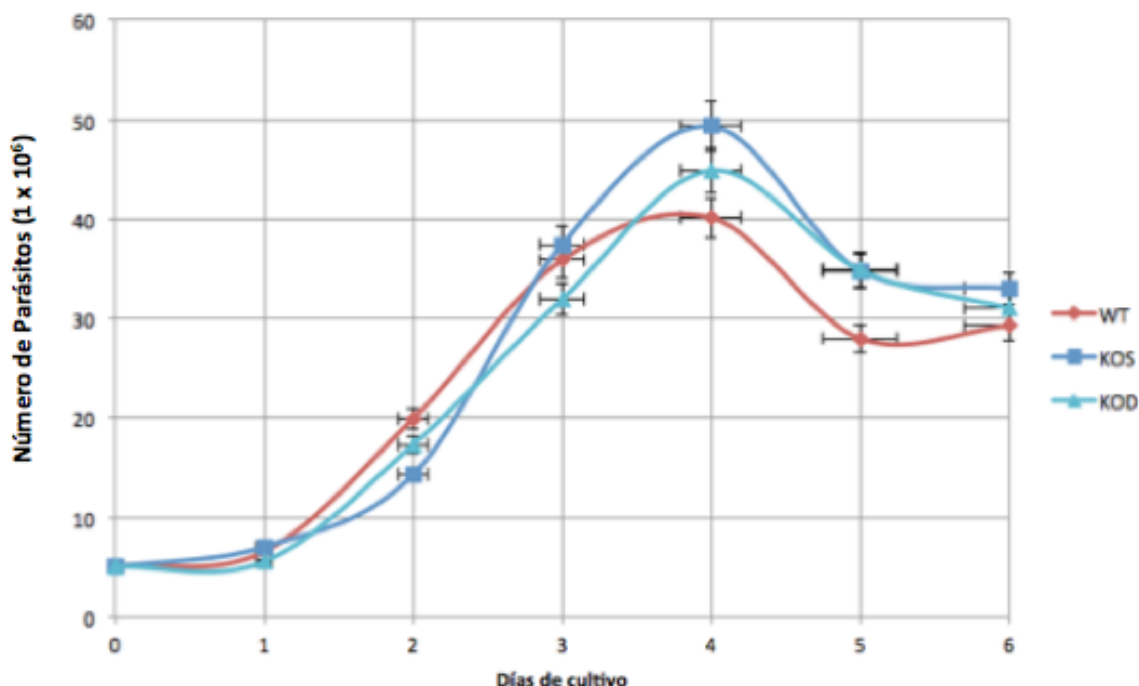


Figura 1. Curva de crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD.

Número de promastigotes WT, KOS y KOD en los días uno al seis de cultivo. Se sembraron el día cero 500,000/ mL parásitos de cultivo en las tres cepas (WT, KOS y KOD).

6.2. Viabilidad celular de promastigotes de *L. mexicana* *wildtype*, *knock-out* sencillo y *knock-out* doble durante los días de cultivo

Se encontró que las tres cepas coinciden en el día tres de cultivo en su punto de viabilidad óptima (Fig. 2). En la cepa de *L. mexicana* WT se muestra una viabilidad máxima constante los días tres y cuatro de cultivo, disminuye el día cinco y seis de cultivo. En la cepa KOS en el día cuatro de cultivo comienza a decaer su viabilidad celular, mientras que la cepa KOD tiene una menor viabilidad en el día cuatro comparada con KOS (Fig. 2).

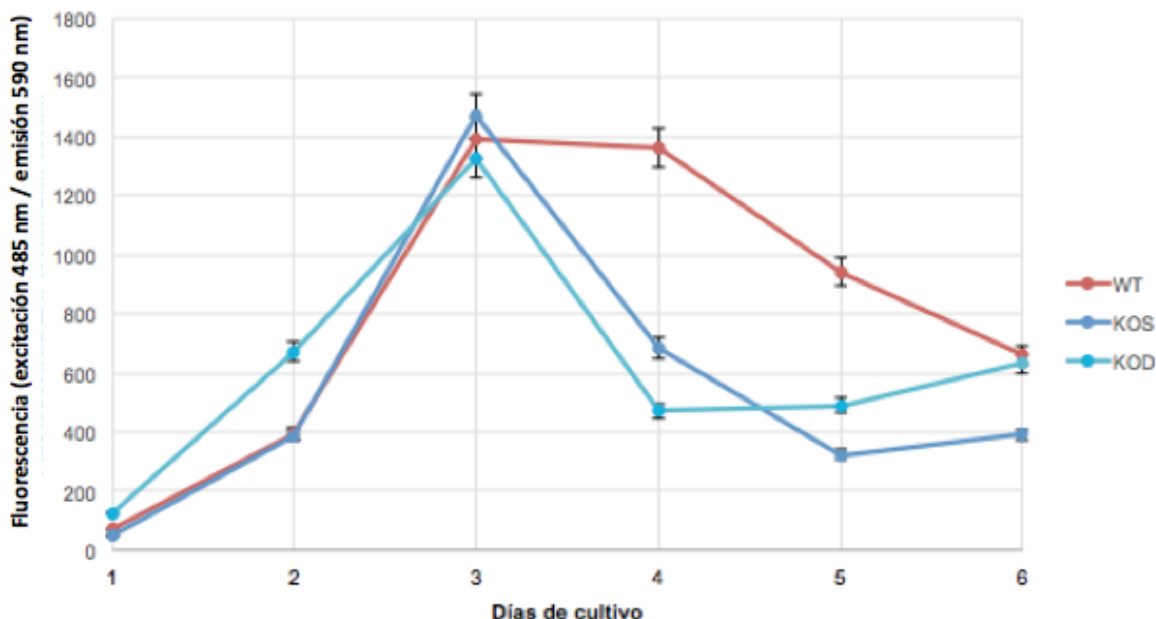


Figura 2. Viabilidad celular por día de cultivo de promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD. Ensayo de viabilidad celular mediante azul alamar efectuado del día 0 al 6 de cultivo en las tres cepas. Las lecturas de fluorescencia se realizaron a 485 nm (excitación) y 590 nm (emisión).

6.3. Actividad enzimática de promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble durante los días de cultivo

Los resultados muestran que los extractos de parásitos presentan actividad fosfatasa capaz de hidrolizar el sustrato general *p*-NPP (Fig. 3).

También se realizó la actividad enzimática en presencia de Mg^{+2} , donde se observó que los parásitos WT y KOS llegan a su punto máximo de actividad en el día tres de cultivo. Mientras que en KOD su punto máximo lo alcanza desde el día dos de cultivo, en KOS observamos una disminución de actividad en el día cinco de cultivo, al igual que en los parásitos WT y KOD (Fig. 3).

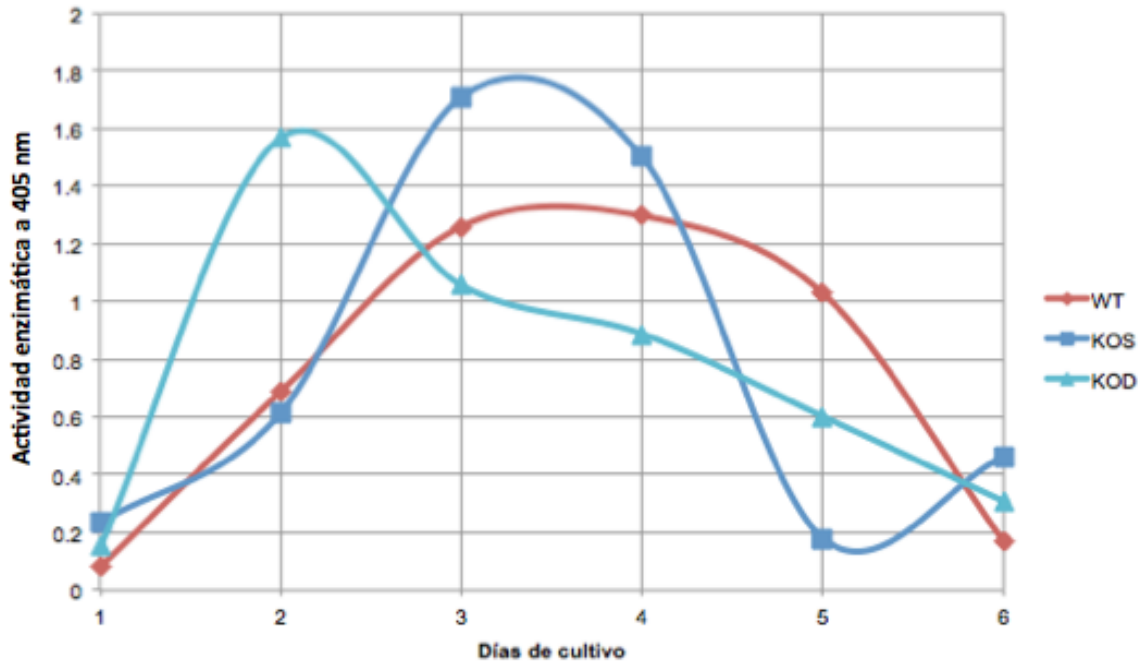


Figura 3. Ensayo de actividad fosfatasa en extractos (3 μ g) de promastigotes de *Leishmania mexicana* WT, KOS y KOD cultivados durante seis días. La actividad enzimática se evaluó en presencia de Mg^{+2} empleando *p*-NPP como sustrato.

