



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**Metabolismo de hemo en *Leishmania major*:
caracterización de su biosíntesis a lo largo
del ciclo de vida del parásito**

Director de Tesis

Dr. José María Pérez-Victoria Moreno de Barreda

Memoria presentada por la Licenciada **Lina María Orrego Zapata** para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada en el Programa de
Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular

Junio 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Lina María Orrego Zapata
ISBN: 978-84-1117-321-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74721>

INDICE

1. Introducción

1. Leishmaniasis
 - 1.1 Definición y epidemiología
 - 1.2 Agente etiológico
 - 1.3 Manifestaciones clínicas
 - 1.4 Tratamiento farmacológico y alternativas terapéuticas
 - 1.5 Morfología y ciclo de vida de *Leishmania* spp.
 - 1.6 Interacción *Leishmania*-insecto vector
 - 1.7 Interacción *Leishmania*-macrófago
 - 1.8 Particularidades bioquímicas, celulares y moleculares de *Leishmania* spp.
 - 1.8.1 Organización genómica y regulación de la expresión génica
 - 1.8.2 Kinetoplasto
 - 1.8.3 Metabolismo
- 2 El grupo hemo
 - 2.1 Importancia del hemo y su homeostasis
 - 2.2 Biosíntesis del grupo hemo
 - 2.2.1 Coproporfirinógeno Oxidasa (CPOX)
 - 2.2.2 Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX)
 - 2.2.3 Ferroquelatasa (FECH)
 - 2.3 Degradación del hemo
 - 2.4 Tráfico del grupo hemo y sus intermediarios en mamíferos
 - 2.5 Metabolismo y tráfico del grupo hemo en parásitos tripanosomátidos
 - 2.5.1 Auxotrofia para hemo
 - 2.5.2 Requerimiento de hemo
 - 2.5.3 Tráfico de hemo
 - 2.5.3.1 *Leishmania* spp.
 - 2.5.3.2 *Trypanosoma brucei*
 - 2.5.3.3 *Trypanosoma cruzi*
 - 2.5.4 Síntesis de hemo en *Leishmania* spp.
 - 2.6 Metabolismo del grupo hemo como blanco terapéutico contra parásitos

2. Objetivos

3. Materiales y Métodos

- 3.1. Cultivo y manipulación de *Leishmania major*
 - 3.1.1. Cultivo *in vitro*
 - 3.1.2. Recuento de promastigotes
 - 3.1.3. Transfección de *Leishmania major* mediante electroporación
 - 3.1.3.1. Método de electroporación con tampón HBS
 - 3.1.3.2. Método de electroporación con el sistema Amaxa[®] Nucleofector[®]
 - 3.1.4. Purificación de promastigotes metacíclicos
- 3.2. Cepas de bacterias, cultivo y manipulación
 - 3.2.1. Cepas bacterianas
 - 3.2.2. Cultivo
 - 3.2.3. Lisogenización de cepas de *E. coli* mutantes SASX38 y VS200
 - 3.2.4. Preparación de bacterias competentes
 - 3.2.4.1. Bacterias competentes por choque térmico
 - 3.2.4.2. Bacterias electro-competentes
 - 3.2.5. Transformación de bacterias
 - 3.2.5.1. Transformación de bacterias competentes por choque térmico
 - 3.2.5.2. Transformación de bacterias electro-competentes por electroporación
- 3.3. Levaduras, cultivo y manipulación
 - 3.3.1. Cepas de levaduras y cultivo
 - 3.3.2. Transformación de levaduras de *S. cerevisiae*
- 3.4. Ensayos de complementación funcional en sistemas heterólogos de los genes *cpox*, *ppox* y *fech* de *L. major*
 - 3.4.1. Complementación funcional de LmCPOX en mutante de *S. cerevisiae* $\Delta hem13$
 - 3.4.2. Complementación funcional de LmPPOX en mutante de *E. coli* $\Delta hemG$
 - 3.4.3. Complementación funcional de LmFeCH en mutante de *E. coli* $\Delta hemH$
- 3.5. Localización subcelular de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major* mediante microscopia

- 3.5.1. Generación de constructos para la expresión de proteínas de fusión fluorescentes
- 3.5.2. Marcaje *in situ* de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major* mediante CRISPR-Cas9
- 3.5.3. Microscopía de fluorescencia
- 3.6. Generación de líneas de *L. major* mutantes nulas para genes CPOX, PPOX y FeCH mediante el sistema CRISPR-Cas9
 - 3.6.1. Estrategia CRISPR-Cas9 para generación de líneas mutantes de *L. major* CPOX^{-/-} y FeCH^{-/-}
 - 3.6.1.1. Generación de línea de *L. major* con expresión estable de la proteína Cas9
 - 3.6.1.2. Construcción de plásmidos pLS7-CPOX y pLS7-FeCH
 - 3.6.1.3. Deleción de los genes *cpoX* y *fech* de *L. major*
 - 3.6.2. Estrategia CRISPR-Cas9 para generación de línea de *L. major* PPOX^{-/-}
 - 3.6.2.1. Generación y validación de la línea de *L. major* con expresión constitutiva de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa
 - 3.6.2.1.1. Deleción del gen *LmRos3* de *L. major*
 - 3.6.2.1.2. Marcaje *in situ* de la proteína PF16 de *L. major*
 - 3.6.2.2. Deleción del gen *ppox* de *L. major*
- 3.7. Caracterización de líneas de *L. major* LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-} y LmFeCH^{-/-}
 - 3.7.1. Obtención de ADN genómico
 - 3.7.2. Análisis de ADN genómico mediante PCR
 - 3.7.3. Análisis de ADN genómico mediante Southern blot
 - 3.7.4. Análisis de ARNm mediante RT-qPCR
 - 3.7.5. Ensayos de funcionalidad de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major*
 - 3.7.5.1. Complementación genética
 - 3.7.5.2. Evaluación de actividad enzimática en promastigotes de *L. major*
- 3.8. Generación de líneas de *L. major* bioluminiscentes
- 3.9. Cultivos celulares de macrófagos e infección *in vitro* por *L. major*
 - 3.9.1. Cultivo y diferenciación de monocitos de la línea tumoral THP-1

- 3.9.2. Obtención, cultivo y diferenciación de macrófagos murinos derivados de médula ósea
- 3.9.3. Infección *in vitro* de macrófagos por *L. major*
- 3.9.4. Inhibición de síntesis de hemo en macrófagos infectados por *L. major*
- 3.10. Infecciones *in vivo*
 - 3.10.1. Modelos murinos de leishmaniosis cutánea
 - 3.10.1.1. Modelo murino en ratones BALB/c
 - 3.10.1.2. Modelo murino en ratones C57BL/6
 - 3.10.2. Infección artificial de *Phlebotomus perniciosus*

4. Resultados

Capítulo I: Captación de porfirinas precursoras de hemo en *L. major*

1. *Leishmania* puede utilizar precursores de hemo para garantizar su supervivencia y proliferación en los estadios de promastigote y amastigote
2. Papel del transportador ABCB6 del macrófago en el rescate de hemo por *L. major*

Capítulo II: Caracterización de la enzima coproporfirinógeno oxidasa de *L. major*

1. *L. major* contiene un gen que codifica para una enzima tipo coproporfirinógeno oxidasa tipo HemF
2. El gen *lmcpx* codifica una enzima coproporfirinógeno oxidasa funcional
3. La LmCPOX de *L. major* es una enzima citosólica
4. Generación de parásitos de *L. major* mutantes nulos para el gen *lmcpx*
5. Actividad de la enzima LmCPOX en promastigotes de *L. major*
6. Efecto de los niveles de la enzima LmCPOX en el desarrollo de las formas promastigote y amastigote de *L. major*
7. La LmCPOX no afecta al proceso de metaciclogénesis *in vitro*
8. Virulencia de los parásitos LmCPOX^{-/-} en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.

Capítulo III: Caracterización de la enzima protoporfirinógeno oxidasa de *L. major*

1. *L. major* presenta una enzima PPOX tipo HemG
2. La proteína LmPPOX de *L. major* es una enzima funcional
3. LmPPOX no es inhibida por los herbicidas lactofen y acifluorfen

4. La enzima PPOX se localiza en una estructura subcelular cerca a la mitocondria del parásito
5. Obtención de parásitos de *L. major* mutantes nulos para el gen *ppox*
6. El nivel de expresión de la proteína PPOX no afecta al desarrollo de las formas promastigote y amastigote de *L. major*.
7. Virulencia de los parásitos LmPPOX^{-/-} en un modelo murino de leishmaniosis cutánea

Capítulo IV: Caracterización de la enzima ferroquelatasa de *L. major*

1. El genoma de *L. major* contiene un gen tipo ferroquelatasa con características procariotas
2. El gen *lmfech* codifica una proteína ferroquelatasa funcional
3. La enzima FeCH de *L. major* está localizada en la mitocondria del parásito
4. Generación de parásitos de *L. major* mutantes nulos para el gen *lmfech*
5. Efecto de los niveles de LmFeCH en el crecimiento de las formas promastigote y amastigote de *L. major*
6. Virulencia de los parásitos LmFeCH^{-/-} en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.
7. Efecto de los niveles de LmFeCH en el desarrollo de la forma infectiva de *L. major* en el insecto vector

5. Discusión

6. Conclusiones

7. Referencias

8. Anexos

RESUMEN

Una forma racional de buscar nuevos fármacos frente a las enfermedades parasitarias consiste en explotar las diferencias bioquímicas entre el parásito y el hospedador humano. Una de estas diferencias en los parásitos tripanosomátidos como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. es su incapacidad de sintetizar hemo. La auxotrofia para hemo de los parásitos tripanosomátidos, y por lo tanto su absoluta dependencia para adquirirlo de una fuente exógena, ya fue considerada como su “Talón de Aquiles” hace más de 80 años. Esta auxotrofia se debe a que, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los organismos aeróbicos, los parásitos tripanosomátidos han perdido completamente las enzimas de su ruta de síntesis durante la evolución de los kinetoplastidos.

A diferencia de *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. ha rescatado por transferencia horizontal desde γ -proteobacterias los genes que codifican para las tres últimas enzimas de la ruta de síntesis de hemo: coproporfirinógeno oxidasa (CPOX), protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) y ferroquelatasa (FeCH). Ninguno de los genes que codifican para las primeras cinco proteínas de la ruta están presentes en los genomas de las diferentes especies de *Leishmania* secuenciadas hasta la fecha, y tampoco se ha detectado actividad enzimática relacionada con la producción de porfirinas. Por lo tanto, la presencia de los últimos tres genes es sorprendente y plantea preguntas acerca de su funcionalidad, puesto que *Leishmania* no puede producir porfirinas precursoras de la ruta de síntesis de hemo. Se ha sugerido que los amastigotes de *Leishmania* podrían tomar el precursor CPIII del citosol de la célula hospedadora para la formación de su propio hemo utilizando las últimas tres enzimas de la ruta, o que inclusive podrían hacer uso de ellas para reparar el hemo del macrófago parcialmente degradado o químicamente modificado en el ambiente ácido de la vacuola parasitófora. Por lo tanto, se ha propuesto que las proteínas involucradas con la síntesis de hemo *de novo* en *Leishmania* podrían constituir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis.

En este trabajo, utilizando diferentes inhibidores de la ruta de síntesis de hemo en los macrófagos, hemos demostrado que los amastigotes intracelulares son capaces de utilizar no solo hemo sintetizado por el macrófago sino también sus porfirinas precursoras, probablemente CPIII, para la síntesis de su propio hemo. Lo anterior demuestra la funcionalidad de la ruta parcial de síntesis de hemo en *L. major*.

Para estudiar a profundidad el papel del hemo sintetizado por *L. major* a lo largo de su ciclo de vida, se evaluó la funcionalidad y la esencialidad de los genes que codifican para las tres últimas enzimas de la ruta presentes en este parásito: LmFeCH, LmPPOX y LmFeCH. Se demostró mediante ensayos de complementación funcional que los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfech* codifican proteínas con actividad enzimática *in vivo*, puesto que su expresión heteróloga en cepas de bacterias y/o levaduras auxótrofas para hemo, fueron capaces de rescatar su crecimiento en ausencia de este metabolito.

También se determinó la localización celular de las proteínas mediante marcaje *in situ* con una proteína fluorescente utilizando la estrategia CRISPR-Cas9. Mientras que en eucariotas superiores las tres enzimas son mitocondriales, sólo la LmFeCH de *L. major* se encuentra en la mitocondria de los parásitos mientras que LmCPOX es una proteína citosólica y la LmPPOX se localiza en estructuras subcelulares aun no identificadas cerca a la mitocondria.

La obtención de parásitos mutantes nulos para los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfech* mediante CRISPR-Cas9 indicó que estas proteínas no eran esenciales para *L. major*, al menos en el estadio extracelular cultivado *in vitro*. La infección artificial de flebótomos con parásitos mutantes nulos para FeCH, la última enzima de la ruta, demostró que la síntesis de hemo *de novo* no es esencial para el desarrollo de *L. major* en el insecto vector. Por otra parte, la replicación intracelular de estos mutantes en macrófagos cultivados *in vitro* fue significativamente menor en comparación con los parásitos control, sugiriendo la importancia de estas proteínas en el desarrollo del estadio amastigote de *L. major*. Sin embargo, los parásitos de *L. major* que carecían de los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfech* produjeron enfermedad de manera similar a los parásitos control en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.

En conclusión, en el presente trabajo hemos demostrado que los amastigotes intracelulares y los promastigotes extracelulares de *L. major* pueden usar precursores de hemo, sintetizados por el macrófago o adicionados al medio de cultivo, para sintetizar su propio hemo. Sin embargo, esta actividad no es esencial para el desarrollo del ciclo de vida de *L. major* en el hospedero mamífero ni en el insecto vector, al menos bajo nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, las proteínas involucradas en la síntesis de hemo en *Leishmania* no representan dianas farmacológicas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Introducción

1. Leishmaniasis

1.1 Definición y epidemiología

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades causadas por parásitos protozoos del género *Leishmania*, transmitido por insectos dípteros del género *Lutzomyia* para el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* para el Viejo Mundo, infectados con la forma extracelular del parásito. Cerca de 20 especies de *Leishmania* son patógenas para el humano, las cuales son transmitidas por alrededor de 93 especies de insectos vectores (1). La leishmaniasis presenta un escenario epidemiológico complejo, en donde la transmisión de la enfermedad se encuentra influenciada por la distribución geográfica de los insectos vectores y su capacidad para permitir el desarrollo de los parásitos en su tracto digestivo (2). La transmisión de la enfermedad presenta además dos escenarios fundamentales: a) un ciclo zoonótico que involucra la presencia de animales silvestres y domésticos que actúan como reservorios del parásito, tales como perros, roedores, monos, marsupiales, y b) un ciclo antroponótico, prevalente en la India y Sudán, en el que el hombre es la única fuente de infección para el insecto vector (3,4).

