

# Análisis de la actividad proteolítica presente en el secretoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*

MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES, PEDRO J. ROMERO Y CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA

Laboratorio de Fisiología de Membranas

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas - Venezuela.

Correo-e: mariac.perez@ciens.ucv.ve

En el secretoma de la forma promastigote de diferentes especies de *Leishmania* han sido identificadas enzimas proteolíticas vinculadas con procesos infectivos, de evasión de la respuesta inmune y sobrevivencia del parásito. Entre estas enzimas destacan: la metaloproteasa, leishmanolisina, la cisteínproteasa B y una serinproteasa, estando las actividades de ellas dirigidas a la degradación de proteínas de la matriz extracelular en el proceso de invasión del promastigotes. Dada la poca información existente sobre las proteasas excretadas por amastigotes, nuestro interés se centra en profundizar en la identificación y caracterización de proteasas presentes en el secretoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*, que pudieran estar relacionadas con el desarrollo y el mantenimiento del parásito en el hospedador vertebrado. Nuestros resultados evidencian la presencia de actividad proteolítica en el secretoma de los amastigotes axénicos de *Leishmania mexicana*; observándose una clara diferencia con respecto a la actividad presente en el secretoma de promastigote de la misma especie. Mediante zimogramas hemos evidenciado en amastigotes 5 bandas proteolíticas aparentemente ausentes en promastigotes. El estudio de las proteasas identificadas en amastigotes permitirá evaluar su participación en mecanismos de mantenimiento y supervivencia del amastigote dentro de la vacuola fagolisosomal y su utilidad como blancos quimioterapéuticos contra la enfermedad.

## Introducción

La Leishmaniasis constituye una serie de enfermedades endémicas del continente Americano, África, el este de Europa, Asia central, India y Australia. Las enfermedades son transmitidas por vectores hematófagos (géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*), e incluyen una serie de manifestaciones clínicas que van desde infecciones tegumentarias leves (Leishmaniasis cutánea y difusa) hasta manifestaciones más severas como muco-cutánea y visceral (21).

Los representantes de este género se alternan principalmente entre dos estadios morfológicos. El promastigote, en el insecto vector y la forma amastigote, la cual se desarrolla y duplica dentro de la vacuola fagolisosomal del mamífero hospedador (1).

La transición entre ambientes intracelulares y extracelulares durante el ciclo de vida del parásito hace evidente la adaptación de estos a los cambios de pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes y de oxígeno (1,25). Algunos componentes celulares de los parásitos, caracterizados como factores de virulencia, contribuyen con esta adaptación y patogénesis en *Leishmania*. Permitiéndoles, de esta manera, invadir y establecer la infección en el huésped mamífero (11). Entre los principales factores de virulencias caracterizados en *Leishmania*

destacan: **1.** Los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), los cuales están involucrados en la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago mediante la inhibición de la óxido nítrico sintetasa y la proteína quinasa C (16,26). **2.** El lipofosfoglicano (LPG), conocido ligando de macrófagos, involucrado directamente en las primeras etapas de la infección influyendo sobre la respuesta inmunológica temprana del hospedero (4,10). **3.** Los proteofosfoglicanos (PPG), polipéptidos altamente glicosilados con O-glicosilaciones similares a las encontradas en el LPG y en la fosfatasa ácida (8). Aunque la función de estos PPG no es del todo clara, se especula que su larga cadena glicosilada podría desempeñar un papel clave en la unión a los receptores de los macrófagos, ya que la secreción de PPG por parte de los parásitos dentro de los macrófagos parece contribuir al mantenimiento de la vacuola fago-parasitaria (15). Y **4.** La proteína hidrofóbica kinetoplastídica de membrana (KMP-11), la cual se sabe está asociada a los LPG y presenta propiedades inmunoregulatorias sobre las células hospederas (9). Aunque los mecanismos de acción de estos cuatro factores de virulencia no están claramente definidos sobre el hospedero mamífero, hay evidencia de que estos modulan las interacciones entre el parásito y las células inmunitarias del huésped (20).