6.4. Identificación de la proteína PP2C de promastigotes de *L. mexicana* wildtype, knock-out sencillo y knock-out doble durante los días de cultivo

Con la finalidad de conocer si los parásitos KOS, presentan síntesis proteica de la proteína fosfatasa PP2C, se realizó un Western-Blot con los extractos de los parásitos antes mencionados durante los cinco días de cultivo. Se encontró que en los promastigotes KOS solo en el día tres de cultivo existe una ligera expresión de la proteína PP2C (Fig. 4B), comparada con la cepa WT donde se observa la expresión de la proteína PP2C en los cinco días de cultivo, lo que confirma que la proteína es constitutiva (Fig. 4A). Por otro lado, se observó en la cepa KOD la ausencia de la proteína (Fig. 4C), lo que confirma que en los *knock-out* doble no se sintetiza la proteína PP2C.

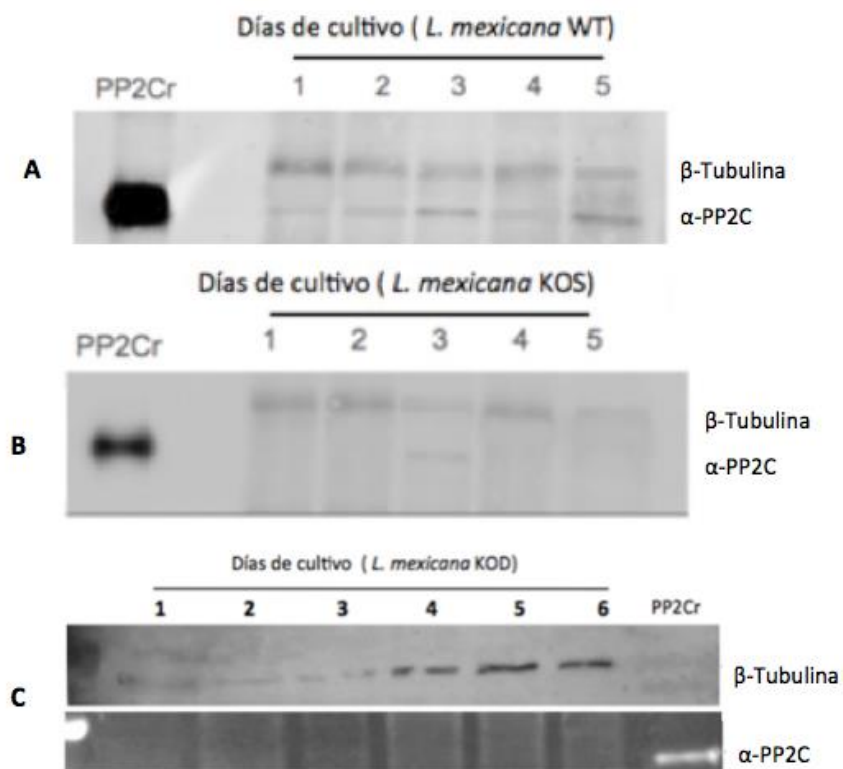


Figura 4. Inmunodetección de la proteína PP2C en extractos de promastigotes de *L. mexicana*.

A) Extractos de los promastigotes de *L. mexicana* WT en los cinco días de cultivo, B) Extractos de los promastigotes de *L. mexicana* KOS en los cinco días de cultivo, y C) Extractos de los promastigotes de *L. mexicana* KOD en los seis días de cultivo.

6.5. Análisis morfológico de promastigotes de *L. mexicana* mediante microscopia fotónico

Se observaron diferencias morfológicas entre los promastigotes tipo silvestre (WT) y las líneas *knock-out* (KOS y KOD). Los parásitos WT alcanzan la forma celular ordinaria al día 4 de cultivo, es decir; una forma alargada y fusiforme, con un cuerpo celular delgado y una longitud que varía entre las 10 a 20 μm , posee un flagelo libre que emerge del bolsillo flagelar ubicado en la región anterior del parásito, un núcleo localizado en la región media, un cinetoplasto situado próximo al flagelo, entre el núcleo y el extremo anterior. Mientras que KOS y KOD presentan una forma celular alargada, y con una menor longitud de flagelos hasta el día 3 de cultivo. Del día 4 al 6, los parásitos KOS se muestran más alargados en comparación con KOD, en este organismo se observa una morfología más ancha que los WT y KOS. Específicamente, los parásitos KOS presentan una forma alargada con terminación redondeada, a diferencia de los promastigotes WT, que presentan punta en el extremo. En lo que respecta al flagelo, los parásitos *knock-out* sencillos y dobles presentan flagelos de menor longitud en comparación con los promastigotes WT de *L. mexicana* (Fig. 5).