La leishmaniasis presenta una distribución global con importantes focos de infección en Centro y Suramérica, sur de Europa, norte y este de África, Medio Oriente e India, siendo una enfermedad endémica en regiones tropicales y subtropicales de 98 países alrededor del mundo, exceptuando la Antártida (Figura 1.1). Se calcula una prevalencia mundial de 12 millones de casos, una incidencia anual de aproximadamente dos millones de casos y se estima que cerca de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad, representando un problema de salud pública principalmente en países en vía de desarrollo (1). No obstante, los datos oficiales subestiman los casos de la enfermedad ya que en muchos países no es una enfermedad de notificación obligatoria o a menudo no se diagnostica, especialmente en zonas rurales con difícil acceso a servicios médicos (5). Más del 90% de los casos de leishmaniasis visceral (LV) están focalizados en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur, mientras que la leishmaniasis cutánea (LC) presenta una distribución más amplia con un 70-75% de los casos presentes en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Sudán del Norte y Siria (Figura 1.1) (6).

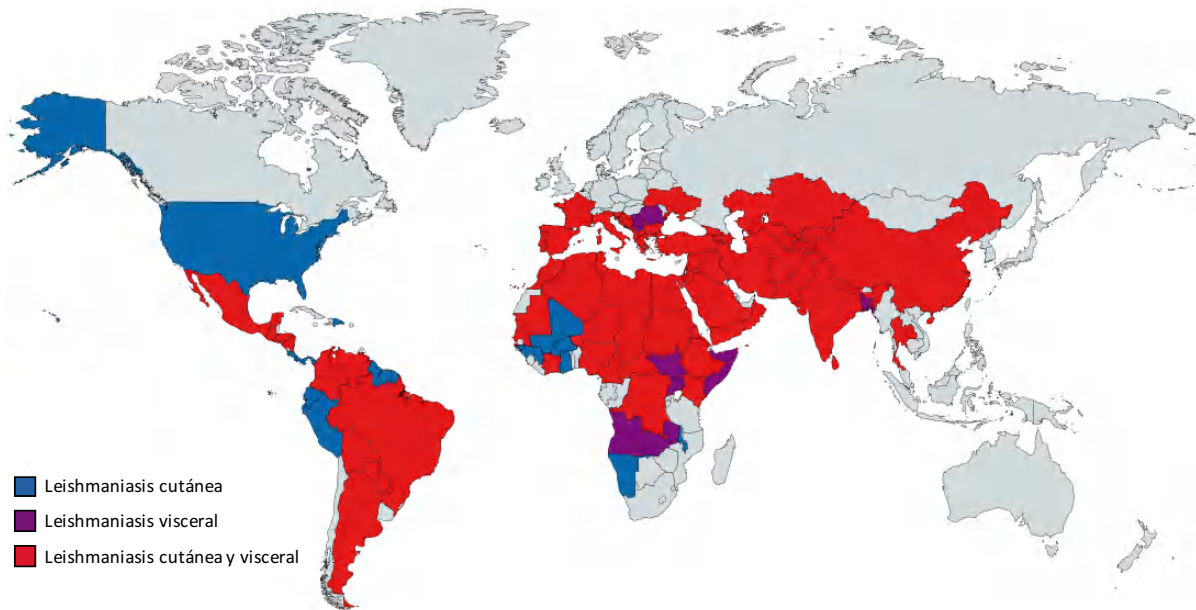


Figura 1.1. Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea y visceral. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), año 2017. Mapa creado con mapchart.net.

La leishmaniasis es endémica en la mayoría de los países de la cuenca mediterránea, lo cual ha sido asociado a varios factores como la importación de especies de *Leishmania* a través del creciente flujo de turistas y migrantes, cambios climáticos y deforestación que modifican el hábitat y la distribución de los insectos vectores, y el incremento en el número de personas inmunodeprimidas especialmente pacientes VIH positivos (7). Se han descrito casos de transmisión autóctona de la enfermedad en Portugal, España, Francia, Italia, Grecia, Malta, Chipre, Croacia, Albania, Bulgaria y Turquía, y un aumento en los casos de co-infección *Leishmania*/VIH principalmente en Francia, Italia, Portugal y España, convirtiendo la leishmaniasis en la tercera enfermedad parasitaria oportunista más frecuente después de la toxoplasmosis y la criptosporidiosis (8,9). En Europa sólo dos especies de *Leishmania* son endémicas, *L. infantum* causante de LC y LV en donde el perro doméstico es el principal reservorio del parásito, y *L. tropica* que genera casos esporádicos de infección cutánea de transmisión antroponótica principalmente en Grecia. Recientemente se han descrito casos de LV y LC causada por *L. donovani* en Chipre, mientras que en Turquía se han notificado casos de LC y LV causados por *L. major* y *L. donovani*, respectivamente (8).

En España la leishmaniasis es considerada una zoonosis endémica. La especie detectada con mayor frecuencia tanto en las formas cutánea como visceral es *L. infantum*, siendo el perro domestico su principal reservorio, aunque se han identificado nuevos

reservorios como gatos, roedores y otras especies silvestres como las liebres, responsables del brote de leishmaniasis descrito en el 2009. Los flebótomos *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, distribuidos por todo el territorio peninsular, son los responsables de la transmisión de *L. infantum*, por lo que el riesgo de infección puede estar presente en cualquier área geográfica en la que haya circulación del parásito (10,11). Desde el año 1997, la leishmaniasis es una Enfermedad de Declaración Obligatoria sujeta a vigilancia epidemiológica en todas las Comunidades Autónomas. En el periodo 2009 a 2013 se reportó en la Comunidad de Madrid el brote más grande de leishmaniasis humana del que se tenga conocimiento en España y en Europa, el cual afectó principalmente los municipios de Fuenlabrada y Leganés (12). En los años previos al brote la tasa de incidencia en estos municipios era inferior a 1 caso por 100.000 habitantes, pero desde el año 2009 estas tasas aumentaron hasta alcanzar 31 casos por cada 100.000 habitantes en el municipio de Fuenlabrada y 27 casos por cada 100.000 habitantes en el municipio de Leganés, en la temporada epidemiológica 2011-2012. Globalmente, en la temporada epidemiológica 2009-2012, se reportaron en la comunidad de Madrid 542 casos de leishmaniasis de los cuales el 35.9% correspondieron a LV (8 casos por cada 100.000 habitantes) y 64.1% a LC (14.2 casos por cada 100.000 habitantes) (12,13). A pesar de que el brote se encuentra controlado y el reporte de casos de leishmaniasis a nivel nacional muestran una tendencia decreciente, la enfermedad sigue siendo un amenaza latente, como lo demuestra el reciente brote comunitario en un municipio de la Comunidad Valenciana (14,15). En España la población canina con serología positiva para *L. infantum* se encuentra distribuida por toda la geografía nacional, con porcentajes de seroprevalencia que oscilan entre 1.6% en la región noroeste y 34,6% en el sur del país (16). Lo anterior, sumado a los elevados porcentajes (39%) de flebótomos infectados, la ocurrencia de transmisión periurbana y rural, y la creciente ola de inmigración procedente de países endémicos, incrementa el porcentaje de la población susceptible y la probabilidad de exposición al parásito (17).

1.2 Agente etiológico

La leishmaniasis es causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 53 especies de *Leishmania*, de las cuales 31 especies son parásitos de mamíferos y 20 son patógenas para el humano. Todas las

especies de *Leishmania* son heteroxenas, ya que son capaces de colonizar dos hospedadores (18).

Los parásitos de *Leishmania* pertenecen al Reino Protista (Haeckel, 1866), Clase Kinetoplastea (Vickerman, 1976), Subclase Metakinetoplastina (Vickerman, 2004), Orden Trypanosomatida (Kent, 1880), Familia Trypanosomatidae (Döflein, 1901) Subfamilia Leishmaniinae (Maslov y Lukeš 2012), y Género *Leishmania* (Ross, 1903). Las 20 especies de *Leishmania* que infectan humanos presentan una distribución mundial, y están presentes en zonas tropicales y subtropicales de América, Europa, Asia, África, e informes recientes parecen demostrar su presencia en Australia (18). En 1987 Lainson y Shaw presentaron un sistema de clasificación para las especies de *Leishmania*, dividiendo el género en dos subgéneros dependiendo del segmento del tracto digestivo del insecto colonizado por los parásitos, la cual fue soportada posteriormente por análisis filogenéticos. El subgénero *Leishmania* (*Viannia*) agrupa las especies que se multiplican en la zona peripilórica de los insectos vectores, mientras que las especies del subgénero *Leishmania* (*Leishmania*) se multiplican en la región suprapilórica (18,19). Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación de acuerdo a datos moleculares obtenidos mediante análisis isoenzimáticos y genéticos, que dividen las especies de *Leishmania* en dos linajes (o secciones) filogenéticos principales denominados Euleishmania y Paraleishmania (Figura 1.2).

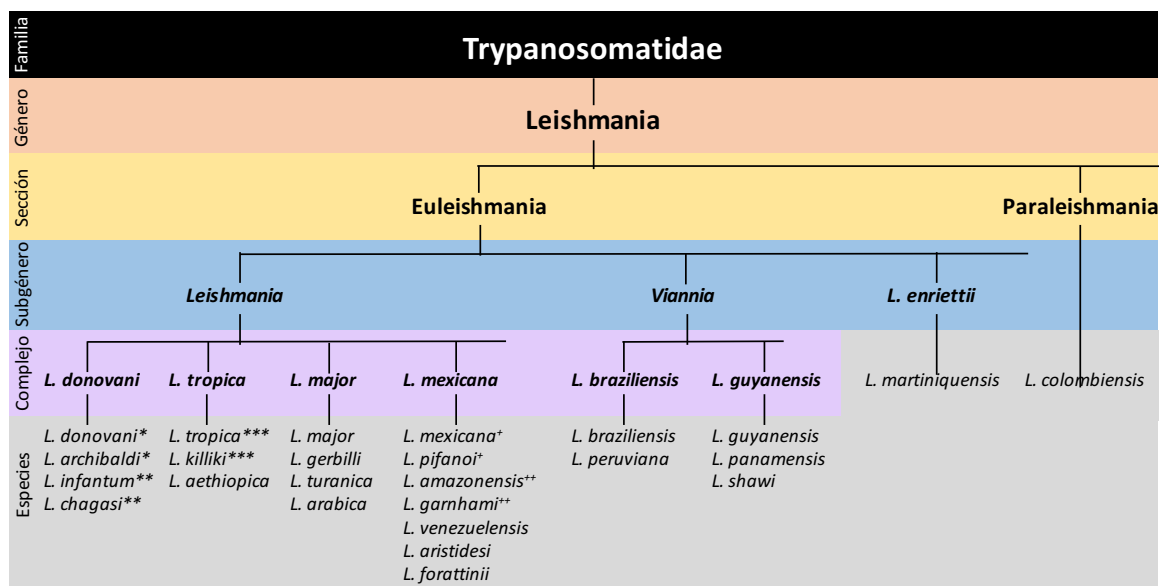


Figura 1.2. Clasificación de las especies de *Leishmania*. Se incluyen todas las especies pertenecientes a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Los símbolos indican nombres de especies que son sinónimos de otra descrita anteriormente. No se han incluido las especies pertenecientes a los subgéneros

Sauroleishmania y del complejo de *L. enriettii* no patógenas para el humano, solo la especie *L. martiniquensis* reportada en el año 2014 como agente causante de leishmaniasis humana. Tampoco se muestran las especies la sección Paraleishmania, excepto *L. colombiensis*, la única especie patógena para humanos de este grupo.

La sección Euleishmania comprende cuatro subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y complejo de *L. enriettii*, mientras que la sección Paraleishmania incluye las especies que no se agrupan dentro de los anteriores subgéneros y su clasificación como parásitos de *Leishmania* aun no está clara (Figura 1.2). De igual manera la clasificación del subgénero *Sauroleishmania* aún es cuestionable, ya que al agrupar especies de *Leishmania* que infectan reptiles de poca importancia médica, la información disponible es escasa (18,20). La mayoría de las especies de importancia médica están incluidas dentro de los subgéneros *Viannia*, restringido al Nuevo Mundo, y *Leishmania* presente tanto en el Viejo como en el Viejo Mundo.

1.3 Manifestaciones clínicas

Dependiendo de la capacidad de inmunoevasión, sensibilidad a la temperatura y tropismo tisular de la especie de *Leishmania* responsable de la infección y de las interacciones con el sistema inmunitario del individuo infectado, los parásitos pueden causar infecciones localizadas en la piel o nódulos linfáticos adyacentes, o migrar a múltiples sitios en la piel, a la mucosa nasal u orofaríngea, hígado, bazo, médula ósea o nódulos linfáticos distantes, llevando al desarrollo de un amplio espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad con distinto grado de severidad (21)

La **leishmaniasis cutánea localizada (LCL)**, también denominada “botón de Oriente”, es la forma más común y menos grave de la enfermedad, que a pesar de no ser mortal conduce a estigmatización social y efectos psicológicos en los pacientes infectados. Las lesiones suelen desarrollarse en el sitio de picadura, principalmente en áreas de piel expuestas a los insectos vectores, como la cara, el cuello y las extremidades (Figura 1.3A). En el Viejo Mundo, la LCL se manifiesta inicialmente como una pápula indolora que progresa durante semanas o meses hasta convertirse en una lesión seca indurada o hiperqueratósica, similar a una verruga, que suelen cicatrizar con el tiempo dejando pigmentaciones permanentes en la piel. En el Nuevo Mundo, la LCL presenta menos capacidad autorresolutiva y las pápulas iniciales evolucionan a lesiones ulcerativas

con bordes elevados y bien definidos, que pueden presentar sobreinfección bacteriana o fúngica, llevando a linfadenitis localizada o adenopatía linfática (1). En el Viejo Mundo, las especies causantes de LCL son *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. infantum*, mientras que en el Nuevo Mundo las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* y *L. guyanensis* son las responsables de la manifestación cutánea (21).