### *Proteasas de Leishmania como factores de virulencia*

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas (17), también han sido consideradas como importantes factores de virulencia en una gran variedad de parásitos patógenos (13). Además, se sabe que cumplen un papel primordial en la adaptación y sobrevivencia del parásito durante su ciclo de vida (12,13). Actualmente el estudio de los genomas de varias especies de *Leishmania* han permitido predecir que aproximadamente el 2% de cada uno de éstos codifican para enzimas proteolíticas (18). A pesar de esta importante proporción, aún se desconoce el papel biológico de muchas de ellas. En *Leishmania*, ya han sido identificadas representantes de las familias de las metalo (19), serin (2,3), aspartil (23), y cisteín proteasas, siendo estas últimas las más numerosas y más estudiadas (14,18). Entre las funciones biológicas de las proteasas estudiadas, cabe destacar su participación en procesos involucrados en la infección celular, migración, sobrevivencia intracelular y en la evasión de la respuesta inmune (13).

### *Proteasas excretadas por Leishmania*

En *Leishmania mexicana* se ha evidenciado que el cambio de temperatura de 35°C a 37°C cuando el parásito infecta al hospedador vertebrado, induce la secreción de una gran cantidad de proteínas (5). Entre ellas algunas peptidasas pertenecientes a las familias de las cisteín (13), serin (2,3) y metalo proteasas (19).

Dada la importancia de estas enzimas en procesos adaptativos y de sobrevivencia en varias especies de *Leishmania* (3,6), las proteasas excretadas se proponen como potenciales candidatas responsables del mantenimiento del parásito en la célula hospedera.

Una de las peptidasas excretadas y más estudiada en *Leishmania* es la leishmanolisina, también conocida como gp63, MSP y PSP. Esta endoproteasa perteneciente a la familia M8 comparte características con las metaloproteasas de mamíferos. Es dependiente de  $Zn^{2+}$  y es inhibida por quelantes de iones divalentes como EDTA (24). La gp63, es la proteína de superficie más abundante en promastigotes y se le adjudica un rol central en los procesos de invasión tanto en las células epiteliales del vector como en el hospedador vertebrado y evasión de la respuesta inmunológica del hospedador vertebrado dada su participación en el proceso de cambio de las glicoproteínas de superficie (VSG) (19).

Otra peptidasa excretada en *Leishmania* es la cisteín proteasa B (CP-B) (5). Esta enzima tipo cathepsina L, ha sido vinculada con procesos de virulencia e invasión celular (14,22). Recientemente, una serin proteasa ha sido evidenciada y caracterizada en los productos de excreción de *Leishmania donovani*, asociándose su actividad nuevamente con los procesos involucrados en la interacción parasito-hospedador (2,3).

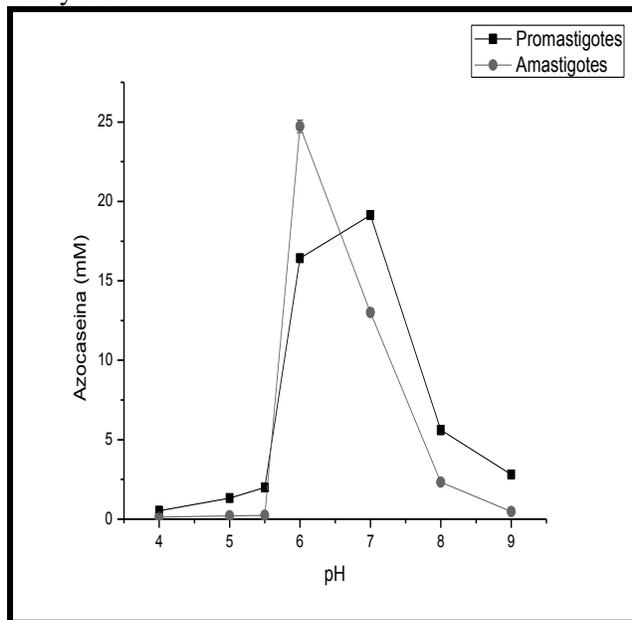
Diferentes proteasas han sido identificadas en los productos de excreción de varias especies de *Leishmania*, sin embargo, la mayoría de éstas han sido descritas únicamente en promastigotes. Conociéndose muy poco sobre proteasas excretadas por amastigotes, las cuales pudieran estar involucradas en el mantenimiento del parásito dentro de la vacuola fagolisosomal. Dada la importancia de las proteasas en los procesos de interacción parasito-hospedador, se hace interesante el estudio de la identificación y caracterización de la actividad proteolítica excretada por los amastigotes de *Leishmania*. Por tal motivo, nuestro interés está dirigido a la estudio de proteasas secretadas por amastigotes, utilizando como modelo amastigotes axénicos de diferentes especies de *Leishmania*.