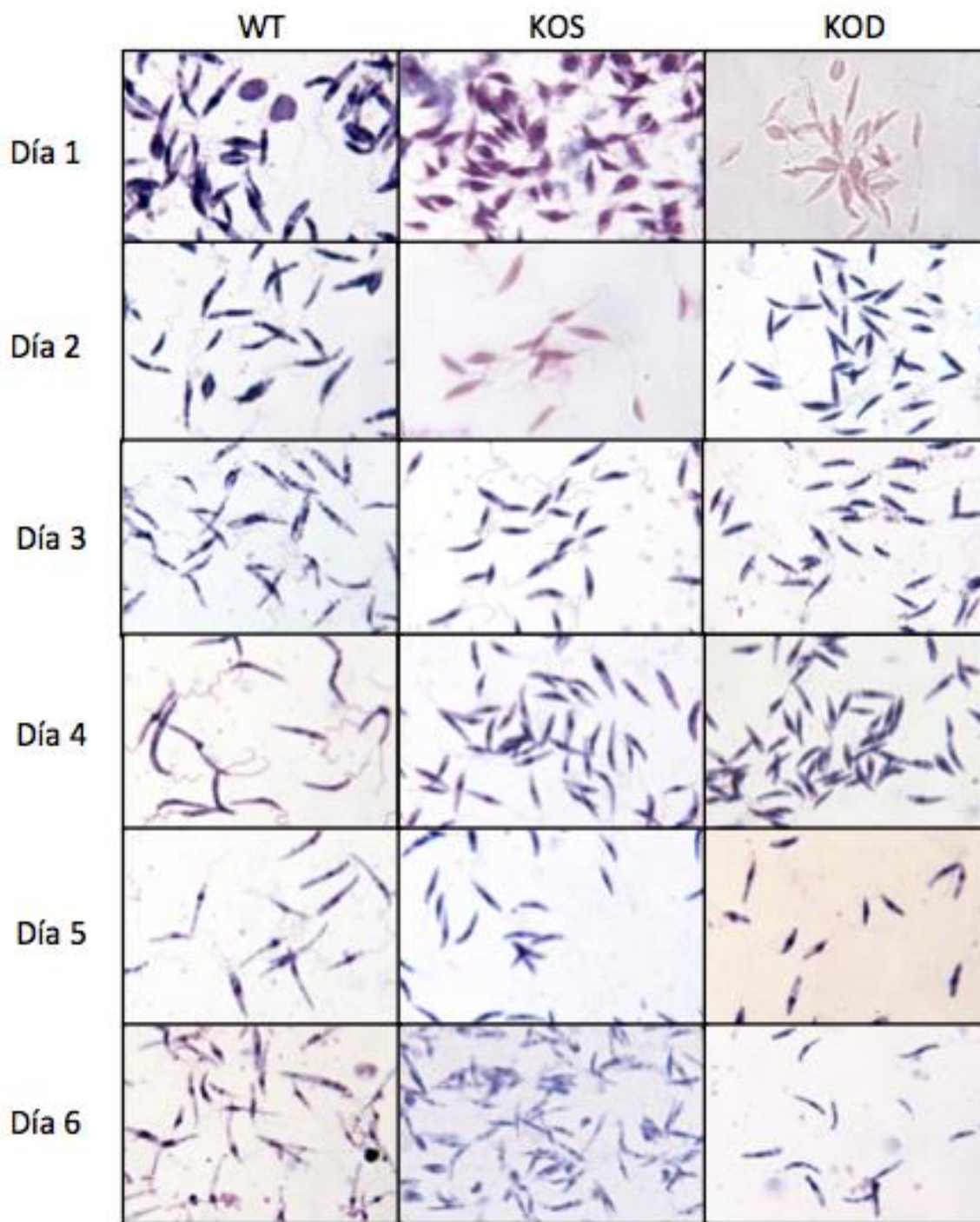
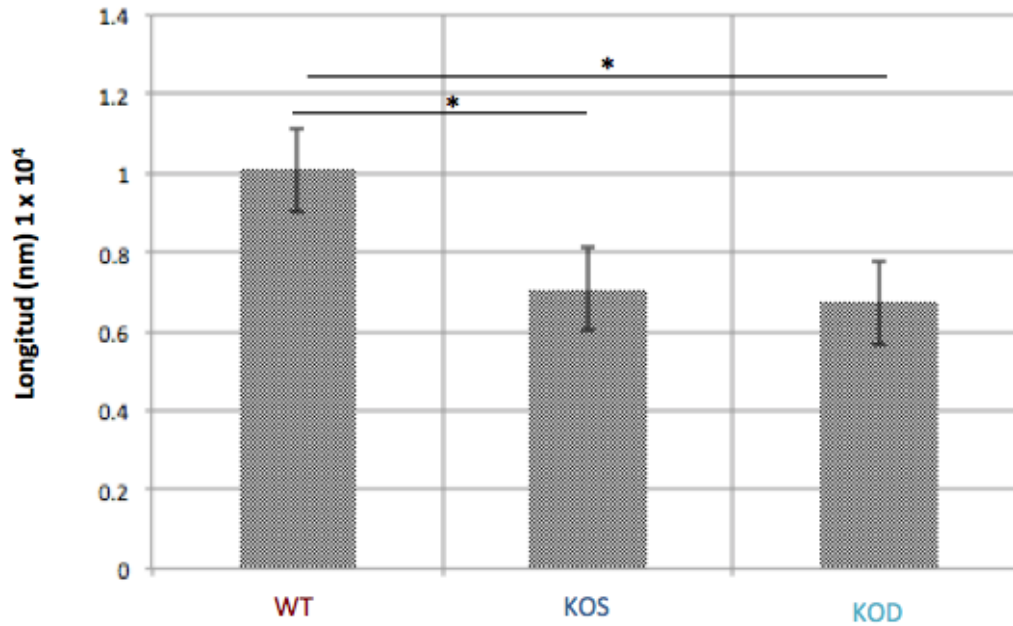


Figura 5. Morfología de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS y KOD durante 6 días de cultivo. Tinción con Giemsa 1:20. Imagen 63X. Tomado con microscopio Axio Imager.M1 (Carl, Zeiss) y cámara AxioCam MRc5 (Carl, Zeiss).

Para poder comprobar que existen diferencias morfológicas en los promastigotes de *L. mexicana* se analizaron las imágenes de la Figura 5. en el programa Image J (Schneider et al., 2012). Se observó que los promastigotes WT son significativamente más largos que los KOS y KOD (Fig. 6). Se corroboró lo observado en la Figura 5, donde se aprecia una morfología distinta entre los promastigotes de *Leishmania mexicana* tipo silvestre (WT) y las líneas *knock-out* (KOS y KOD) (Fig. 6). En la cepa WT, la longitud celular fue significativamente diferente mayor que las cepas modificadas, los parásitos WT llegan a una longitud de 10,000 nm (equivalente a 10 μ m), mientras que los promastigotes KOS presentaron una longitud de 7,000 nm (equivalente a 7 μ m), la cual es superior a los KOD con una longitud aproximada de 6,000 nm (equivalente a 6 μ m) (Fig. 6). Por otra parte, al analizar la longitud del flagelo (Fig. 7), se observó una diferencia significativa entre los promastigotes WT y KOD, siendo los WT los que mostraron flagelos más largos, con una longitud de 9,000 nm (equivalente a 9 μ m), mientras que los flagelos de KOD llegaron a una longitud aproximada de 6,000 nm (equivalente a 6 μ m). En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre WT y KOS, de acuerdo con el análisis de varianza de una vía (ANOVA, medias $\pm$ DE) ($p > 0.05$). Estos resultados confirman la existencia de alteraciones morfológicas en los modelos *knock-out* de PP2C.



Figura

6. Longitud de los promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD

Las barras muestran las medias $\pm$ desviación estándar de la longitud de los promastigotes de cada cepa. Las diferencias significativas fue determinada con las pruebas de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey ($p < 0.001$). WT: *wildtype*, KOS: *knock-out* sencillo, KOD: *knock-out* doble.

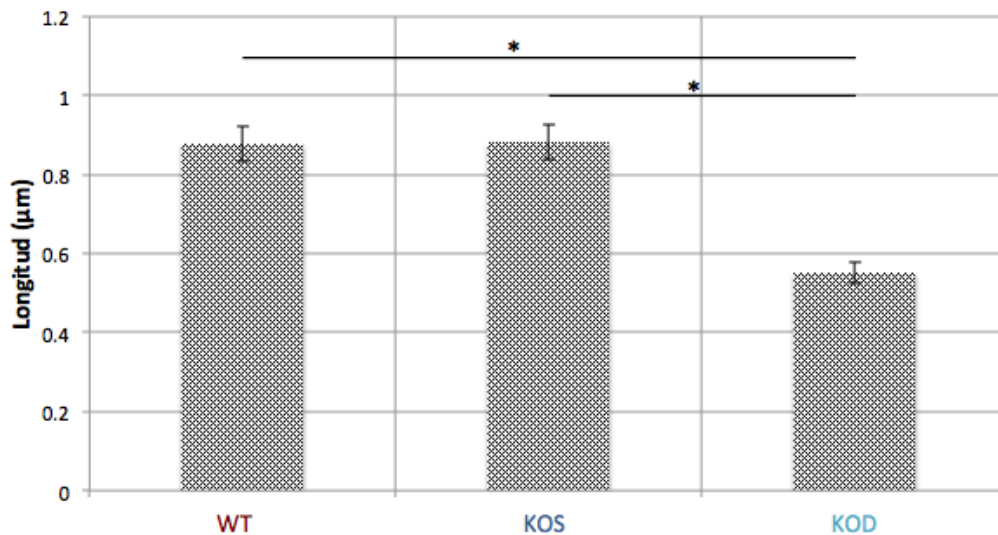


Figura 7. Longitud de los flagelos de promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD

Las barras muestran las medias $\pm$ desviación estándar de la longitud de los flagelos de los promastigotes de cada cepa. Las diferencias significativas fue determinada con las pruebas de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). WT: *wildtype*, KOS: *knock-out* sencillo, KOD: *knock-out* doble.

6.6. Análisis ultraestructural de promastigotes de *L. mexicana* mediante microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Para analizar los cambios ultraestructurales, se realizó una microscopia electrónica de transmisión (MET). En el día 4 de cultivo, los promastigotes de *L. mexicana* alcanzaron su morfología celular característica. Este punto se consideró como control para comparar con los promastigotes KOS y KOD de los días 2 al 6 de cultivo.

Se observó en los parásitos *knock-out* un cambio en la morfología celular (Fig. 8). Durante los primeros días de cultivo presentaron cuerpos pequeños que terminaban en punta; a partir del día 4, la terminación se volvió redondeada y, entre los días 5 y 6, el cuerpo celular del parásito adquirió una mayor longitud, aunque no similar a la de los WT. Asimismo, los flagelos de los parásitos *knock-out* mostraron un mayor crecimiento en los últimos días de cultivo (Fig. 6 y 7). Además, se observó un cambio en la distribución de los organelos que componen a los promastigotes (aparato de Golgi, citoesqueleto, núcleo, cinetoplasto y bolsillo flagelar). También se detectaron puntos de color negro a lo largo de los parásitos, que podrían corresponder a cuerpos lipídicos acumulados. Con estos resultados se confirma que la estructura del parásito se vio alterada a nivel de la membrana en los parásitos *knock-out*.