Existen variantes de la leishmaniasis cutánea que se correlacionan con el grado de activación del sistema inmunitario celular de los pacientes, lo que supone que las condiciones de inmunosupresión constituyen un factor de riesgo importante. La **leishmaniasis cutánea difusa (LCD)**, se caracteriza por la aparición de múltiples pápulas y nódulos no ulcerados que semejan la lepra lepromatosa, donde grandes extensiones de dermis se encuentran infiltradas con parásitos como consecuencia de una respuesta inmunológica celular anérgica. La **leishmaniasis cutánea diseminada (LCDs)**, frecuente en América Latina, se caracteriza por un elevado número de lesiones de tipo acneiforme, papular, nodular y ulcerado, en las cuales se encuentran un bajo número de parásitos (Figura 1.3B). En esta forma clínica también es frecuente el compromiso mucoso, el cual ocurre en un 44% de los casos de LCDs. La **leishmaniasis recidiva (LR)** suele presentarse después de la curación clínica de lesiones cutáneas causadas por *L. tropica* y se manifiesta como nuevas lesiones que rodean la cicatriz antigua, fuertemente infiltradas por linfocitos. Se desarrolla en periodos de tiempos muy variables que puede ir de meses a años y su ocurrencia es rara en el Nuevo Mundo (22).

La **leishmaniasis mucocutánea (LMC)** ocurre meses o años después del inicio de la LC como resultado de la diseminación linfática o hematogena de los parásitos y una respuesta inmunitaria hiperactiva frente a estos. La mayoría de los casos son causados por especies del subgénero *Viannia* presentes en el Nuevo Mundo, y se caracterizan por una destrucción extensiva de las mucosas de la nariz, cavidad bucal y región rinofaríngea que llevan a la perforación del tabique nasal y lesiones inflamatorias que pueden obstruir la faringe o laringe (Figura 1.3C). Además de producirse una desfiguración notable, las lesiones mucocutáneas incrementan el riesgo de infecciones secundarias e imposibilidad para comer, lo que lleva a una significativa mortalidad (23,24).

La **leishmaniasis visceral (LV)**, también conocida como kala-azar, representa la forma más grave de la enfermedad y se caracteriza pérdida de peso, fiebre, pancitopenia e hipergammaglobulinemia (Figura 1.3D). La diseminación de los parásitos induce a la

acumulación de las células del sistema mononuclear fagocítico dentro de los órganos infectados y la consecuente hiperplasia de las células reticuloendoteliales, llevando a esplenomegalia y hepatomegalia, signos clásicos de esta forma de la enfermedad. En ausencia de tratamiento, la LV es mortal, debido a fallos multiorgánicos, trombocitopenia e infecciones secundarias. Es causada por *L. donovani* en India, Asia y África, y por *L. infantum/L. chagasi* en la región Mediterránea, Asia y Sur América (1,21).

La **leishmaniasis dérmica post-kala azar (LDPK)** se desarrolla después de la resolución de una infección visceral causada por la especie *L. donovani*, en donde los parásitos persisten en la piel después del tratamiento. Se caracteriza por lesiones cutáneas maculares hipopigmentadas o erupciones eritematosas maculopapulares en el área prioral y el tronco, que pueden extenderse gradualmente a otras regiones del cuerpo (Figura 1.3E). Esta complicación cutánea ocurre en el 5-10% de los casos de LV en Asia y se desarrolla después de 2-3 años del tratamiento, mientras que en el este de África la LDPK se observa en el 50% de los casos después de un año de tratamiento (22,24).



Figura 1.3. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. Pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (A) y diseminada (B), leishmaniasis mucocutánea (C), leishmaniasis visceral (D) y leishmaniasis dérmica post-kala azar (E). Imágenes tomadas de (21,22).

1.4 Tratamiento farmacológico y alternativas terapéuticas

Se han evaluado diversas medidas para impedir el ciclo de transmisión de la leishmaniasis, enfocadas en el control vectorial mediante la utilización de insecticidas y

la vigilancia epidemiológica de animales reservorios de la enfermedad. Sin embargo, la falta de continuidad de dichos programas de control solo ha generado resultados a corto plazo, insuficientes para el control de la enfermedad (25). La evaluación de vacunas empleando parásitos muertos, genéticamente modificados, extractos antigénicos y antígenos recombinantes, solo han mostrado una eficacia parcial en ensayos clínicos, por lo que a la fecha no existe una vacuna eficaz y segura que ofrezca una alta inmunogenicidad y capacidad protectora para ser empleada para la inmunoprofilaxis de la leishmaniasis humana (26,27). Sin embargo, para la leishmaniasis canina se han desarrollado algunas vacunas con resultados prometedores, como Leishmune[®], Leish-Tec[®] y CaniLeish[®], que animan a la comunidad científica a seguir trabajando en el desarrollo de una vacuna para los humanos (28).

El control de la leishmaniasis recae principalmente en el diagnóstico oportuno de casos clínicos y la administración de una quimioterapia adecuada en los pacientes infectados. Aunque existen diversas alternativas para el tratamiento de la enfermedad, ninguno de los medicamentos actualmente disponibles puede ser considerado como ideal ya que la mayoría presentan elevada toxicidad, altos costos, larga duración y administración parenteral que dificulta la adhesión al tratamiento, y fallas terapéuticas debido principalmente a la emergencia de parásitos resistentes a los medicamentos (29,30). En la actualidad, los regímenes de tratamiento para el control de la leishmaniasis comprende solo cinco fármacos. Estos incluyen los antimoniales pentavalentes, pentamidina, anfotericina B y su formulación liposomal AmBisome[®], paromomicina y miltefosina. Exceptuando los antimoniales pentavalentes, los demás medicamentos no son compuestos leishmanicidas específicos, ya que fueron originalmente desarrollados para el tratamiento de otras enfermedades (31).

Los **antimoniales pentavalentes** (SbV) en forma de estibogluconato sódico (Pentostam[®]) y antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) se constituyen como el tratamiento de primera línea recomendado por la OMS para el tratamiento de leishmaniasis. A pesar de su introducción desde hace más de 60 años, el mecanismo exacto de acción aún es desconocido y su acción probablemente dependa de la reducción del Sb^V (antimonio pentavalente) a Sb^{III} (antimonio trivalente) por acción de enzimas reductasas de los macrófagos y las formas amastigotes de los parásitos. Se ha descrito que esos compuestos actúan promoviendo el eflujo de iones y inhibiendo la tripanotión reductasa y la glutatión sintasa, lo que conduce a una acumulación de las formas oxidadas

de tripanotión y de glutatión, alterando el equilibrio redox de los parásitos. Además, se ha demostrado que alteran el metabolismo energético debido a la inhibición de la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos. Su acción conduce a un proceso de muerte similar a la apoptosis, involucrando la fragmentación de ADN y exposición de fosfatidilserina a la cara extracelular de la membrana (32,33). Sin embargo, estos fármacos presentan ciertas desventajas como su administración parenteral, la larga duración del tratamiento, y la aparición de efectos colaterales tóxicos como mialgias, pancreatitis, arritmias cardíacas, que en muchos casos llevan al cese del tratamiento (34). Adicionalmente durante los últimos años se ha reportado la emergencia de parásitos resistentes a dichos medicamentos que limitan seriamente su uso como quimioterapia. Inicialmente, una pequeña dosis del medicamento (10mg/kg) por un corto tiempo (6 a 10 días) era suficiente para la resolución de la enfermedad, pero la aparición de reportes de fallas clínicas al tratamiento obligó al aumento de la dosis en 20 mg/kg por 30-40 días (35). En el distrito norte de Bihar en la India, se ha descrito falla clínica al tratamiento con SbV en un 56-60% de los pacientes (36). De igual manera, en países de Suramérica como Brasil, Venezuela, Perú y Colombia se han evidenciado fallas clínicas al tratamiento con antimoniales pentavalentes sugiriendo que estas pueden ser ocasionadas por parásitos resistentes al medicamento (37-40). La resistencia de *Leishmania* a los antimoniales parece estar relacionada con una disminución en los niveles intracelulares del fármaco, ya sea por una disminución en la entrada del Sb^{III} mediada por la acuagliceroporina 1 (AQP1) o por un aumento en el eflujo/secuestro del fármaco activo mediante conjugación con tioles mediado por proteínas transportadoras como el transportador ABC PgpA (41,42).

Dentro de los medicamentos empleados como segunda línea de tratamiento, se incluyen la **pentamidina** y la **anfotericina B**, cuyo empleo no está muy extendido debido a su toxicidad y alto costo, que los hacen prácticamente inaccesibles a la mayoría de los pacientes en las zonas endémicas. La **pentamidina** es una diamina aromática sintética desarrollada como fármaco hipoglucemiante y también utilizada en el tratamiento y profilaxis de la neumonía causada por *Pneumocystis carinii*. Desde hace 50 años ha sido empleada como segunda línea de tratamiento para la LC, LCD y casos de LV que no responden a los antimoniales pentavalentes. Este fármaco actúa inhibiendo el metabolismo de poliaminas, altera el potencial de membrana mitocondrial y se une al ADN dificultando su replicación (35,43). Los efectos adversos de la pentamidina

incluyen hipotensión, hipoglicemia, diabetes, miocarditis y nefrotoxicidad, por lo que su empleo no está muy extendido y ha sido progresivamente abandonada como segunda línea de tratamiento. Aunque el uso clínico limitado de la pentamidina hace poco probable el desarrollo de falla terapéutica *in vivo*, al momento se han generado *in vitro* diversas líneas de *Leishmania* resistentes al medicamento, las cuales se caracterizan por mostrar una menor acumulación de fármaco en la mitocondria del parásito mediado por el transportador ABC, PRP1 (44). Por otra parte, la **anfotericina B** es un compuesto antifúngico extraído de la bacteria *Streptomyces nodusus*, indicado en el tratamiento de la LV y LMC que no responden a los antimoniales pentavalentes. La actividad leishmanicida se debe a su interacción con el ergosterol (esterol predominante en las membranas de *Leishmania*) y la formación de poros que aumentan la permeabilidad a iones, conduciendo a la lisis celular. Además induce estrés oxidativo por la generación de ROS (45). Su administración intravenosa con frecuencia causa rigor, escalofríos y fiebre, asociada con miocarditis y nefrotoxicidad. La formulación liposomal de la anfotericina B, conocida como AmBisome[®], es una alternativa que presenta menos efectos adversos y mayor eficacia, sin embargo presenta un elevado costo que limita su uso en países en vía de desarrollo (46). A la fecha existen algunos reportes que sugieren resistencia clínica, lo cual no es sorprendente dada la alta frecuencia de uso de este fármaco en la India. La resistencia de *Leishmania* a la anfotericina B parece estar relacionada con cambios en el perfil de esteroides de la membrana que disminuyen entrada del fármaco y un aumento en el eflujo mediado por el transportador ABC, MDR1 (47).

La **paromomicina** es un amino glucósido de amplio espectro aislado de *Streptomyces riomusus*, usado en el tratamiento de la LV en formulación parenteral y de la LC en administración tópica y parenteral. Los principales efectos adversos son nefrotoxicidad y ototoxicidad. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas mediante su unión a la subunidad 30S ribosomal, llevando a la acumulación de un complejo de iniciación anormal en el codón de inicio del ARNm. Además, promueve una lectura errónea de la plantilla del ARNm que resulta en la incorporación de aminoácidos incorrectos en las cadenas polipeptídicas crecientes (48). Debido a que es un fármaco cuyo uso no está muy extendido, hasta la fecha no existen reportes de resistencias clínicas. Sin embargo, en cepas resistentes a paromomicina generadas *in vitro*, se ha observado que podría estar relacionada con mutaciones en el ARN ribosomal o un incremento en el eflujo del fármaco mediado por los transportadores ABC, MDR1 y MRPA, la proteína

fosfatasa A2 (32,49).

La **miltefosina** (hexadecilfosfocolina) es un alquilfosfolípido sintético originariamente desarrollado como un agente antitumoral para el tratamiento de cáncer de seno y linfomas cutáneos, pero desde finales de la década de los 80's se conoce su actividad leishmanicida, tanto *in vitro* como *in vivo* (50,51). Se sabe que tras su internalización específica en el parásito mediada por las proteínas LdMT/Ros3, la miltefosina produce diferentes efectos debido a sus propiedades tipo detergente (52). Se ha descrito que ocasiona alteraciones en la biosíntesis de fosfatidilcolina y en el potencial de membrana mitocondrial debido a la inhibición de la citocromo c oxidasa, induciendo una muerte celular tipo apoptosis (53,54). La miltefosina es el último fármaco leishmanicida en ser aprobado y el primero de administración oral que ha demostrado ser efectivo para el tratamiento de la LV y la LC, incluyendo los casos de falla terapéutica a antimoniales (55,56). Este medicamento fue introducido en la India (2002) para el tratamiento de LV, en Alemania (2004) para pacientes inmunocomprometidos afectados por LV y en Colombia (2005) para el tratamiento de la LC, logrando tasas de curación superiores a 91% (53,55,57). Desafortunadamente, después de una década de uso la eficacia del medicamento ha disminuido y se han duplicado las tasas de recaída (58). A pesar de que la administración oral de la miltefosina mejora la adherencia al tratamiento presenta efectos adversos gastrointestinales, principalmente vómitos y diarrea, ocasionalmente produce hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, y es teratogénica lo que restringe su uso en mujeres embarazadas y en edad fértil. Además, la miltefosina presenta una larga vida media lo que potencia el desarrollo de parásitos resistentes al medicamento (59). Se han descrito dos posibles mecanismos de resistencia a la miltefosina *in vitro* en *Leishmania*: i) disminución en la internalización del fármaco por mutaciones en la maquinaria de translocación presente en la membrana plásmica formada por el transportador LdMT y la subunidad beta específica LdRos3 (52,60,61) y ii) aumento en la velocidad de eflujo del fármaco mediado por sobreexpresión de los transportadores ABC, MDR1 y ABCG6 (62,63). En aislados clínicos de *L. donovani* obtenidos de pacientes refractarios al tratamiento con miltefosina se ha observado que los parásitos además de reducir la acumulación del fármaco incrementan su resistencia al estrés oxidativo (64), mientras que en aislados de *L. infantum* se ha observado la ausencia de un locus denominado MLS (Miltefosine Sensitivity Locus), el cual contiene genes que

codifican para putativas proteínas helicasa, nucleotidasa/nucleasa y enoil-CoA isomerasa (65).