### *Actividad proteolítica en amastigotes axénicos de Leishmania mexicana*

Con la finalidad de evidenciar la presencia de proteasas en el secretoma de amastigotes axénicos de *Leishmania mexicana* y evaluar las posibles diferencias con respecto a promastigotes de la misma especie, procedimos a determinar la actividad proteolítica de los productos de excreción de dichos amastigotes bajo distintas condiciones de pH. Para ello, se indujo la transformación de promastigotes en fase estacionaria a amastigotes mediante una metodología previamente descrita en nuestro laboratorio (7). Posteriormente, los parásitos transformados se colocaron en un medio apropiado para permitir su excreción durante 24 h. Pasado el tiempo, la presencia de actividad proteolítica en el sobrenadante contenido de los factores excretados fue determinada mediante la degradación de azocaseína y zimogramas en geles de poli(acrilamida co-polimerizados con gelatina al 0,1% evidenciándose dicha actividad mediante la tinción del gel con azul de Coomassie.

En la Figura 1, se muestra la degradación de la azocaseína, mediante la cuantificación del colorante azo a 440nm. Se puede observar una máxima actividad proteolítica a pH 6 en amastigotes, mientras que en promastigotes se obtiene a pH 7.

Este resultado, aparte de demostrar la presencia de actividad proteolítica en el secretoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*, evidencia diferencias en la actividad proteolítica excretada por ambos morfotipos del parásito a los distintos valores de pH ensayados.



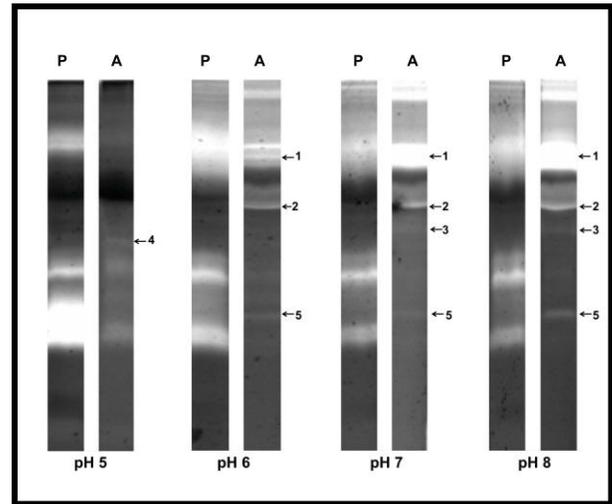
**Figura 1.** Actividad proteolítica de factores excretados por promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania mexicana*. Determinación de la actividad proteolítica mediante la degradación de la azocaseína a pH variable. Medio de reacción utilizado: 450µl (100mM buffer acetato/fosfato/Tris, 2mM, 20mg/ml azocaseína, DTE, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM ZnCl<sub>2</sub> y 0.1mM CaCl<sub>2</sub>) + 50µl extracto de excreción (3µg/µl). ■ Producto de excreción de promastigotes. ● Producto de excreción de amastigotes.

Por otra parte, mediante la utilización de zimogramas (Figura 2), evidenciamos un patrón diferencial de digestión a los diferentes pH investigados y entre los dos morfotipos. Así, en amastigotes de *Leishmania mexicana* se identifican 5 bandas proteolíticas no detectadas en promastigotes bajo nuestras condiciones de ensayo. Tales actividades se encuentran señaladas en la Figura 2 con flechas y números del 1-5.

Estas bandas exclusivas o preferencialmente expresadas en amastigotes, merecen particular atención pues ellas pudieran estar vinculadas con la sobrevivencia intracelular del amastigote dentro de la vacuola fagolisosomal.

En estos momentos nuestros esfuerzos están dirigidos a la identificación de dichas proteasas mediante técnicas de espectrometría de masa, con el fin de evaluar sus posibles participaciones en mecanismos de mantenimiento y supervivencia del

parásito. Lo que conduciría a establecer posibles nuevos blancos quimioterapéuticos que pudieran permitir el control de las diferentes manifestaciones clínicas generadas por esta familia de parásitos.