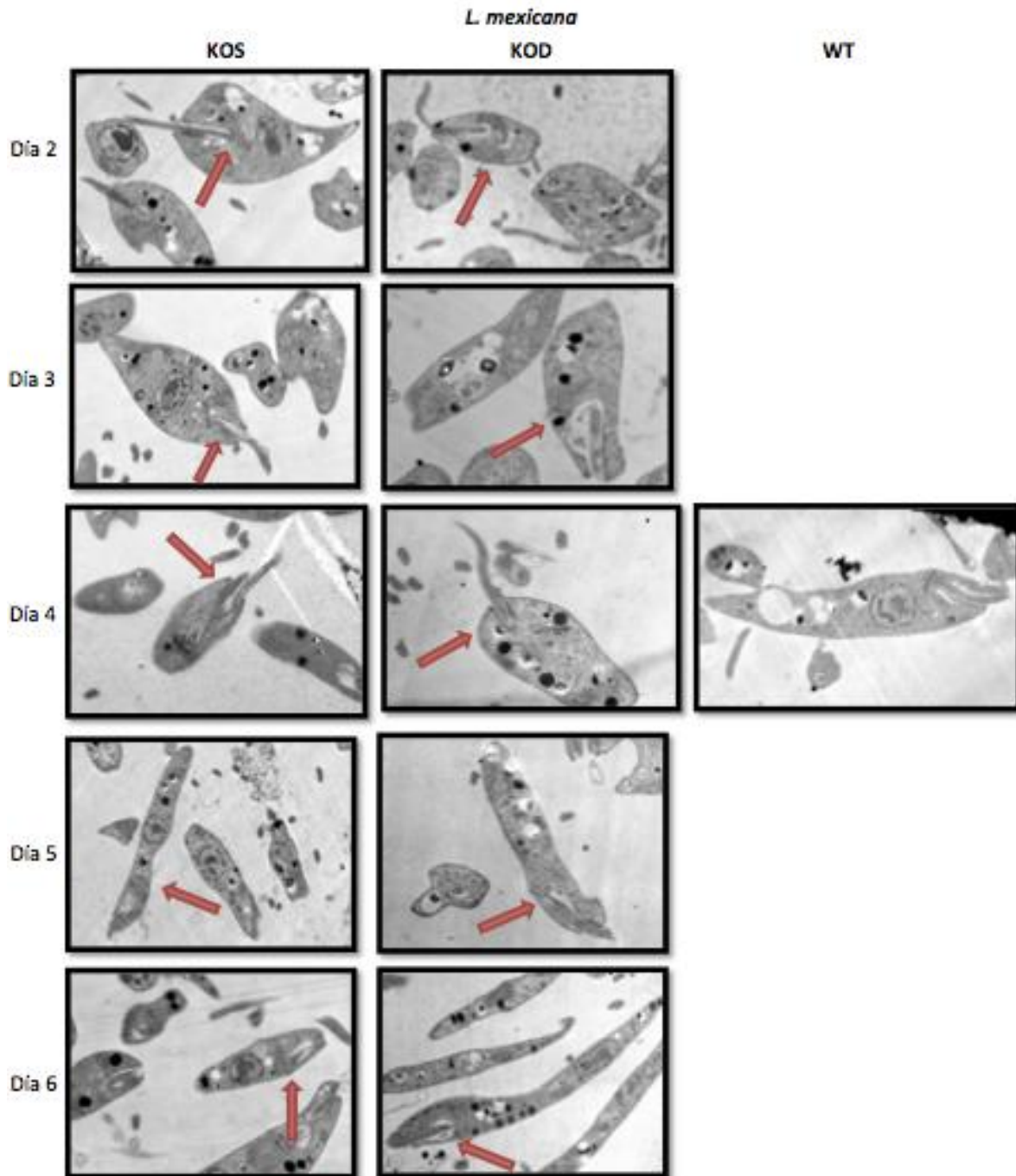


Figura 8. Ultraestructura de promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD analizada por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las imágenes corresponden a promastigotes KOS y KOD obtenidos entre los días 2 y 6 de cultivo; los promastigotes WT del día 4 se emplearon como referencia morfológica. Las flechas rojas indican las diferencias en la posición de los organelos (núcleo y cinetoplasto), en el cambio de tamaño del bolsillo flagelar y la formación de vesículas lipídicas. Escala: 500 nm.

Para poder comprobar que existen diferencias ultraestructurales en los promastigotes de *L. mexicana* se analizaron las imágenes de la Figura 8. en el programa Image J (Schneider et al., 2012), para cuantificar las diferencias de longitud y ancho del cuerpo celular, diámetro del núcleo y longitud del cinetoplasto, de los promastigotes de *L. mexicana* WT, KOS Y KOD.

Comprobamos que el cuerpo celular de los promastigotes WT es significativamente más largos que los KOS y KOD (Fig. 9). Donde los parásitos WT alcanzan una longitud celular de 10 μm , mientras KOS y KOD miden 6 μm . Posteriormente al analizar el ancho del cuerpo celular de los promastigotes (Fig.10) no se detectaron diferencias significativas, de acuerdo con el análisis de varianza de una vía (ANOVA, medias $\pm$ DE) ($p > 0.05$). Sin embargo, al medir el diámetro del núcleo de los promastigotes (Fig.11), en los parásitos WT se llegó a un diámetro de 1.4 μm , el cual es significativamente diferente a KOS y KOD con un diámetro de 1.2 μm y 1.1 μm correspondiente. Por otra parte, al analizar la longitud del cinetoplasto (Fig. 12) donde en parásitos WT mide 0.9 μm , es significativamente diferente a KOD, el cual mide 0.6 μm . Estos resultados confirman la existencia de alteraciones ultraestructurales en los modelos *knock-out* de PP2C.

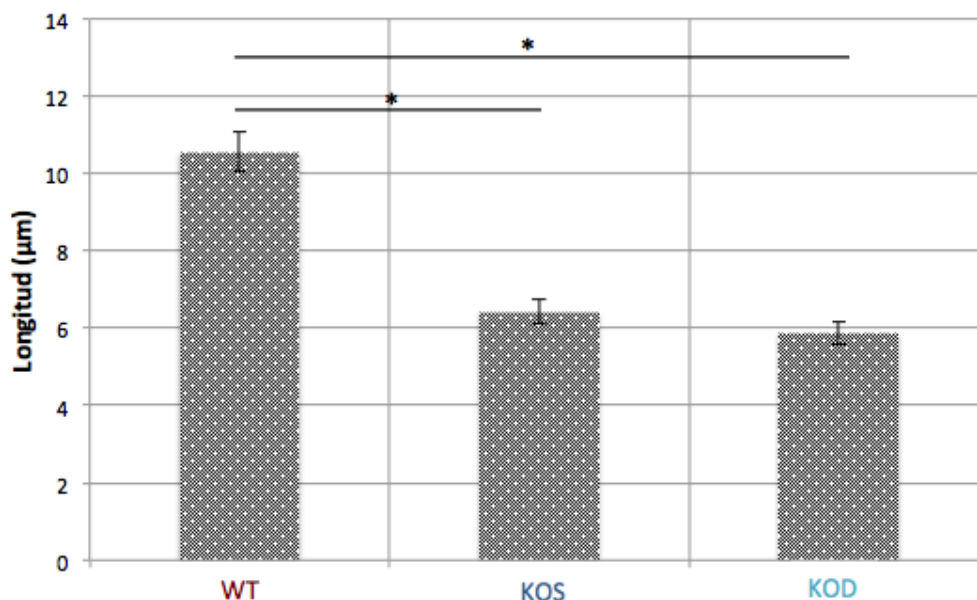


Figura 9. Longitud del cuerpo celular de los promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD

Las barras muestran las medias $\pm$ desviación estándar de la longitud de la ultraestructura de los promastigotes de cada cepa. Las diferencias significativas fue determinada con las pruebas de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). WT: *wildtype*, KOS: *knock-out* sencillo, KOD: *knock-out* doble.