Otros compuestos usados en la actualidad para el tratamiento de la leishmaniasis incluyen los **azoles** (ketoconazol, itraconazol y fluconazol), agentes antifúngicos de administración oral que actúan bloqueando la síntesis de ergosterol de los parásitos y son empleados en el tratamiento de la LCL, y el **alopurinol**, un análogo de bases nitrogenadas que causa inhibición en la síntesis de proteínas y es empleado en combinación con otros fármacos para el tratamiento de la LR causada por *L. tropica* (59).

Debido a la creciente emergencia de fallas clínicas y parásitos resistentes a los fármacos leishmanicidas bajo administración como monoterapia, la OMS ha recomendado el uso de terapias combinadas empleando compuestos con actividad sinérgica o aditiva que actúen en diferentes blancos, con el objetivo de reducir las dosis, la duración del tratamiento, los efectos secundarios adversos y prevenir la aparición de resistencias (66).

Además de los compuestos descritos anteriormente, existen otras alternativas para el tratamiento para la LCL como las terapias físicas que son utilizadas frecuentemente en casos en lo que el tratamiento sistémico está contraindicado y la localización, tamaño y número de lesiones cutáneas lo permiten. La **termoterapia** se basa en la capacidad de destruir directamente los parásitos mediante la aplicación de calor en lesiones cutáneas localizadas, siendo una terapia efectiva y de bajo costo que ha mostrado tasas de curación entre el 69.4 y 98% en pacientes con LCL en Afganistán, India, Irán, Pakistán y Colombia. Los posibles efectos adversos de esta terapia incluyen hiperpigmentación, infecciones secundarias y lesiones satélites. Por su parte, la **crioterapia** actúa destruyendo el tejido infectado y está indicado en lesiones pequeñas (<1 cm), con efectos adversos leves como eritema, hipo o hiperpigmentación. Es una terapia simple y de bajo costo que ha mostrado tasas de curación 78% al 95% en monoterapia y del 89.5% al 100% en combinación con antimoniales pentavalentes. El **laser de CO2** es una terapia basada en la termólisis específica del tejido infectado, con efectos secundarios menores como hiperpigmentación y cicatrización hipertrófica, el cual ha mostrado una alta efectividad (93.7%) en Irán y Cuba. La **terapia fotodinámica** se basa en la administración del precursor de porfirinas 5-aminolevulínico (ALA) que es convertido enzimáticamente en protoporfirina IX (PPIX), la cual se acumula en los tejidos y actúa como agente fotosensibilizador al ser irradiada con luz visible de baja intensidad, llevando a la

producción de especies reactivas del oxígeno y la posterior muerte celular. Es considerada una terapia potencialmente eficaz para el tratamiento de la LCL, y presenta algunos efectos secundarios como ardor, prurito, enrojecimiento, edema y dolor (67,68).

1.5 Morfología y ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida dimórfico, en el cual la forma promastigote se desarrolla en el insecto vector y la forma amastigote en el hospedero mamífero (Figura 1.4). A pesar de que dichos estadios presentan una morfología bastante diferente entre ellos, conservan una arquitectura celular básica formada por un núcleo y orgánulos de copia única como el aparato de Golgi y la mitocondria, la cual se extiende hasta la región anterior del núcleo en donde se encuentra el kinetoplasto, y un flagelo que se extiende desde el cuerpo basal. En la base del flagelo se encuentra una invaginación de la membrana celular denominada bolsillo flagelar, el único sitio de endocitosis y exocitosis de estos parásitos. Los amastigotes presentan un cuerpo celular más pequeño de forma ovalada o redondeada de unos 3-5 μm de longitud, y un flagelo corto e inmóvil con funciones sensoriales (Figura 1.4 derecha).

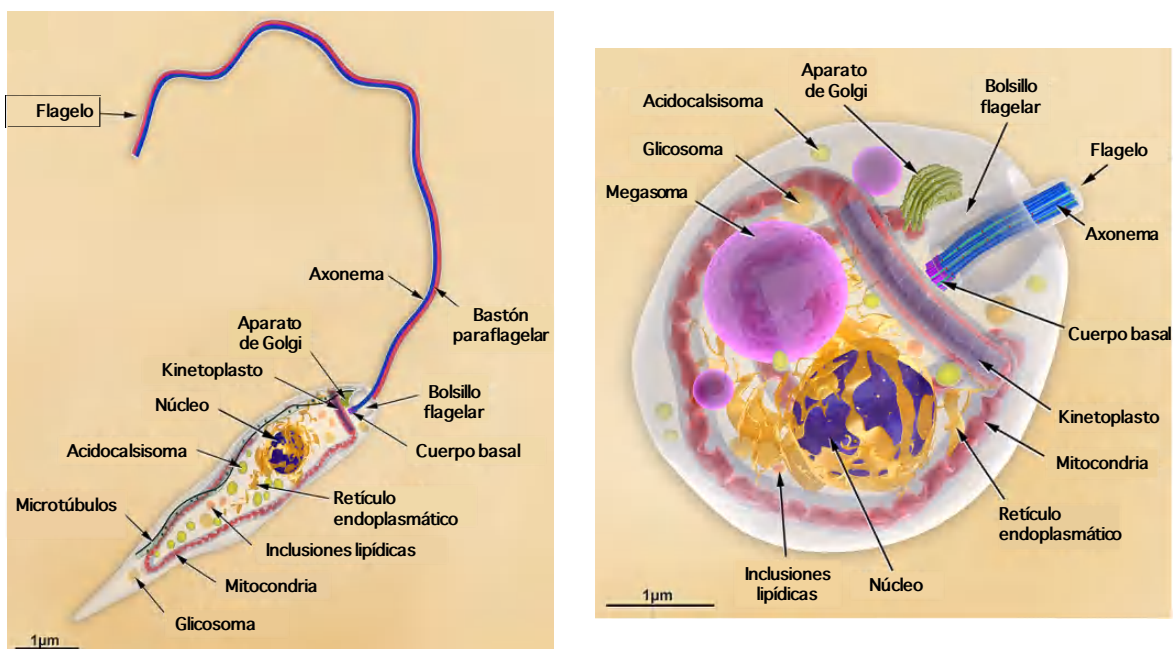


Figura 1.4. Morfología de las formas promastigote y amastigote de *Leishmania* spp. Imágenes adaptadas de (69).

Por otra parte, los promastigotes presentan un cuerpo celular fusiforme de entre 5-15 μm de longitud con un flagelo largo y móvil que se extiende fuera del bolsillo flagelar, el cual proporciona la fuerza propulsora para el desplazamiento de los parásitos a través del tracto digestivo del insecto (Figura 1.4 izquierda) (70).

En los hospederos mamíferos, *Leishmania* se comporta como un organismo intracelular obligado que se multiplica dentro de los macrófagos o células del sistema mononuclear fagocítico en forma de amastigote. Los amastigotes son tomados por el vector a partir de un reservorio animal o de un hospedero humano infectado, durante una ingesta de sangre (Figura 1.5). Los insectos vectores introducen en la piel del hospedero mamífero segmentos de su proboscis que semejan una sierra, ocasionando pequeñas heridas dentro de las cuales la sangre fluye de los capilares superficiales. De esta manera, el daño del tejido asociado y la formación de heridas libera los macrófagos infectados con amastigotes a la sangre que será ingerida por los insectos. Una vez dentro del intestino del vector, los amastigotes son liberados de los macrófagos (Figura 1.5), comenzando un proceso de transformación generado por cambios en las condiciones ambientales, tales como disminución de la temperatura e incremento del pH (19).

Después de 18 a 24 horas de la ingesta de sangre, los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, los cuales migran hacia la parte anterior del intestino del insecto en donde se diferencian a promastigotes metacíclicos, las formas infectivas del parásito (71), como se detalla en el siguiente apartado. Los promastigotes metacíclicos son regurgitados desde la parte anterior tracto digestivo hasta la cavidad bucal del insecto, y son inoculados durante la picadura a un nuevo hospedero mamífero (Figura 5). Al momento de ser transmitidos, los promastigotes se adhieren mediante moléculas de superficie, como el lipofosfoglicano (LPG) y la proteasa de superficie gp63, a los receptores del complemento CR1 y CR3 de los macrófagos, promoviendo de esta manera la fagocitosis (72). Dentro del fagolisosoma los promastigotes se transforman a amastigotes, los cuales desarrollan una respuesta adaptativa que incluye, además del cambio morfológico, cambios bioquímicos y fisiológicos que le permiten sobrevivir en el ambiente hostil de esta vacuola, que presenta un pH ácido y un ambiente altamente proteolítico dado por la presencia de hidrolasas y proteasas lisosomales (73). La sobrevivencia, persistencia y posterior multiplicación de los amastigotes dentro de fagolisosoma, lleva a la liberación de nuevos parásitos que infectan otras células blanco, permitiendo el desarrollo y establecimiento de la enfermedad en el hospedero mamífero,

a partir del cual los insectos vectores toman nuevamente los parásitos para así completar el ciclo de la enfermedad (Figura 1.5).

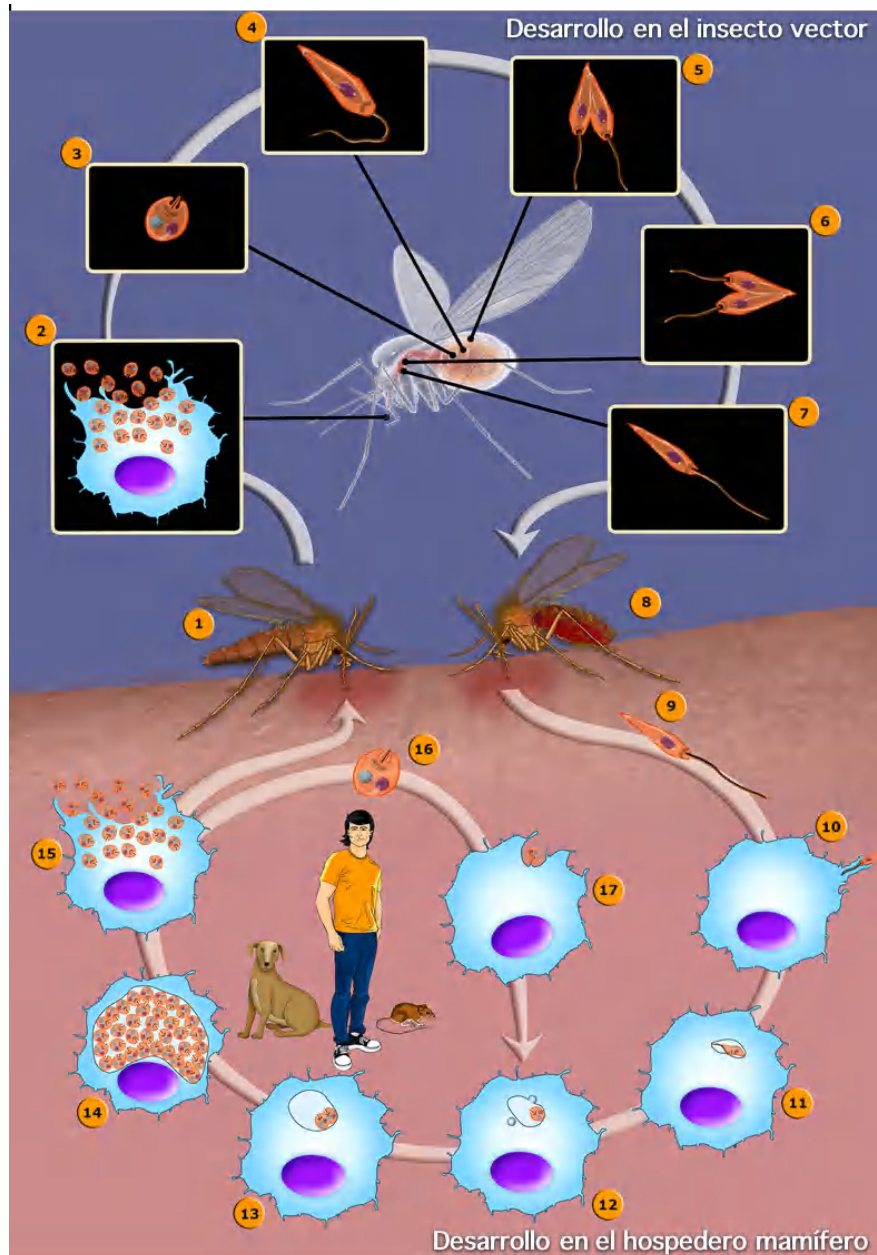


Figura 1.5. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. El ciclo de vida comienza cuando un flebótomo hembra pica a un hospedero mamífero infectado (1) y los amastigotes presentes en los macrófagos son liberados en el insecto (2). En el intestino medio del insecto los amastigotes (3) se transforman en promastigotes procíclicos (4) y luego en una forma altamente replicativa (5) que coloniza el tracto digestivo del insecto. Los parásitos migran a la válvula estomodeal donde se multiplican (6) y posteriormente se transforman en promastigotes metacíclicos infectivos (7). Los insectos vectores, por regurgitación de la sangre durante la picadura (8), inoculan los promastigotes metacíclicos (9) en un nuevo hospedero mamífero. Los promastigotes metacíclicos infectan los macrófagos (10) en donde se transforman a la forma intracelular amastigote (11) dentro de una vacuola parasitófora (12) en donde se multiplican (13). Los parásitos se replican intracelularmente (14) hasta provocar la ruptura de los macrófagos (15) y la posterior liberación

de los amastigotes (16), que infectan nuevas células (17) llevando a la propagación y establecimiento de la enfermedad. Imagen adaptada de (69).