**Figura 2.** Actividad proteolítica de factores excretados por promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania mexicana*. Actividad proteolítica determinada mediante zimogramas en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizada con 0.1% de gelatina. Las actividades proteolíticas se desarrollaron a pH variable (5 - 8 pH) en presencia de condiciones favorables para la actividad de las diferentes familias de proteasas. Las flechas indican bandas de actividad no detectadas en promastigotes. Los números del 1-5 indican a las proteasas en un orden descendiente de masa molecular.

#### Referencias

1. Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G. y Mottram, J. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* **37**: 1063-1075.
2. Choudhury, R., Bhaumik, S., De, T. y Chakraborti, T. (2009). Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biochem.* **320**: 1-14.
3. Choudhury, R., Das, P., Bhaumik, S.K., De, T. y Chakraborti, T. (2010). In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**: 660-667.
4. Gaur, U., Showalter, M., Hickerson, S., Dalvi, R., Turco, S.J., Wilson, M.E. y Beverley, S.M. (2009). *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. *Exp. Parasitol.* **122**: 182-191.

5. **Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. y Olivier, M.** (2011). Temperature-Induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. **Plos. One. 6:** 1-10.
6. **Hernández, A.** (1983). Leishmanial excreted factors and their possible biological role. **Ciba Found. Symp. 99:** 138-156.
7. **Hernández-Chinea, C.** (2007). *Leishmania amazonensis*: humoral response to amastigote excreted antigens in murine Leishmaniasis. **Exp. Parasitol. 116:** 492-496.
8. **Ilg, T.** (2000). Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitol. Today 16:** 489-497.
9. **Jardim, A., Funk, V., Caprioli, R. y Olafson, R.** (1995). Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* Kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. **Biochem. J. 305:** 307-313.
10. **Liu, D., Kebaier, C., Pakpour, N., Capul, A.A., Beverley, S.M., Scott, P. y Uzonna, J.E.** (2009). *Leishmania major* phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions. **Infect. Immun. 77:** 3272-3283.
11. **Matlashewski, G.** (2001). *Leishmania* infection and virulence. **Med. Microbial Immunol. 190:** 37-42.
12. **McKerrow, J.** (1989). Parasite proteases. **Exp. Parasitol. 68:** 111-115.
13. **McKerrow, J., Caffret, C., Kelly, B., Loke, P. y Sajid, M.** (2006). Proteases in parasitic diseases. **Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis. 1:** 497-536.
14. **Mottram, J., Coombs, G. y Alexander, J.** (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Curr. Opin. Microbiol. 7:** 375-381.
15. **Peters, C., Stierhof, Y.D. y Ilg, T.** (1997). Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes cause vacuole formation in macrophages. **Infect. Immun. 65:** 783-786.
16. **Proudfoot, L., O'Donnell, C.A. y Liew, F.Y.** (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. **Eur. J. Immunol. 25:** 745-750.
17. **Rao, M., Tanksale, A., Ghatge, M. y Deshpande, V.** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:** 597-635.
18. **Sajid, M. y McKerrow, J.H.** (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol. 120:** 1-21.
19. **Santos, A., Branquinha, M.H y D'Avila-Levy, C.M.** (2006). The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An. Acad. Bras. Cienc. 78:** 687-714.
20. **Silva-Almeida, M., Acácio-Pereira, B., Ribeiro-Guimarães, M. y Alves, C.** (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & Vectors 5:** 160.
21. **Singh, S. y Sivakumar, R.** (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J. Postgrad. Med. 49:** 55-60.
22. **Swenerton, R., Zhang, S., Sajid, M., Medzihrasdzky, K., Ccraik, C. Kelly, B. y McKerrow, J.** (2011). The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. **J. Biol. Chem. 286:** 429-440.
23. **Valdivieso, E., Dagger, F. y Rascón, A.** (2007). *Leishmania mexicana*: Identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. **Exp. Parasitol. 116:** 77-82.
24. **Yao, C.** (2010) Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? **Infect. Immun. 78:** 22-31.
25. **Zilberstein, D. y Shapira, M.** (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol. 48:** 449-470.
26. **Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D.R., Denny, P.W., Almeida, I.C., Smith, D.F., Turco, S.J., Ferguson, M.A. y Beverley, S.M.** (2003). Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. **J. Biol. Chem. 278:** 44708-44718.