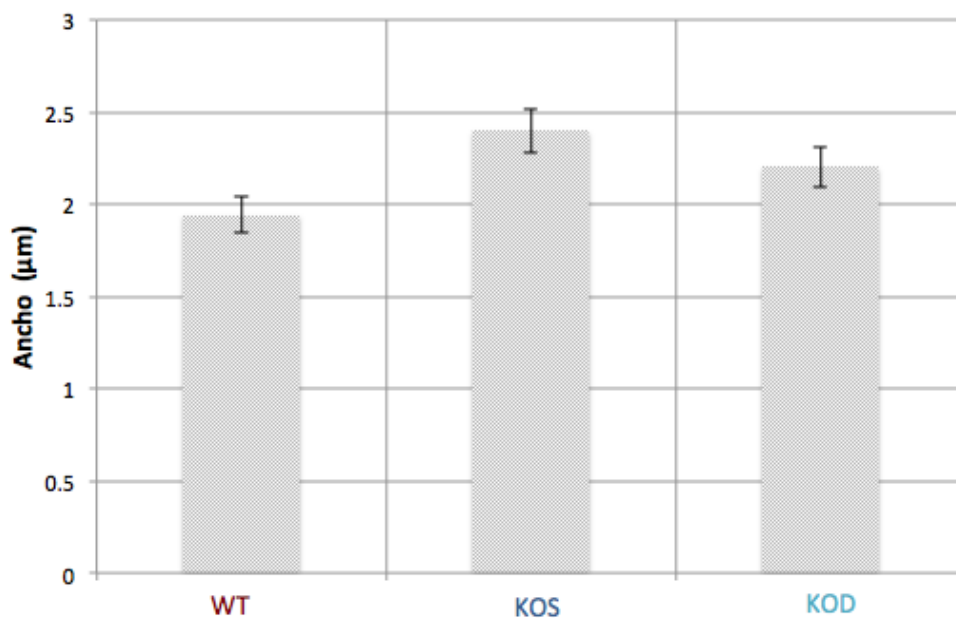


Figura 10. Ancho del cuerpo celular de los promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD

Las barras muestran las medias $\pm$ desviación estándar del ancho de la ultraestructura de los promastigotes de cada cepa. No se detectaron diferencias significativas con las pruebas de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). WT: *wildtype*, KOS: *knock-out* sencillo, KOD: *knock-out* doble.

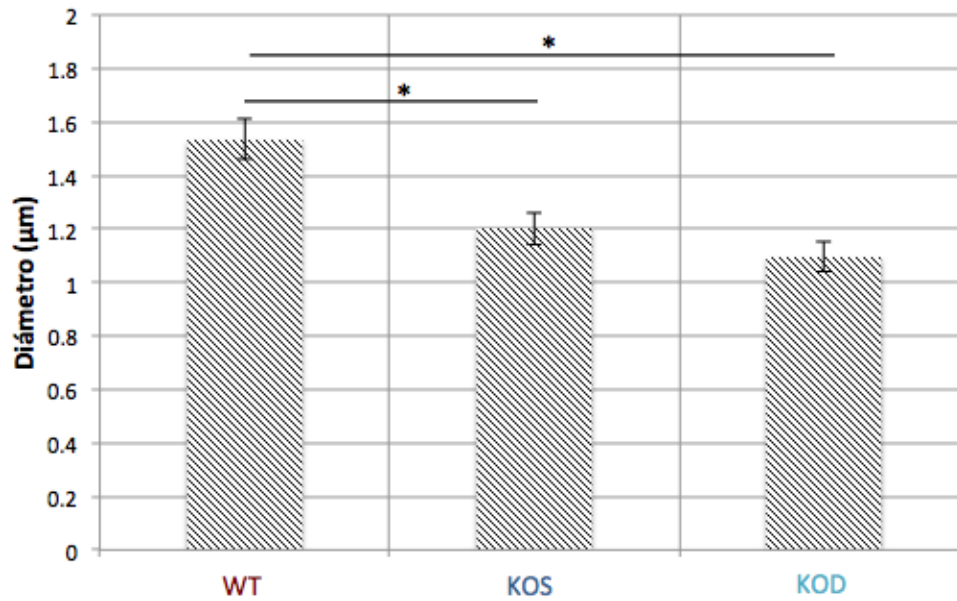


Figura 11. Diámetro del núcleo de los promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD

Las barras muestran las medias $\pm$ desviación estándar del diámetro del núcleo de los promastigotes de cada cepa. Las diferencias significativas fue determinada con las pruebas de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey ($p < 0.001$). WT: *wildtype*, KOS: *knock-out* sencillo, KOD: *knock-out* doble.

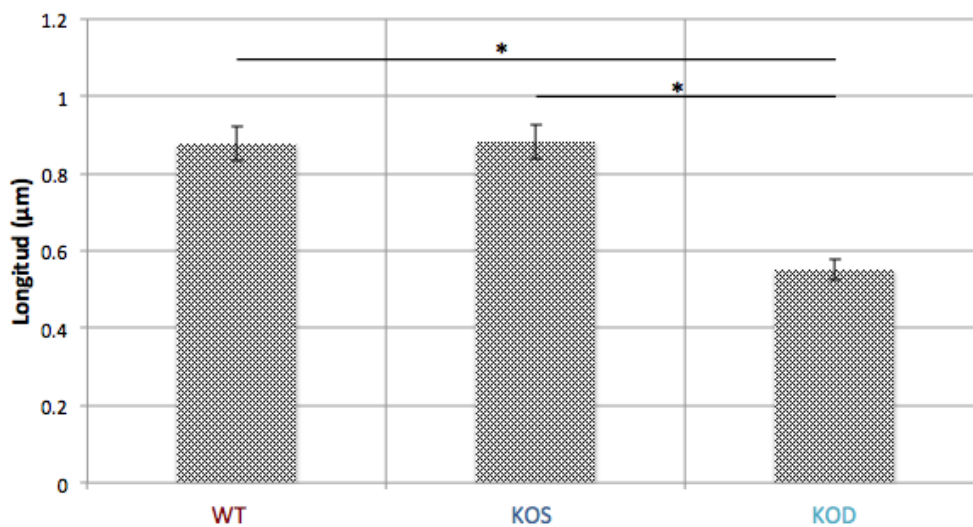


Figura 12. Longitud del cinetoplasto de los promastigotes *L. mexicana* WT, KOS y KOD

Las barras muestran las medias $\pm$ desviación estándar de la longitud del cinetoplasto de los promastigotes de cada cepa. Las diferencias significativas fue determinada con las pruebas de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). WT: *wildtype*, KOS: *knock-out* sencillo, KOD: *knock-out* doble.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se mostró que el número de parásitos *knock-out* fue disminuyendo conforme avanzaban los días de cultivo. Este mismo efecto se observó en *L. infantum*, parásitos que carecen del gen de una proteasa de cisteína (Silverman et al., 2008), lo que sugiere que dicha proteína podría desempeñar un papel esencial en el crecimiento del parásito. Aunque en el quinto día de cultivo se observó el punto máximo de crecimiento en las tres cepas, los promastigotes KOD presentaron un mayor crecimiento que los WT, seguidos de los KOS. Feng y colaboradores (2018) reportaron que, al generar mutantes nulos en *L. mexicana* del gen PIFTC3 (un transportador intraflagelar de glucosa), presentaron un mayor crecimiento en comparación con los parásitos *wildtype*. Esto se debió a que los parásitos con el gen nulo aumentaron el pH del medio circundante (pH 7.4), lo que resultó en un crecimiento deficiente; sin embargo, al ajustar el medio nuevamente a un pH bajo (pH 7.0), el crecimiento se contrarrestó. Este fenómeno se explica porque la glucosa y sus derivados se absorben y metabolizan de manera menos eficiente en los amastigotes que en los promastigotes, lo que podría justificar el incremento en el crecimiento de los parásitos *knock-out* (Feng et al., 2018).