1.6 Interacción *Leishmania*-insecto vector

Los flebótomos adultos generalmente se alimentan de fuentes de carbohidratos para obtener energía, excepto en el momento de la oviposición en el cual los flebótomos hembras necesitan ingerir sangre de un mamífero para obtener los nutrientes necesarios para el desarrollo de los huevos. Cuando los flebótomos hembra se alimentan de un mamífero infectado, ingieren macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania*, convirtiéndose en vectores de la enfermedad. Por lo tanto, los flebótomos machos no participan en la transmisión (74).

Durante el desarrollo de *Leishmania* en el tracto digestivo del insecto vector se han descrito varias etapas de diferenciación (Figura 1.6), asociadas a cambios morfológicos, genéticos y bioquímicos de los parásitos, que llevan a la transformación de promastigotes procíclicos no infectivos en promastigotes metacíclicos altamente virulentos que aseguran su supervivencia en el hospedero mamífero, en un proceso conocido como **metaciclologénesis** (75). Diversas señales han sido asociadas a la inducción de la metaciclologénesis, como los cambios de pH y temperatura (2), disminución en los niveles de bipterina (76), ausencia de hemoglobina (77), exposición a la saliva del insecto vector (78) y condiciones anaeróbicas (79). La primera etapa ocurre en el intestino medio posterior, en donde la sangre infectada se encuentra contenida en una matriz peritrófica y los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos durante las 6 a 24 horas siguientes a la ingesta de sangre (Figura 1.6). Dicha matriz peritrófica constituye una barrera protectora que protege al estadio de transición amastigote-promastigote, altamente sensible a la proteólisis, de las proteasas intestinales. En la segunda etapa, que ocurre entre el segundo y cuarto día, los promastigotes procíclicos pequeños, ovoides y de flagelo corto, se diferencian a nectomónadas, formas alargadas móviles con un flagelo más largo que se inserta entre las microvellosidades de las células epiteliales para evitar su eliminación por la acción peristáltica del intestino. Seguidamente, las nectomónadas migran hacia el intestino medio torácico y dan lugar a las leptomónadas en el cuarto día, cuya división produce una infección masiva en el intestino medio anterior (Figura 1.6). La habilidad de adhesión a las microvellosidades es fundamental para el parásito, ya que aproximadamente tres días después de la alimentación, el insecto expulsa los restos de la

ingesta sanguínea, y los parásitos no anclados a las células epiteliales son evacuados. En la etapa final, que ocurre entre el quinto y séptimo día, las leptomónadas se diferencian en promastigotes metacíclicos altamente infectivos y no replicativos, que se mueven libremente y se acumulan en la válvula estomodeal del insecto, disponibles para ser transmitidos a un hospedero mamífero (Figura 1.6). En esta etapa también aparecen las haptomónadas, parásitos no móviles que se unen al revestimiento cuticular de la válvula estomodeal formando anillos concéntricos que bloquean su abertura, facilitando la regurgitación de los parásitos en el momento de la transmisión. La finalización de la metaciclogénesis en el flebótomo hembra coincide con la necesidad de una nueva ingesta de sangre para comenzar el siguiente ciclo gonotrófico (Kamhawi 2006; Sacks et al. 2008).

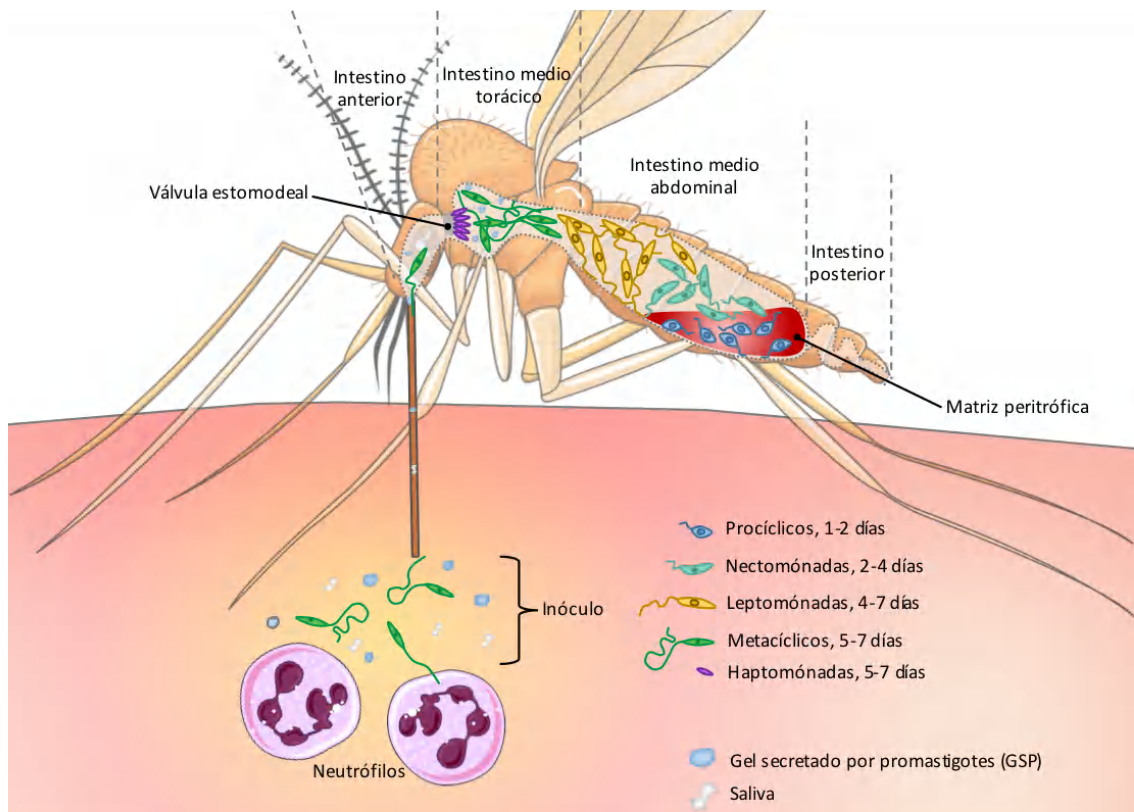


Figura 1.6. Desarrollo de *Leishmania* en el tracto digestivo del insecto vector. En la matriz peritrófica los amastigotes se diferencian a promastigotes procíclicos, los cuales se diferencian posteriormente a nectomónadas. Las nectomónadas escapan de la matriz peritrófica y se transforman a leptomónadas, formas altamente replicativas que dan lugar a la forma infectiva denominada promastigote metacíclico. Los promastigotes metacíclicos alcanzan la válvula estomodeal desde donde son inoculados a un nuevo hospedero mamífero. Además de los parásitos infectivos, el inóculo también contiene el GSP y pequeñas cantidades de saliva del insecto vector lo cual potencia el reclutamiento de las células del sistema inmunitario al sitio de inoculación.

Leishmania presenta diversos mecanismos moleculares que aseguran su desarrollo en el insecto vector. Una de las moléculas mejor estudiadas es un glicoconjugado de superficie denominado lipofosfoglicano (LPG), el cual protege a los parásitos de la acción de las enzimas digestivas y es requerido para la adhesión de los parásitos a las células epiteliales del intestino medio durante las primeras etapas de diferenciación (82). Además, se ha demostrado la presencia de un péptido de 12 kDa en *L. major* que simula la función de neuropéptidos endógenos del insecto vector encargados de controlar las contracciones musculares del intestino medio, el cual disminuye la peristalsis y evita la expulsión de los parásitos no adheridos a las microvellosidades intestinales durante la excreción de la sangre no digerida (83). La capacidad de adhesión de los parásitos al epitelio intestinal se pierde durante la transformación a promastigotes metacíclicos, debido principalmente a modificaciones estructurales del LPG, permitiendo una liberación selectiva y la posterior migración de los parásitos infectivos hacia la probóscide del insecto para ser transmitidos durante una nueva picadura (84). La glicoproteína de 63 kDa (gp63) o leishmaniolisina es una metaloproteasa que se expresa abundantemente en la superficie de los promastigotes, la cual parece ser importante en la etapa inicial del desarrollo del parásito en el insecto vector. Se ha sugerido que la gp63 podría proteger a los promastigotes de las enzimas digestivas en el intestino medio del insecto y que también podría participar en la proteólisis de la hemoglobina para la obtención de hemo y aminoácidos como nutrientes esenciales para su desarrollo (85). Sin embargo, su papel en la proteólisis de la hemoglobina es cuestionable, ya que se ha demostrado que la hemoglobina es endocitada y degradada intracelularmente por los promastigotes para la obtención de hemo (86,87). Por otra parte, los promastigotes de *Leishmania* pueden afectar la dinámica de alimentación del insecto al limitar el volumen de sangre que puede obtener, mediante la producción de quitinasas que degeneran el revestimiento quitinoso de la válvula estomodeal y mediante su obstrucción física a través de la producción del gel secretado por promastigotes (GSP) en el que se encuentran embebidos los parásitos. Lo anterior resulta en un aumento en el tiempo de alimentación y en el número de picaduras realizadas por el insecto, llevando a un mayor éxito en la transmisión de los parásitos (19,80). El GSP secretado es regurgitado junto con los promastigotes metacíclicos en la piel del huésped mamífero durante la transmisión, y parece estar involucrado con la exacerbación de la forma cutánea de la enfermedad (88). Las proteínas SHERP (Small Hydrophilic Endoplasmic Reticulum-associated Protein) y HASP (Hydrophilic Acylated Surface Protein), codificadas por genes localizados en el

locus LmcDNA16, son esenciales en el proceso de metacicloogénesis, ya que su eliminación impide la secreción del GSP y está correlacionado con un defecto en la colonización de la válvula estomodeal y transmisión de los parásitos a un nuevo huésped mamífero (89).

Tanto los cambios morfológicos como moleculares que ocurren durante el proceso de diferenciación en el insecto vector, llevan a la generación de parásitos altamente adaptados para la transmisión exitosa a un huésped mamífero, incluyendo la presencia de un flagelo que le proporciona motilidad y funciones sensoras, y la expresión de proteínas que les permiten sobrevivir a la lisis mediada por complemento y al ambiente hostil al que se enfrentan dentro del fagolisosoma de los macrófagos.

1.7 Interacción *Leishmania*-macrófago

En el hospedero mamífero, *Leishmania* se comporta como un parásito intracelular obligado en su forma de amastigote y su sobrevivencia depende de la activación de mecanismos que prevengan la respuesta antimicrobiana de los macrófagos, como la presentación antigénica, la generación de especies reactivas del oxígeno y la producción de citoquinas (90).

Durante la ingesta de sangre, los promastigotes metacíclicos son inoculados simultáneamente con el GSP secretado por los parásitos y pequeñas cantidades de saliva del insecto vector, lo cual además de estimular el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al sitio de inoculación, ejerce una actividad inmunomoduladora que facilita la supervivencia de los parásitos (91,92) (Figura 1.6). El inóculo también contiene parásitos muertos que son reconocidos por los receptores del neutrófilo que median la eliminación de células apoptóticas, lo que promueve la fagocitosis de los promastigotes vivos sin la activación de la respuesta microbicida de los neutrófilos (93). Los neutrófilos actúan en el sitio de la infección como “Caballos de Troya”, ya que los parásitos que sobreviven en su interior son capaces de promover la apoptosis celular, lo que lleva a que los macrófagos fagociten los neutrófilos apoptóticos y sean infectados con los promastigotes de *Leishmania* de una manera silenciosa (94). Los promastigotes metacíclicos son capaces de evadir la lisis mediada por complemento utilizando las moléculas de superficie LPG y gp63; la mayor longitud del LPG en los promastigotes metacíclicos previene la unión de las subunidades C5b-C9, mientras que gp63 convierte

la subunidad C3b en una forma inactiva. La unión de C3b y C3bi a la superficie opsoniza a los parásitos para ser fagocitados por los macrófagos mediante la interacción con los receptores de complemento CR1 y CR3, respectivamente (95). Los promastigotes también pueden unirse a los macrófagos por receptores de manosa y fibronectina, o ser internalizados mediante microdominios lipídicos de membrana ricos en colesterol (Figura 1.7) (96).

Los parásitos también utilizan uno de los mecanismos que las células fagocíticas emplean en el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas como estrategia para evadir la respuesta inmunitaria y diseminar la infección. En un proceso conocido como mimetismo apoptótico, los parásitos exponen fosfatidilserina en la cara externa de su membrana plasmática lo que induce su internalización por las células fagocíticas al semejar cuerpos apoptóticos (97,98). Este mecanismo parece ser crucial en la infección de las células hospedadoras y la inhibición de su respuesta microbicida, y requiere la participación del transportador LABC2 del parásito, implicado en la translocación de la fosfatidilserina a la membrana externa (99).

Después de su fagocitosis, los promastigotes son internalizados en fagolisosomas en donde se diferencian a amastigotes intracelulares, proceso desencadenado principalmente por el aumento de temperatura (32-37°C) y la disminución del pH (4.5-5.5) en el ambiente de la célula hospedera (100) (Figura 1.7). Los promastigotes, a diferencia de los amastigotes, son vulnerables a la degradación por el ambiente ácido e hidrolítico del fagolisosoma, por lo que el parásito es capaz de retardar la maduración del endosoma y su fusión al fagosoma, proporcionando tiempo adicional para su diferenciación a la forma resistente. El LPG de los promastigotes aparentemente genera un cambio en la forma de las membranas, llevando a una repulsión estérica entre el fagosoma y el endosoma, además disminuye la incorporación de marcadores de endosomas tardíos como rab7 y LAMP-1 (101).