Los cultivos de promastigotes WT, KOS y KOD mostraron su punto máximo de viabilidad al tercer día de cultivo, identificándose este punto como el más adecuado para la infección de modelos in vivo e in vitro, de acuerdo con lo descrito previamente por Descoteaux y Turco (1999). Sin embargo, las cepas mutantes KOS y KOD presentaron una disminución drástica en su viabilidad a partir del día 4 de cultivo, en contraste con la cepa WT, que mantuvo una viabilidad significativamente más alta hasta el día 6. Estos resultados sugieren que las mutaciones en KOS y KOD afectan de manera negativa la supervivencia o adaptación del parásito en condiciones de cultivo. De manera similar, Thaprawat y colaboradores (2025) reportaron en *Toxoplasma gondii* la interrupción genética de TgPROP1, una proteína clave en las etapas iniciales de la vía de autofagia, los parásitos deficientes

en la proteína antes mencionada redujeron la formación de autolisosomas y disminuyó la viabilidad de los parásitos *knock-out*.

En relación con la actividad enzimática, se ha identificado en extractos celulares de otros microorganismos. Por ejemplo, en *Trypanosoma cruzi* se analizó la actividad enzimática en vesículas secretadas por el parásito, las cuales presentaron actividad de fosfatasa que correlacionó con un aumento en la adhesión e infección de macrófagos (Neves et al., 2014). Asimismo, se ha reportado que los promastigotes de *L. mexicana* secretan fosfatasas con actividad de serina-treonina (PSTP) (Escalona-Montaña et al., 2010), y que la inducción de PTPasa en macrófagos puede ser considerado como un factor de patogenicidad en *Leishmania* spp. En estudios con *L. amazonensis*, al caracterizar una ectopirofosfatasa relacionada con el metabolismo del fosfato, se observó que en presencia de 5 mM de $MgCl_2$ la actividad enzimática fue significativamente mayor durante los primeros días de cultivo, lo que sugiere un posible papel de esta enzima en el crecimiento del parásito (Freitas-Mesquita et al., 2014). Este mismo comportamiento se observó en los resultados con *L. mexicana* en la cepa KOD, donde la actividad enzimática en presencia de Mg^{+2} alcanzó su máximo el día dos de cultivo, lo que podría indicar una regulación distinta de la enzima. Esto podría deberse a una vía de compensación por la enzima faltante o a una inducción temprana seguida de una degradación enzimática. En este sentido, se ha descrito que una enzima inestable puede perder su estructura tridimensional (terciaria o cuaternaria), formar agregados, inactivarse por oxidación o sufrir modificaciones químicas, lo que conduce a la pérdida funcional y al estrés celular (Fernandez-Lafuente, 2023). Dicho comportamiento fue consistente con nuestros hallazgos en la viabilidad celular de los parásitos mutantes KOS y KOD, cuya viabilidad disminuyó a partir del día 4 de cultivo en comparación con los promastigotes WT. Cabe destacar que la proteína fosfatasa PP2C ya se ha sido reportada como un posible factor de virulencia (Soulat & Bogdan, 2017). Por ello, las alteraciones observadas en su actividad enzimática en los parásitos mutantes respaldan la hipótesis de considerar a la PP2C como un posible blanco terapéutico, tal como lo sugirió Dey y colaboradores (2013), quienes

mostraron que la eliminación del gen *p27* redujo la virulencia en un modelo murino de *L. donovani*.

En estudios previos, Escalona-Montaña y colaboradores (2017) reportaron la expresión de la proteína fosfatasa PP2C en diferentes especies de *Leishmania*, entre ellas *L. mexicana*. En el presente trabajo observamos una ligera expresión de PP2C en los parásitos mutantes KOS en el día 3 de cultivo, lo cual coincide con el punto máximo de actividad enzimática. Esto podría deberse a que solo un alelo se encuentra inactivado (*Knock-out* sencillo), de modo que la expresión observada correspondería al alelo restante que codifica para PP2C. En contraste, en los parásitos mutantes KOD, como era de esperarse, en el western-blot no se detectó la presencia de la proteína en ninguno de los días de cultivo, lo que confirma la sustitución del gen. Esta ausencia podría deberse a anomalías en el proceso de traducción o a mutaciones que impiden la síntesis de una proteína funcional. De manera similar, Musabyimana y colaboradores (2024) demostraron en *Plasmodium falciparum* que el *knock-out* de la proteína PfSET10, una metiltransferasa de histonas, interfiere con la regulación transcripcional al afectar la metilación de H3K18, desempeñando funciones cruciales en el mantenimiento de la cromatina durante el desarrollo del parásito en su etapa eritrocítica. Este tipo de proteínas, implicadas en la regulación génica, representan importantes blancos farmacológicos. De igual manera, Galili-Kostin y colaboradores (2025) reportaron que en *Trypanosoma brucei* el *knock-out* de TbIncRNA-23, una molécula localizada en el nucléolo y asociada con polisomas, anuló la capacidad del parásito para transformarse de formas procíclicas a metacíclicas, lo que comprometió su ciclo entre hospedadores. En este contexto, considerando que *L. mexicana* también presenta formas procíclicas y metacíclicas, los parásitos mutantes KOS y KOD podrían mostrar una virulencia reducida en ensayos *in vivo* e *in vitro* en comparación con los promastigotes WT. Por lo tanto, resulta necesario realizar dichos estudios para confirmar esta hipótesis.

En este trabajo se observó una morfología distinta en los promastigotes de *L. mexicana* KOS y KOD en comparación con los parásitos WT, estos cambios se notaron a nivel membrana como

Mientras que a nivel citoesqueleto se observó una modificación en la distribución de organelos (aparato de Golgi, núcleo, cinetoplasto y bolsillo flagelar). En ensayos similares con *L. mexicana*, en el cual se generó un *knock-out* de la proteína IFT88, localizada en la estructura paraflagelar del promastigote, se mostraron alteraciones en el desarrollo del flagelo, observándose flagelos cortos o incluso su ausencia (Beneke et al., 2019). De igual manera, Escalona-Montaña y colaboradores (2021) reportaron que la fosfatasa PP2C se encuentra en el bolsillo flagelar y a lo largo del flagelo, lo que sugiere su participación en la morfología de este organelo. Vizcaíno-Castillo y colaboradores (2024) estudiaron otra proteína involucrada en la estructura de *Leishmania*, la profilina, que interactúa con la actina del citoesqueleto. En este trabajo, los parásitos *knock-out* de *L. mexicana* para esta proteína modifican la estructura del parásito y en su capacidad endocítica, mientras que los parásitos *knock-in* la proteína se expresó mayormente en el bolsillo flagelar junto con el endosoma. Estos hallazgos indican que las proteínas localizadas en la región paraflagelar o en el bolsillo flagelar son determinantes para la organización estructural del parásito. De manera similar, Rocha y colaboradores (2020) generaron mutantes *knock-out* de la proteína LinDYRK1 en promastigotes de *L. infantum*. Esta proteína, actúa como regulador de la estasis en otros organismos, también se localizó en el bolsillo flagelar. Su inactivación afectó la fase de crecimiento estacionario y provocó aberraciones morfológicas, como la acumulación de cuerpos lipídicos, cambios en la estructura de la membrana, así como modificaciones en la proporción de ácidos grasos saturados (18:0) y poliinsaturados (18:2). El análisis de la ultraestructura reveló la presencia de estructuras redondeadas de alta densidad electrónica a lo largo de los promastigotes, presumiblemente correspondientes a cuerpos lipídicos acumulados. Estas observaciones sugieren que, junto con las alteraciones morfológicas, ocurren también cambios en la composición o distribución lipídica.

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que las proteínas localizadas en el bolsillo flagelar son esenciales tanto para la estructura del flagelo como para la integridad celular del parásito. Asimismo, sustentan la idea de una menor virulencia en modelos *in vitro*,⁵⁰ lo que refuerza la necesidad de realizar

ensayos de infección *in vitro* e *in vivo* para validar la participación de la proteína fosfatasa PP2C como un posible factor de virulencia en la leishmaniasis cutánea.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la proteína fosfatasa PP2C tiene un papel significativo en la morfología de *Leishmania mexicana*, debido que en su modelo *knock-out* sencillo y doble (KOS y KOD) provocó alteraciones morfológicas y estructurales evidentes, particularmente en la longitud celular y flagelar, así como en la organización del núcleo, el cinetoplasto y el bolsillo flagelar. Estos cambios sugieren que la PP2C desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la morfología y viabilidad del parásito, lo que apunta a una participación relevante de esta fosfatasa en los procesos de adaptación y supervivencia del parásito en condiciones *in vitro*. Además, la reducción drástica de la actividad enzimática de fosfatasa en KOD y la expresión incompleta de la proteína en los mutantes KOS y KOD refuerza la hipótesis de que PP2C puede estar involucrada en rutas metabólicas críticas y mecanismos de regulación post-transcripcional. En este contexto, la pérdida de PP2C podría comprometer la virulencia y capacidad infectiva de los parásitos mutantes, lo que abre la posibilidad de considerar esta fosfatasa PP2C como un blanco terapéutico en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

9. PERSPECTIVAS

9.1. Evaluación de la virulencia *in vivo*

Para confirmar el papel funcional de PP2C como posible factor de virulencia, es necesario implementar modelos murinos de infección con los parásitos *knock-out* (KOS y KOD). Esto permitiría comparar la capacidad de generar lesiones cutáneas, la carga parasitaria en órganos blanco y la respuesta inmune inducida en comparación con cepas *wildtype*.