Una vez establecida la infección, los amastigotes intracelulares modulan el ambiente hostil de la vacuola parasitófora mediante diversos mecanismos moleculares que interfieren con la respuesta microbicida del macrófago. Dentro de la vacuola parasitófora, los parásitos hacen frente a las hidrolasas ácidas y moléculas tóxicas como óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS), mediante la acción de diversas enzimas como peroxidoxinas, superóxido dismutasa e incluso las moléculas de superficie LPG y gp63, que inactivan las ROS y los derivados de nitrito, además de degradar las

enzimas lisosomales destinadas a destruir los parásitos (90). El LPG además interfiere con el reclutamiento de la proteína V-ATPasa y el ensamblaje de la NADPH oxidasa a la membrana del fagosoma, lo que inhibe la acidificación de la vacuola parasitófora y previene la generación de ROS en su interior, respectivamente (102,103) (Figura 1.7). La infección por *Leishmania* también lleva a un aumento en la expresión de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) de los macrófagos, lo cual está asociado a la disminución en la producción de TNF- α y ROS, y la inhibición de la maduración de la subunidad gp91^{phox} del complejo NADPH oxidasa dependiente de hemo (104,105).

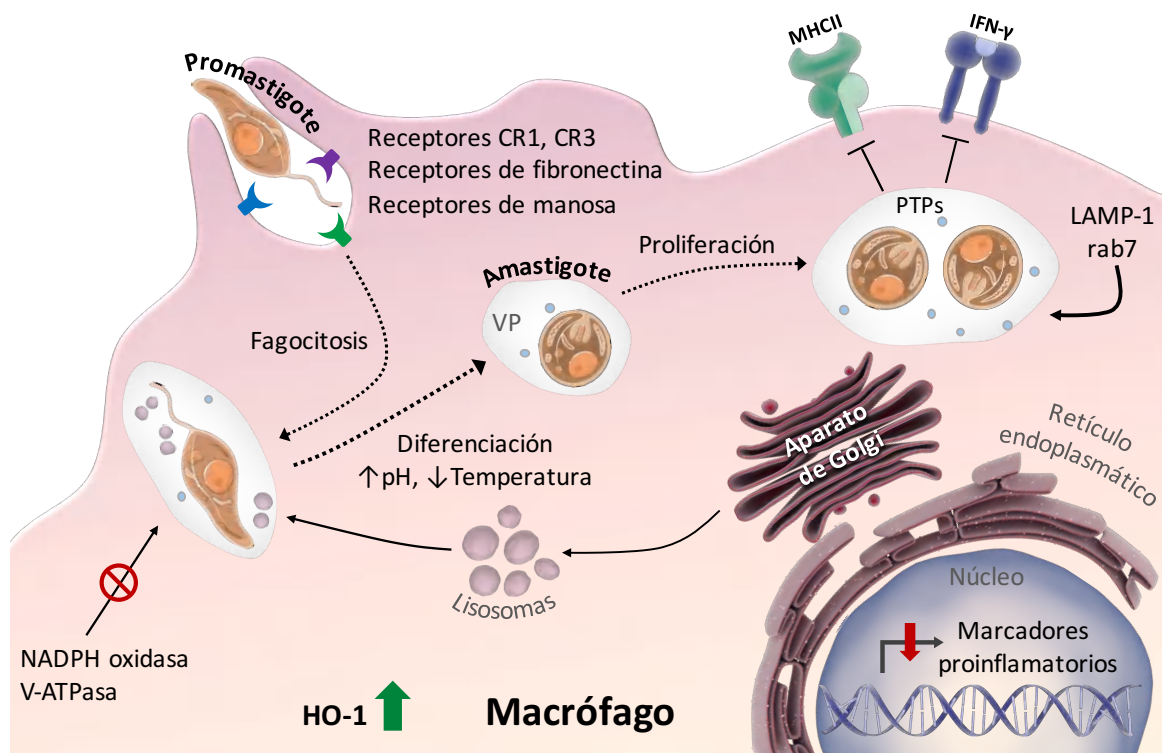


Figura 1.7. Mecanismos de infección y defensa intracelular de *Leishmania* spp. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos mediante interacciones con receptores de membrana e internalizados en vacuolas parasitóforas (VP), en donde la disminución del pH y el aumento de temperatura desencadenan la diferenciación a la forma intracelular amastigote. Dentro de la VP los parásitos son capaces de modular la respuesta microbicida del macrófago mediante la liberación de factores que interfieren con la producción de citoquinas proinflamatorias, la presentación antigénica y la generación de ROS, permitiendo su replicación intracelular y el establecimiento de la enfermedad.

Los macrófagos infectados inducen la producción de citoquinas inflamatorias (IL-12 y TNF- α) a través de la activación de vías de señalización como JAK/STAT. Como mecanismo de defensa, *Leishmania* induce la activación de proteínas tirosina fosfatasas (PTP) del macrófago (SHP-1, PTP1B, TC-PTP, PTP-PEST), interfiriendo con la

fosforilación de las quinasas de las vías de señalización y la posterior reducción de la respuesta proinflamatoria, lo que garantiza su supervivencia intracelular y la progresión de la infección (101). Además, la activación de las PTPs disminuye la producción de NO, la presentación antigénica a través del MHCII y regula negativamente la expresión del receptor de IFN- γ (106) (Figura 1.7). Los parásitos también son capaces de modular factores de transcripción como STAT1 y NF- κ B importantes para la señalización por IFN- γ y la producción de IL-12, mediante su degradación por proteasoma o por la acción de cisteína peptidasas, respectivamente (107,108). Adicionalmente, gp63 es capaz de clivar el factor de transcripción AP-1, llevando a una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias y NO (109).

Dichos mecanismos de defensa permiten a los amastigotes intracelulares multiplicarse por fisión binaria dentro de la vacuola parasitófora de la célula hospedadora, la cual finalmente se lisa liberando nuevos amastigotes que infectarán células fagocíticas próximas. También se ha descrito que *Leishmania* puede desencadenar un proceso apoptótico que favorece la propagación de la infección a células cercanas no infectadas. En este caso, los amastigotes son transferidos desde una célula infectada apoptótica a una nueva célula vecina no infectada mediante la extrusión de las vacuolas parasitófora en asociación con componentes de la célula hospedadora, como LAMPs y rab7, lo cual evita el reconocimiento inmunológico extracelular (110). La presencia de LAMP incrementa la secreción de IL-10 en los macrófagos receptores llevando a la producción de moléculas inmunosupresoras como el TGF- β , favorable para la proliferación intracelular de los amastigotes (110).

1.8 Particularidades bioquímicas, celulares y moleculares de *Leishmania* spp.

1.8.1 Organización genómica y regulación de la expresión génica

A pesar de la variabilidad en cuanto a patogenicidad y tropismo celular, las diferentes especies de *Leishmania* presentan una estructura genómica similar con un alto grado de conservación en contenido y orden de los genes (sintenia). Los genomas de las especies del Viejo Mundo (*L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*) presentan 36 cromosomas, mientras que las especies del Nuevo Mundo presentan 34 (*L. mexicana*) o 35 cromosomas (*L. braziliensis*) (111). Aunque durante muchos años se pensó que el genoma de estos

parásitos era estrictamente diploide, se ha demostrado que *Leishmania* presenta una característica particular denominada **aneuploidía mosaico**, en donde cada célula dentro de una población puede presentar distinto número de copias de uno o más cromosomas. Esta plasticidad genética ha sido considerada como una poderosa estrategia desarrollada por *Leishmania* para adaptarse a las condiciones cambiantes del entorno así como la aparición de resistencia a los medicamentos (112).

El análisis de los genomas de diferentes especies de *Leishmania* ha permitido identificar cerca de 900 genes que codifican ARN y aproximadamente 8300 genes que codifican proteínas, de los cuales solo el 35% tienen una función biológica asignada basado en caracterizaciones experimentales (3.7%) o similitud de secuencia con proteínas de función conocida en otros organismos (31.5%). Además, dichos genomas se caracterizan por tener una elevada densidad génica y un elevado contenido en G+C tanto en regiones codificantes (62.5%) como no codificantes (57.3%) (113).

Los genes codificantes de proteínas están organizados en largas secuencias policistrónicas de hasta cientos de genes cuya función no está relacionada entre sí, las cuales pueden ser divergentes (la dirección de la transcripción es hacia los telómeros) o convergentes (la dirección de la transcripción es desde los telómeros), y que son transcritas a partir de una región “*switch*” desde donde la ARN polimerasa II inicia su actividad de manera bidireccional. Los ARN policistrónicos generados son subsecuentemente procesados por trans-splicing y poliadenilación para generar ARNm maduros monocistrónicos, que resultan de la adición de una secuencia de 39 nucleótidos denominada mini exón o *spliced leader* (SL) en el extremo 5' y una cola de poliadeninas al extremo 3' de cada ARNm (114,115) (Figura 1.8). Dada la organización policistrónica de los genes codificantes de proteínas y la ausencia de promotores específicos para la ARN polimerasa II, la regulación de la expresión génica en *Leishmania* es determinada principalmente por el número de copias génicas, el procesamiento post-transcripcional del ARNm, la tasa de degradación de los ARNm y la eficiencia de la traducción (116).

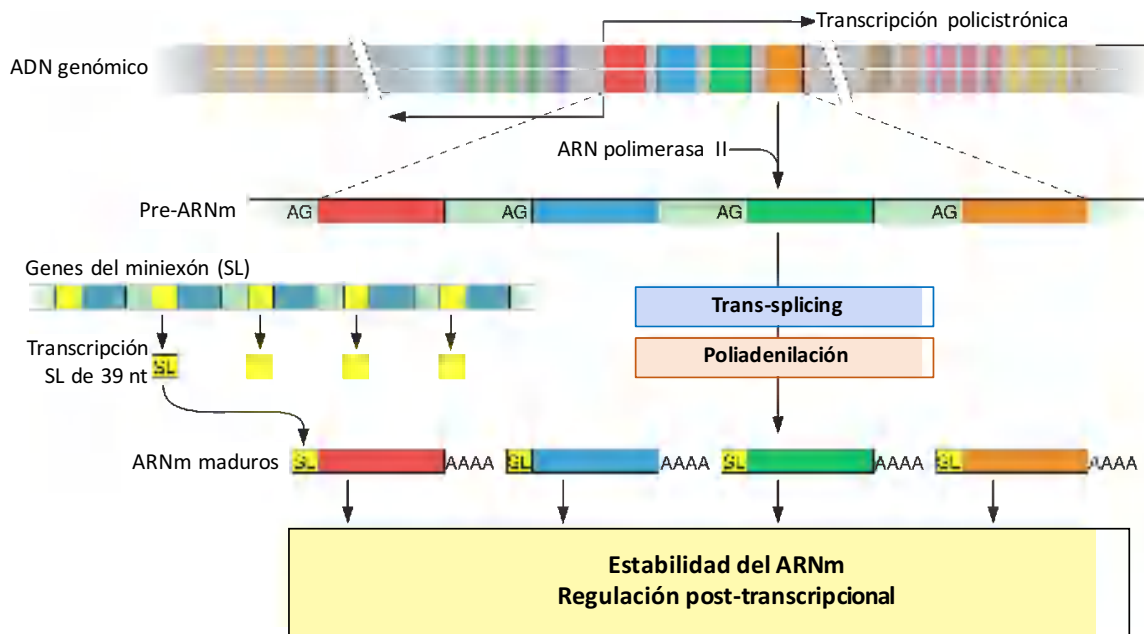


Figura 1.8. Regulación de la expresión génica en *Leishmania* spp. Imagen modificada de (117).

1.8.2 Kinetoplasto

Los organismos del orden *Kinetoplastida* deben su nombre a la estructura particular que posee su ADN mitocondrial, denominado kinetoplasto, el cual representa el 30% del ADN total de la célula. El kinetoplasto se localiza cerca del bolsillo flagelar y está constituido por 2.000-10.000 copias de mini círculos concatenados y por 20-25 maxi círculos que forman una sola red. Los maxi círculos de aproximadamente 20-40 kb son estructural y funcionalmente análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores, y codifican ARN ribosomales y proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial mientras que los mini círculos de aproximadamente 0.5-10 kb codifican para ARN guías que modifican los transcritos precursores derivados de los maxi círculos mediante la adición o delección de nucleótidos de uridina para generar ORFs funcionales (118). Este proceso de **edición de ARN** está catalizado por un complejo multiproteico conocido como editosoma, compuesto de aproximadamente 20 proteínas con actividades ligasa, endo y exonucleasa, helicasa y de unión a ARN (119).

1.8.3 Glicosomas y acidocalcisomas

Leishmania spp. posee un orgánulo denominado **glicosoma**, un peroxisoma modificado que contiene gran parte de las enzimas de las rutas glicolítica y

gluconeogénica, y que es único en tripanosomátidos. El número de glicosomas y su contenido enzimático varían según la especie de tripanosomátido e incluso dentro de una misma especie, de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes y las demandas energéticas durante su ciclo de vida (120). En estos orgánulos también se localizan enzimas implicadas en otros procesos celulares como la beta-oxidación de ácidos grasos, la ruta de las pentosas fosfato, la biosíntesis de pirimidinas y el salvamento de purinas (121).

Otros orgánulos característicos de tripanosomátidos son los **acidocalcisosmas**. Estos orgánulos electrodenso, relacionados con los lisosomas, se caracterizan por su pH ácido y por contener altas concentraciones de fósforo (fosfato, pirofosfato y polifosfato) y cationes como sodio, magnesio, potasio, zinc, calcio y hierro. Los acidocalcisosmas son la principal fuente de almacenamiento de calcio intracelular en estos parásitos, por lo que cumplen un papel fundamental en la regulación osmótica y la señalización por calcio, importantes para la adaptación a los cambios ambientales y durante el proceso de invasión a la célula hospedera (122,123).

1.8.4 Metabolismo

Mientras que en la mayoría de los organismos la homeostasis de tioles es mantenida por los sistemas glutatión/glutatión reductasa y tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, los tripanosomátidos carecen de ambas reductasas, pero poseen un metabolismo redox único basado en un ditiol de bajo peso molecular denominado **tripanotión**. El tripanotión, sintetizado por la conjugación de dos moléculas glutatión y una de espermidina por acción de la enzima tripanotión sintasa, es fundamental para la eliminación de especies reactivas del oxígeno en el parásito y por lo tanto, indispensable para su supervivencia (124).

Los nucleótidos también son esenciales para el funcionamiento celular, ya que además de su importancia en la replicación y reparación de los ácidos nucleicos, sirven como cofactores, segundos mensajeros (cAMP, cGMP) y fuente de energía (ATP). A pesar de que los parásitos son capaces de sintetizar pirimidinas *de novo* a partir de glutamina, bicarbonato y aspartato en una vía biosintética de 6 pasos enzimáticos, también presentan una ruta de salvamento que garantiza un aporte constante de pirimidinas en el parásito. Por el contrario, *Leishmania* spp. es **auxótrofo para purinas** ya que solo tiene una de las 10 enzimas requeridas para su síntesis, por lo que dependen

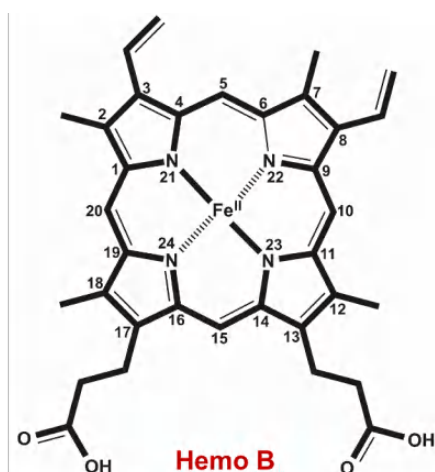
completamente de la adquisición de nucleósidos de purina a partir de fuentes exógenas mediante transportadores de membrana específicos (125). Igualmente, los parásitos de *Leishmania* spp. son **auxótrofos para pteridina**, por lo que el metabolismo de folatos está restringido a la captación de folato y biopterina a través de los transportadores de membrana FT1 y BT1, respectivamente (126).

A diferencia de las células de mamífero, los tripanosomátidos no poseen las enzimas requeridas para la síntesis de colesterol, y sintetizan como estero principal el **ergosterol**. El ergosterol es un componente esencial de la membrana plasmática de los tripanosomátidos, y alguna de las enzimas que catalizan su síntesis son exclusivas de estos organismos, como la CYP51, una hemoproteína perteneciente a la superfamilia de proteínas citocromo P450 (127).

Los tripanosomátidos son de los pocos organismos aeróbicos que, aun dependiendo de la fosforilación oxidativa, presentan **auxotrofia para hemo**, por lo que necesitan obtener esta molécula a partir de fuentes exógenas. La importancia del grupo hemo y su metabolismo en los parásitos tripanosomátidos se describirá en la siguiente sección.

2. El grupo hemo

El grupo hemo está formado por una molécula de protoporfirina IX que contiene en su centro un átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}). La protoporfirina IX está constituida por cuatro anillos de pirrol unidos por puentes metino, cada uno de los cuales aporta un átomo de nitrógeno para la coordinación del átomo de hierro en el centro del anillo tetrapirrólico plano (Figura 1.9).



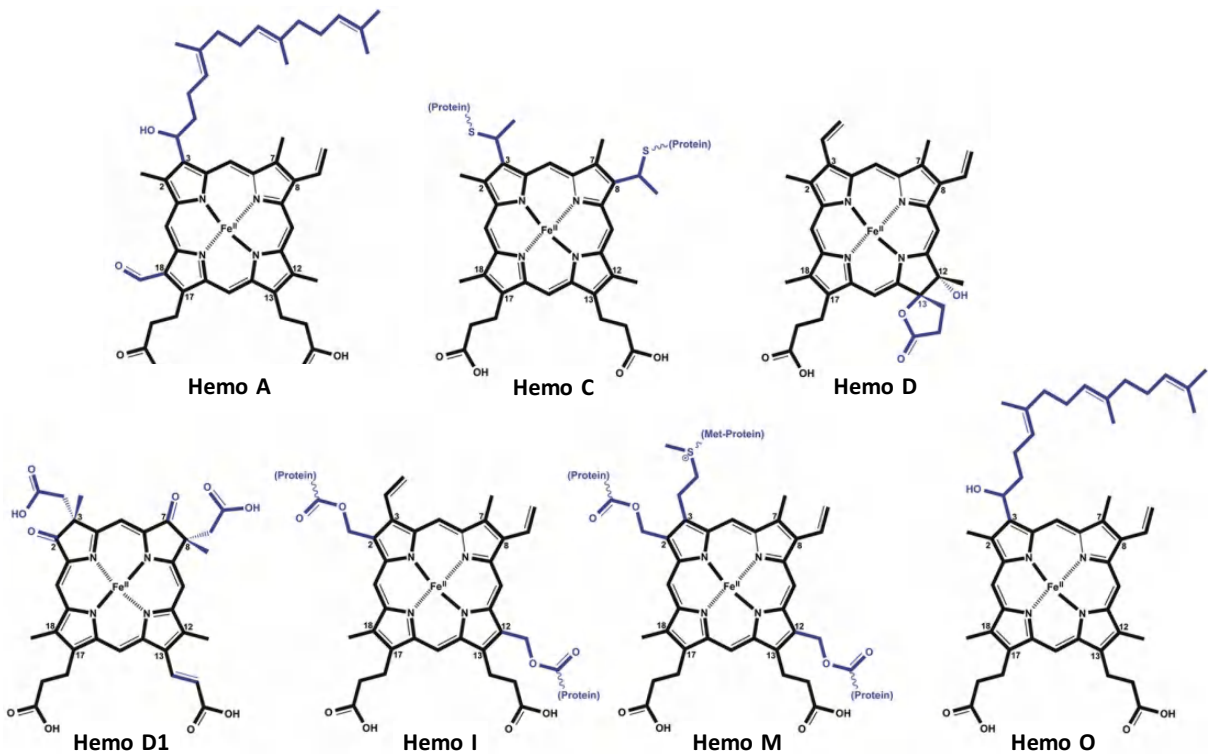


Figura 1.9. Estructura de los diferentes tipos de hemo encontrados en la naturaleza. Las diferencias en las cadenas laterales con respecto a la molécula básica de hemo B (arriba) se muestran en azul. Imagen adaptada de (128).

Diversas modificaciones en las cadenas laterales de esta molécula básica denominada **hemo B**, da lugar a otros tipos de hemo biológicamente importantes encontrados en la naturaleza (A, C, D, D1, I, M y O) (Figura 1.9), algunos de los cuales son específicos de especie y llevan a cabo funciones altamente especializadas (128).

2.1 Importancia del hemo y su homeostasis

La capacidad que tiene el hierro de llevar a cabo cambios reversibles en su estado de oxidación, le permite al grupo hemo participar en diversas reacciones enzimáticas esenciales para el metabolismo celular (129). El grupo hemo sirve como **grupo prostético de hemoproteínas** con función enzimática, transportadora o receptora, por lo que el hemo es dirigido a hemoproteínas tanto solubles como unidas a membranas. La capacidad de funcionar en ambos entornos se debe a la naturaleza anfipática del grupo hemo, cuyo anillo porfirínico lo hace insoluble en soluciones acuosas pero le permite integrarse en las membranas, mientras que las cargas negativas de los grupos propionato

que equilibran las cargas positivas del hierro en estado ferroso le confieren un carácter hidrofílico (130). El hemo participa en las reacciones de óxido-reducción catalizadas por hemoproteínas como los citocromos, componentes integrales de la cadena transportadora de electrones respiratoria y fotosintética. Adicionalmente, el hemo forma parte como grupo prostético de hemoproteínas citosólicas como la hemoglobina y mioglobina, encargadas del transporte de oxígeno a los tejidos, óxido nítrico sintetasa y guanilato ciclasa, necesarias para el funcionamiento de vías de señalización celular, citocromos P450 importantes en la detoxificación de xenobióticos en el hígado y síntesis de hormonas esteroideas, catalasas y peroxidasas, involucradas en la activación y degradación del peróxido de hidrógeno y la subsecuente acción microbicida y antioxidante, respectivamente, y otras hemoproteínas transductoras de señales y sensoras para gases diatómicos gracias a la capacidad del hemo de unirse a CO, NO y O₂ (revisado en (131)). Además de su función como grupo prostético de hemoproteínas, el hemo también actúa como **molécula señalizadora**. El hemo participa en la modulación de la expresión génica controlando la actividad de factores de transcripción específicos o mediante su unión a elementos reguladores en *cis* HRE (Heme Responsive Elements), además de intervenir en el procesamiento y estabilidad de los ARNm, y la maduración post-transcripcional de diferentes proteínas mediante su unión al motivo HRM (Heme Regulatory Motif) (132). Además, el hemo media la diferenciación y proliferación de distintos tipos celulares e interviene como mensajero celular regulando el estado de fosforilación de factores de iniciación de la traducción, en particular de la subunidad α del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2 α) (133).

A pesar de su participación en múltiples funciones vitales para las células, el grupo hemo en su estado libre cataliza la formación de ROS, desencadenando estrés oxidativo y daño celular. Las ROS llevan a la oxidación de macromoléculas como ADN, proteínas y carbohidratos, además altera la expresión de proteínas y perturba los canales de membrana (134). Debido a su naturaleza lipofílica, el hemo puede intercalarse entre la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, en donde el hierro cataliza su oxidación e induce la formación de peróxidos lipídicos citotóxicos, dando como resultado la permeabilización de la membrana y la posterior muerte celular por apoptosis (135). Adicionalmente, el hemo libre es una molécula hemolítica y proinflamatoria, ya que altera la estabilidad de la membrana de los eritrocitos e induce el reclutamiento de leucocitos y

plaquetas al endotelio vascular y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (134).

Por lo tanto, los niveles intracelulares y extracelulares de hemo deben ser estrictamente controlados para mantener su homeostasis y evitar las condiciones patológicas asociadas a su citotoxicidad. Los mamíferos disponen de varios sistemas que regulan el contenido de hemo extracelular previniendo su toxicidad, principalmente mediante las proteínas plasmáticas Haptoglobina (Hp) y Hemopexina (Hx) (134). Durante la hemólisis intravascular, la hemoglobina (Hb) y el hemo son liberados a la circulación. La Hp es una glicoproteína que se une de manera irreversible a la Hb extracelular estabilizando su estructura proteica, evitando los efectos tóxicos derivados de la degradación de la globinas y la peroxidación de LDL que desencadenan respuestas inflamatorias y citotóxicas, respectivamente (136). La formación del complejo Hp-Hb promueve su endocitosis mediada el receptor de membrana CD163 presente en monocitos/macrófagos, luego de lo cual la Hb es degradada en péptidos, aminoácidos y hemo en endosomas tempranos (137,138). Este hemo es transportado al citosol a través de la proteína HGR1, en donde es degradado por la acción de la hemo oxigenasa para el reciclaje del hierro (Figura 1.16). Por otra parte, la Hx es una glicoproteína plasmática que presenta una alta afinidad por el hemo, promoviendo su unión y la formación del complejo Hx-Hemo, que permite su transporte en un estado soluble en la circulación evitando los daños oxidativos inducidos por el hemo libre (139). Este complejo Hx-Hemo también es endocitado por los monocitos/macrófagos a través del receptor de membrana CD91, después de lo cual el hemo es degradado por acción de la hemo oxigenasa y biliverdina reductasa en el citoplasma celular (140) (Figura 1.16).

La regulación de los niveles de hemo intracelular ocurre en múltiples niveles, incluyendo la biosíntesis mitocondrial, degradación, y tráfico intracelular mediante transportadores específicos y chaperonas, que median su expulsión y distribución a los diferentes orgánulos celulares donde es requerido como grupo prostético de hemoproteínas (141).

2.2 Biosíntesis del grupo hemo

El hemo se sintetiza a través de una ruta biosintética de siete pasos enzimáticos muy conservada evolutivamente, la cual puede ser dividida en tres partes: (i) la formación

de del ácido 5-aminolevulínico (ALA), (ii) la formación del primer tetrapirrol cíclico uroporfirinógeno III y (iii) la conversión del uroporfirinógeno III en hemo (142). La molécula precursora ALA puede ser sintetizada mediante reacciones enzimáticas a partir de glutamato (ruta C-5) o por la condensación de succinil-CoA y glicina (ruta de Shemin) catalizada por la ALA-sintasa (ALAS). La ruta C-5 está presente en la mayoría de bacterias, arqueas y plantas, mientras que la ruta de Shemin está presente en eucariotas no fotosintéticos (animales y hongos) y α -proteobacterias. Los siguientes tres pasos de la síntesis de hemo son comunes a la biosíntesis de todos los tetrapirroles. Dos moléculas de ALA son condensadas por la acción de la ALA dehidratasa (ALAD) dando lugar al monopirrol porfobilinógeno (PBG). Posteriormente, cuatro moléculas de PBG se condensan por acción de la PBG deaminasa (PBGD) produciendo el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano (HMB), el cual pasa directamente a la uroporfirinógeno sintasa (UROS) que lo convierte en uroporfirinógeno III (URO), el primer intermediario cíclico de la ruta. A partir de aquí la ruta se ramifica para conducir a la síntesis de hemo mediante una serie de reacciones de decarboxilación y decarboxilación oxidativa catalizadas por enzimas específicas. La uroporfirinógeno III decarboxilasa (UROD) cataliza la decarboxilación de 4 residuos de acetato del uroporfirinógeno III, llevando a la formación del coproporfirinógeno III (CPIII), el cual es transformado a protoporfirinógeno IX (PPGIX) por la acción de la coproporfirinógeno oxidasa (CPOX) que cataliza la conversión de dos residuos de propionato de los anillos A y B del tetrapirrol en grupos vinilo. El penúltimo paso consiste en la aromatización del PPGIX a protoporfirina IX (PPIX), catalizado por la protoporfirinógeno oxidasa (PPOX). Finalmente, la enzima ferroquelatasa (FeCH) cataliza la incorporación de un ión ferroso en la protoporfirina IX llevando a la formación de hemo (Figura 1.10) (143).

Debido a la toxicidad de los productos intermediarios de la ruta de síntesis de hemo, el producto de cada reacción debe ser rápidamente liberado a la siguiente enzima para evitar la acumulación de moléculas citotóxicas (132). De hecho, el mal funcionamiento de esta ruta de síntesis en humanos lleva a desordenes metabólicos severos denominados porfirias, caracterizados por ataques neurovisceralos agudos y/o fotosensibilidad como resultado de los efectos neurotóxicos de los precursores de la ruta acumulados en las células y a las propiedades fluorescentes de las porfirinas, respectivamente (144). En eucariotas, las enzimas que catalizan los pasos centrales de la ruta de síntesis de hemo están localizadas en el citosol, mientras que la primera (ALAS)

y las tres últimas enzimas (CPOX, PPOX y FeCH) están ubicadas en la membrana mitocondrial (144).