9.2. Estudio transcriptómico y proteómico comparativo

Una estrategia de RNA-seq o proteómica diferencial entre parásitos WT y *knock-out* permitiría identificar rutas moleculares compensatorias, factores regulados por PP2C o procesos celulares alterados por su ausencia. Este enfoque podría revelar blancos secundarios o redes reguladoras implicadas en la morfología flagelar.

9.3. Generación de líneas *knock-in* o de sobreexpresión

Complementar los modelos de pérdida de función (*knock-out*) con modelos de ganancia de función mediante *knock-in* o sobreexpresión controlada de PP2C, permitiría validar de forma funcional la relación entre su expresión y los fenotipos observados. Esto fortalecería la hipótesis causal y no solo correlacional.

9.4. Caracterización funcional del dominio catalítico de PP2C

Mediante mutagénesis dirigida, se podrían generar variantes de PP2C con mutaciones en su dominio catalítico. Esto permitiría discernir si los efectos observados se deben exclusivamente a la actividad enzimática o si también están involucradas funciones estructurales o de interacción proteína-proteína.

9.5. Análisis de interacción PP2C – cinasas flagelares

Dado que la fosforilación y desfosforilación están muy reguladas en el flagelo, se sugiere realizar estudios de interacción funcional o física entre PP2C y cinasas específicas del aparato flagelar (por ejemplo, MAPKs o IFT kinases), a través de co-inmunoprecipitación o ensayos de colocalización por inmunofluorescencia.

9.6. Validación en otras especies de *Leishmania*

Extender el estudio a otras especies como *Leishmania donovani* o *Leishmania major* permitiría evaluar si el papel morfogenético y patogénico de PP2C es conservado filogenéticamente, lo que reforzaría su valor como blanco terapéutico.

10. REFERENCIAS

- Abdelhaleem, A. A., Elamin, E. M., Bakheit, S. M., & Mukhtar, M. M. (2019). Identification and characterization of *Leishmania* amastigote and axenic form antigens. *Tropical Biomedicine*, 36(4), 866-873.
- Abu-Dayyeh, I., Hassani, K., Westra, E. R., Mottram, J. C., & Olivier, M. (2010). Comparative Study of the Ability of *Leishmania mexicana* Promastigotes and Amastigotes To Alter Macrophage Signaling and Functions. *Infection and Immunity*, 78(6), 2438-2445. <https://doi.org/10.1128/IAI.00812-09>
- Aguirre-García, M. M., Escalona-Montaña, A. R., Bakalara, N., Pérez-Torres, A., Gutiérrez-Kobeh, L., & Becker, I. (2006). *Leishmania major*: Detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology*, 132(05). <https://doi.org/10.1017/S0031182005009595>
- Al Kufi, S. G. J. H., Emmerson, J., Rosenqvist, H., Garcia, C. M. M., Rios-Szwed, D. O., & Wiese, M. (2022). Absence of DEATH kinesin is fatal for *Leishmania mexicana* amastigotes. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07412-z>
- Andreeva, A., & Kutuzov, M. (2008). Protozoan protein tyrosine phosphatases. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1279-1295. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.003>
- Anwar, T., & Gourinath, S. (2016). Deep Insight into the Phosphatomes of Parasitic Protozoa and a Web Resource ProtozPhosDB. *PLOS ONE*, 11(12), e0167594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167594>
- Barford, D., Das, A. K., & Egloff, M.-P. (1998). THE STRUCTURE AND MECHANISM OF PROTEIN PHOSPHATASES: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27(1), 133-164. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.133>
- Beneke, T., Demay, F., Hookway, E., Ashman, N., Jeffery, H., Smith, J., Valli, J., Becvar, T., Myskova, J., Lestinova, T., Shafiq, S., Sadlova, J., Volf, P., Wheeler, R. J., & Gluenz, E. (2019). Genetic dissection of a *Leishmania*

- flagellar proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections. *PLOS Pathogens*, 15(6), e1007828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007828>
- Blum-Domínguez, S., Sánchez-Montes, D. S., Becker, I., García-Martínez, R., & Tamay-Segovia, P. (2024). First case of urban leishmaniasis in the Campeche State, Mexico. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 66, e58. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202466058>
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). (2022). *Guía para la atención médica de la Leishmaniasis en México*. Secretaría de Salud. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/763280/Guia_Atencion_Leishmaniasis_Mexico.pdf
- Choi, C. M., & Lerner, E. A. (2002). Leishmaniasis: Recognition and Management with a Focus on the Immunocompromised Patient. *American Journal of Clinical Dermatology*, 3(2), 91-105. <https://doi.org/10.2165/00128071-200203020-00003>
- De Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16(2), 99-109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- Descoteaux, A., & Turco, S. J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1455(2-3), 341-352. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(99\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(99)00065-4)
- Dey, R., Dagur, P. K., Selvapandiyan, A., McCoy, J. P., Salotra, P., Duncan, R., & Nakhasi, H. L. (2013). Live Attenuated *Leishmania donovani* p27 Gene Knockout Parasites Are Nonpathogenic and Elicit Long-Term Protective Immunity in BALB/c Mice. *The Journal of Immunology*, 190(5), 2138-2149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202801>
- Djeghader, A., Gotthard, G., Suh, A., Gonzalez, D., Scott, K., Chabriere, E., & Elias, M. (2013). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a high-affinity phosphate-binding protein endowed with

- phosphatase activity from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(10), 1143-1146.
<https://doi.org/10.1107/S1744309113024172>
- Escalona-Montaña AR, Pardavé-Alejandro D, Cervantes-Sarabia R, García-López P, Gutiérrez-Quiroz M, Gutiérrez-Kobeh L, Becker-Fauser I, Aguirre-García MM. *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. *Parasitol Res.* 2010 Jul;107(2):309-15. doi: 10.1007/s00436-010-1863-5. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20405143
- Escalona-Montaña, A. R., Ortiz-Lozano, D. M., Rojas-Bernabé, A., Wilkins-Rodriguez, A. A., Torres-Guerrero, H., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Gonzalez, R., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., & Aguirre-García, M. M. (2016). *Leishmania mexicana*: Promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology*, 143(11), 1409-1420.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016000949>
- Escalona-Montaña, A. R., Pérez-Montfort, R., Cabrera, N., Mondragón-Flores, R., Vélez-Ramírez, D. E., Gómez-Sandoval, J. N., Gutiérrez-Kobeh, L., Becker, I., & Aguirre-García, M. M. (2017). Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *Leishmania major*: Cloning and characterization. *Parasitology Open*, 3, e15. <https://doi.org/10.1017/pao.2017.14>
- Escalona-Montaña, A. R. (2018). *Estadio funcional de la proteína fosfatasa de Leishmania y análisis de su participación en la infección de macrófagos* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Escalona-Montaña, A. R., Zuñiga-Fabián, M., Cabrera, N., Mondragón-Flores, R., Gómez-Sandoval, J. N., Rojas-Bernabé, A., González-Canto, A., Gutiérrez-Kobeh, L., Pérez-Montfort, R., Becker, I., & Aguirre-García, M. M. (2021). Protein Serine/Threonine Phosphatase Type 2C of *Leishmania mexicana*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 641356.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.641356>
- Feng, X., Tran, K. D., Sanchez, M. A., Al Mezewghi, H., & Landfear, S. M.

- (2018). Glucose Transporters and Virulence in *Leishmania mexicana*. *mSphere*, 3(4), e00349-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00349-18>
- Fernandez-Lafuente R. Enzyme Immobilization. *Molecules*. 2023 Feb 1;28(3):1373. doi: 10.3390/molecules28031373. PMID: 36771039; PMCID: PMC9921461
- Fiebig, M., Kelly, S., & Gluenz, E. (2015). Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. *PLoS Pathogens*, 11(10), e1005186. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005186>
- Freitas-Mesquita, A. L., Fonseca-de-Souza, A. L., & Meyer-Fernandes, J. R. (2014). *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ecto-pyrophosphatase activity. *Experimental Parasitology*, 137, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.11.008>
- Galili-Kostin, B., Rajan, K. S., Ida Ashkenazi, Y., Freedman, A., Doniger, T., Cohen-Chalamish, S., Waldman Ben-Asher, H., Unger, R., Roditi, I., Tschudi, C., & Michaeli, S. (2025). TblncRNA-23, a long non-coding RNA transcribed by RNA polymerase I, regulates developmental changes in *Trypanosoma brucei*. *Nature Communications*, 16(1), 3697. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58979-w>
- Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2017). Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 25-40. <https://doi.org/10.2147/dddt.s146521>
- Gomez, M. A., Contreras, I., Hallé, M., Tremblay, M. L., McMaster, R. W., & Olivier, M. (2009). *Leishmania* GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases. *Science Signaling*, 2(90). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000213>
- González, J., Cornejo, A., Santos, M. R. M., Cordero, E. M., Gutiérrez, B., Porcile, P., Mortara, R. A., Sagua, H., Da Silveira, J. F., & Araya, J. E. (2003). A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 374(3), 647-656.

<https://doi.org/10.1042/bj20030215>

- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1027-1034. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00142-5)
- Hombach-Barrigah, A., Bartsch, K., Smirlis, D., Rosenqvist, H., MacDonald, A., Dingli, F., Loew, D., Späth, G. F., Rachidi, N., Wiese, M., & Clos, J. (2019). *Leishmania donovani* 90 kD Heat Shock Protein – Impact of Phosphosites on Parasite Fitness, Infectivity and Casein Kinase Affinity. *Scientific Reports*, 9(1), 5074. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41640-0>
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., ... Myler, P. J. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436-442. <https://doi.org/10.1126/science.1112680>
- Joshi, M., Jeoung, N. H., Popov, K. M., & Harris, R. A. (2007). Identification of a novel PP2C-type mitochondrial phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.108>
- Kaushal, R. S., Naik, N., Prajapati, M., Rane, S., Raulji, H., Afu, N. F., Upadhyay, T. K., & Saeed, M. (2023). *Leishmania* species: A narrative review on surface proteins with structural aspects involved in host–pathogen interaction. *Chemical Biology & Drug Design*, 102(2), 332-356. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14227>
- Lagorgette, L., Bogdanova, D. A., Belotserkovskaya, E. V., Garrido, C., & Demidov, O. N. (2024). PP2C phosphatases—Terminators of suicidal thoughts. *Cell Death & Disease*, 15(12), 919. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-07269-2>
- Landfear, S. M. (2022). New Vistas in the Biology of the Flagellum—*Leishmania* Parasites. *Pathogens*, 11(4), 447.

<https://doi.org/10.3390/pathogens11040447>

- Laskay, T., Van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 11(5), 210-214. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00075-1)
- Lillo, C., Kataya, A. R. A., Heidari, B., Creighton, M. T., Nemie-Feyissa, D., Ginbot, Z., & Jonassen, E. M. (2014). Protein phosphatases PP 2A, PP 4 and PP 6: Mediators and regulators in development and responses to environmental cues. *Plant, Cell & Environment*, 37(12), 2631-2648. <https://doi.org/10.1111/pce.12364>
- Musabyimana, J.-P., Musa, S., Manti, J., Distler, U., Tenzer, S., Ngwa, C. J., & Pradel, G. (2024). The *Plasmodium falciparum* histone methyltransferase SET10 participates in a chromatin modulation network crucial for intraerythrocytic development. *mSphere*, 9(11), e00495-24. <https://doi.org/10.1128/msphere.00495-24>
- Neves, R. F. C., Fernandes, A. C. S., Meyer-Fernandes, J. R., & Souto-Padrón, T. (2014). *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitology Research*, 113(8), 2961-2972. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3958-x>
- Norris-Mullins, B., Vacchina, P., & Morales, M. A. (2014). Catalytic activity of a novel serine/threonine protein phosphatase PP5 from *Leishmania major*. *Parasite (Paris, France)*, 21, 25. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014027>
- Orr, G. A., Werner, C., Xu, J., Bennett, M., Weiss, L. M., Takvorkan, P., Tanowitz, H. B., & Wittner, M. (2000). Identification of Novel Serine/Threonine Protein Phosphatases in *Trypanosoma cruzi*: A Potential Role in Control of Cytokinesis and Morphology. *Infection and Immunity*, 68(3), 1350-1358. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1350-1358.2000>
- Papadaki, A., Tziouvara, O., Kotopouli, A., Koumarianou, P., Doukas, A., Rios, P., Tardieux, I., Köhn, M., & Boleti, H. (2021). The *Leishmania donovani* LDBPK_220120.1 Gene₅₉ Encodes for an Atypical Dual Specificity

- Lipid-Like Phosphatase Expressed in Promastigotes and Amastigotes; Substrate Specificity, Intracellular Localizations, and Putative Role(s). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.591868>
- Pearson, R. D., & Sousa, A. D. Q. (1996). Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 22(1), 1-13. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.1.1>
- Rocha, V. P. C., Dacher, M., Young, S. A., Kolokousi, F., Efsthathiou, A., Späth, G. F., Soares, M. B. P., & Smirlis, D. (2020). *Leishmania* dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1 (DYRK1) is required for sustaining *Leishmania* stationary phase phenotype. *Molecular Microbiology*, 113(5), 983-1002. <https://doi.org/10.1111/mmi.14464>
- Rodríguez-Serrato, M. A., Salinas-Carmona, M. C., & Limón-Flores, A. Y. (2020). Immune response to *Leishmania mexicana*: The host–parasite relationship. *Pathogens and Disease*, 78(8), ftaa060. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa060>
- Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), 588-596. <https://doi.org/10.3855/jidc.6833>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shi, Y. (2009). Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell*, 139(3), 468-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Silva-Moreira, A. L., Serravite, A. M., Rios-Barros, L. V., De Menezes, J. P. B., Horta, M. F., & Castro-Gomes, T. (2025). New insights into the life cycle, host cell tropism, and infection amplification of *Leishmania* spp. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/iai.00123-25>
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J., & Reiner, N. E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology*, 9(2), R35.

- <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-r35>
- Soulat, D., & Bogdan, C. (2017). Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 8, 1838. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01838>
- Szöör, B. (2010). Trypanosomatid protein phosphatases. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 173(2), 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.017>
- Thaprawat, P., Wang, F., Chalasani, S., Schultz, T. L., Di Cristina, M., & Carruthers, V. B. (2025). *Toxoplasma gondii* PROP1 is critical for autophagy and parasite viability during chronic infection. *mSphere*, 10(3), e00829-24. <https://doi.org/10.1128/msphere.00829-24>
- Tonks, N. K. (2003). PTP1B: From the sidelines to the front lines! *FEBS Letters*, 546(1), 140-148. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00603-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00603-3)
- Vizcaíno-Castillo, A., Kotila, T., Kogan, K., Yanase, R., Como, J., Antenucci, L., Michelot, A., Sunter, J. D., & Lappalainen, P. (2024). *Leishmania* profilin interacts with actin through an unusual structural mechanism to control cytoskeletal dynamics in parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 300(3), 105740. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105740>
- Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2015). Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. *Nature Communications*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms9964>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00265

Matrícula: 2233804041

Participación de la proteína fosfatasa PP2C de Leishmania mexicana en la morfología del flagelo y en la patogenicidad del parásito.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 19 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
DR. AUGUSTO JOSE GONZALEZ CANTO
DRA. BERENICE GONZALEZ RETE
DRA. ISABEL CRISTINA CAÑEDA GUZMAN
DRA. ALMA REYNA ESCALONA MONTAÑO



SARAI CALDERON MORALES
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: SARAI CALDERON MORALES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DR. AUGUSTO JOSE GONZALEZ CANTO

VOCAL

DRA. BERENICE GONZALEZ RETE

VOCAL

DRA. ISABEL CRISTINA CAÑEDA GUZMAN

SECRETARIA

DRA. ALMA REYNA ESCALONA MONTAÑO