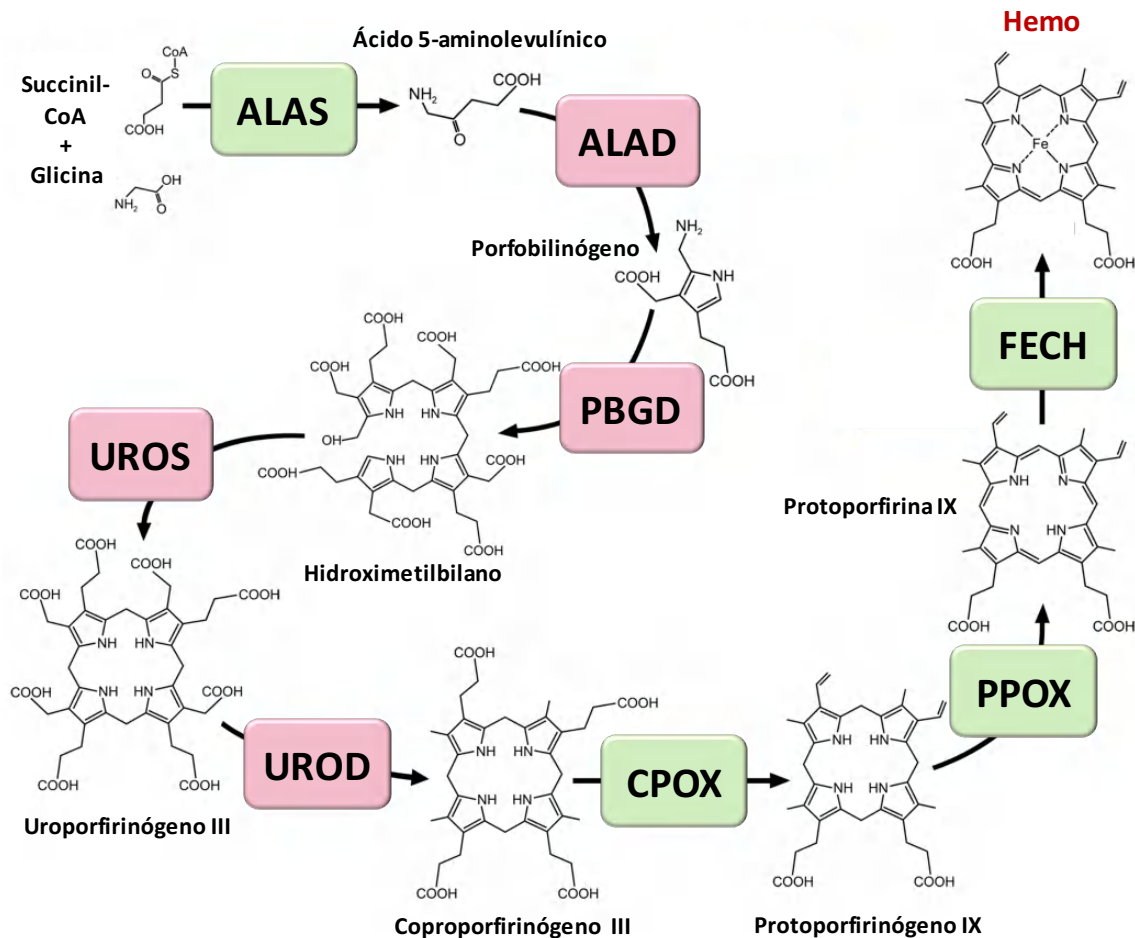


Figura 10. Ruta biosintética del grupo hemo en mamíferos. La figura muestra las estructuras de los intermediarios de la ruta que llevan a la formación de hemo a partir de ALA. Los pasos enzimáticos que ocurren en la mitocondria se enseñan en color verde, los pasos restantes que ocurren en el citosol de la célula se muestran en rosa. Imagen adaptada de (145).

2.2.1 Coproporfirinógeno Oxidasa (CPOX)

La CPOX es la antepenúltima enzima de la ruta de biosíntesis de hemo que cataliza la descarboxilación oxidativa de los grupos propionato de los anillos A y B del CPIII en grupos vinilo, para la formación de PPGIX (146) (Figura 1.11).

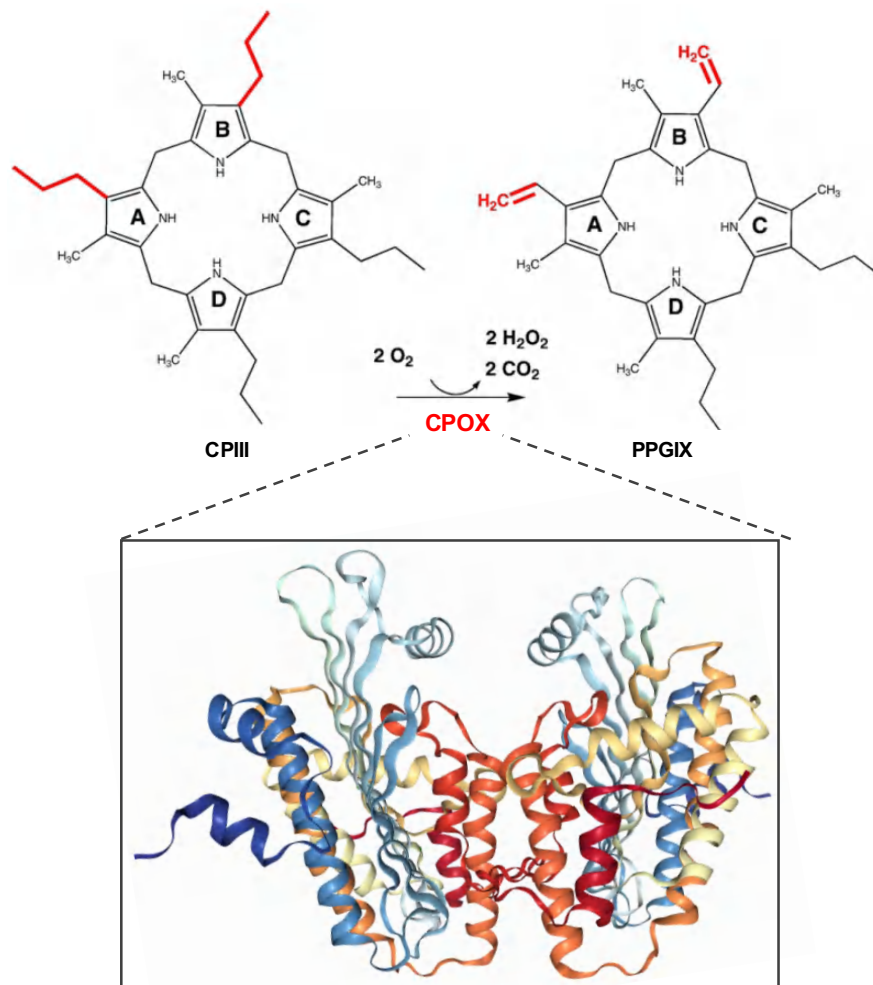


Figura 1.11. Reacción catalizada por la enzima coproporfirinógeno oxidasa (CPOX). La oxidación de los grupos propionato (en rojo) de los anillos A y B del CPIX lleva a la formación de grupos vinilo (en rojo) en la PPIX. Se muestra la reacción catalizada por la enzima CPOX dependiente de oxígeno, en la cual se liberan dos moléculas de CO₂ y dos moléculas de H₂O₂, y la estructura proteínica de la CPOX humana (PDB 2AEX). Imagen adaptada de (144).

Existen dos formas de la enzima en la naturaleza, una cataliza la reacción de forma dependiente de oxígeno y se denomina HemF, mientras que la otra lo hace de forma independiente de oxígeno y se denomina HemN. Estos dos tipos de CPOX no comparten ninguna identidad en la secuencia de aminoácidos, lo que sugiere que ambas evolucionaron de manera independiente. Las CPOXs tipo HemF requieren oxígeno como aceptor terminal de electrones y están presentes en animales y microorganismos aerobios, mientras que las enzimas tipo HemN requieren la S-adenosil-L-metionina (SAM) y NADPH para catalizar la descarboxilación oxidativa del CPIX durante la síntesis de hemo y bacterioclorofila en la mayoría de las bacterias anaerobias o anaerobias facultativas (143). En los mamíferos está presente la CPOX tipo HemF, la cual se localiza en el

espacio intermembrana de la mitocondria asociándose principalmente al lado interno de la membrana mitocondrial externa (Figura 1.15) (147). La enzima HemF humana presenta un péptido señal inusualmente largo (110 aminoácidos) que la dirige a la mitocondria, el cual es procesado proteolíticamente para dar lugar a una proteína madura de 37 kDa (148). La HemF humana funciona como un homodímero sin la presencia de un centro metálico o cofactor que medie su actividad (149,150). Dentro de los aminoácidos conservados entre las CPOX aeróbicas se encuentran 4 residuos de histidina, los cuales parecen ser críticos para la función catalítica de las enzimas; sin embargo, dichos residuos de histidina no son esenciales para la actividad catalítica de la CPOX humana y solo parecen ser importantes para mantener su conformación nativa (151).

Por el contrario, la CPOX tipo HemF de *S. cerevisiae* codificada por el gen *Hem13*, es una proteína dimérica localizada en el citosol, debido a la ausencia de un péptido señal en su región N terminal que regule su transporte a la mitocondria (152,153). La Hem13 solo es activa en presencia de oxígeno como aceptor de electrones, y su expresión es inducida bajo condiciones de deficiencia de oxígeno o hemo (154,155). Interesantemente, *E. coli* expresa ambas formas de la CPOX y presentan actividad catalítica durante la síntesis de hemo. La CPOX tipo HemF de *E. coli* es una proteína dimérica dependiente de manganeso que requiere oxígeno como aceptor de electrones, y cuyos residuos conservados de histidina son esenciales posiblemente por su participación en la unión del metal o la porfirina; mientras que la CPOX tipo HemN es una proteína monomérica que presenta 4 residuos conservados de cisteína esenciales para la formación del clúster [4Fe-4S] y la actividad de la enzima, la cual requiere la presencia de SAM y NADPH como aceptores de electrones (156–158).

Diversas mutaciones en el gen CPOX humano causan una disminución significativa o la pérdida total de la actividad enzimática, lo que genera un trastorno denominado coproporfiria hereditaria. Esta porfiria se caracteriza principalmente por ataques neurovisceral agudos, los cuales también pueden estar acompañados de fotosensibilidad de la piel (159).

2.2.2 Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX)

La PPOX cataliza la penúltima reacción en la ruta de síntesis de hemo, que consiste en la oxidación de 6 electrones de la PPGIX para dar lugar a un tetrapirrol con dobles enlaces conjugados (PPIX), lo que le confiere color (143) (Figura 1.12).

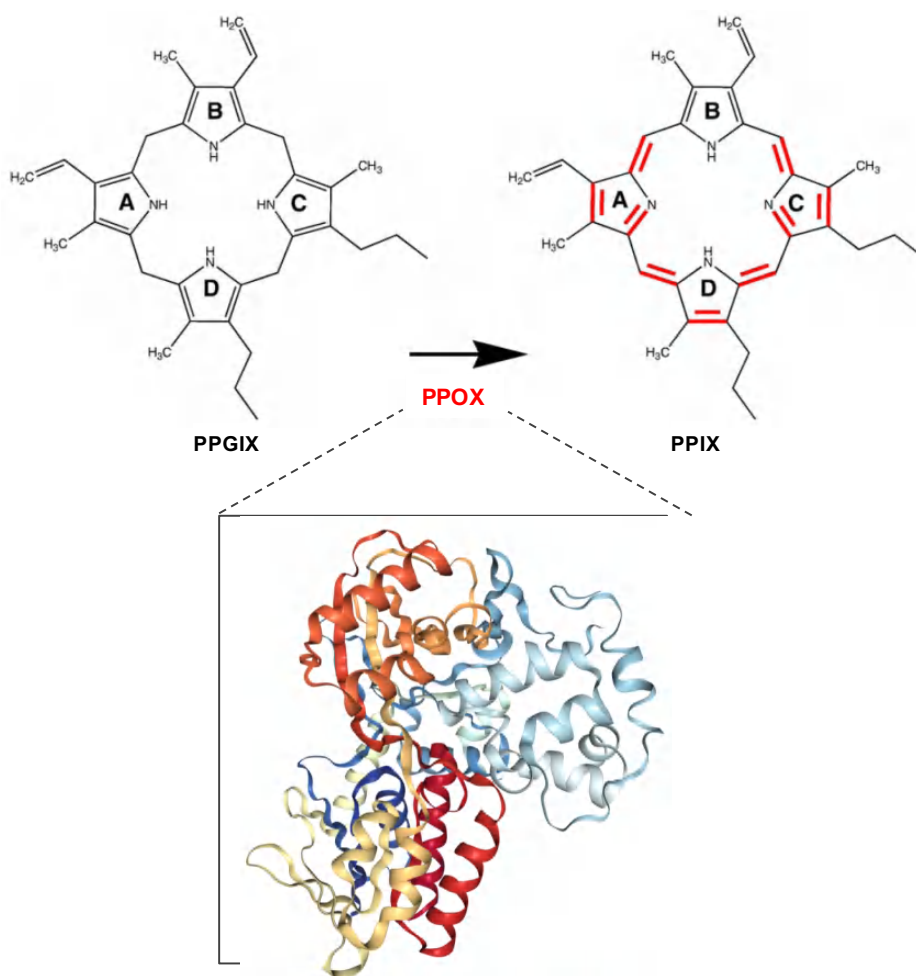


Figura 1.12. Reacción catalizada por la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPOX). La aromatización de PPGIX a PPIX ocurre mediante la oxidación de 6 electrones, en una reacción que puede ser dependiente o independiente de oxígeno. Se muestra la estructura proteínica de la PPOX humana (PDB 3NKS). Imagen adaptada de (144).

Aunque dicha reacción puede ocurrir espontáneamente, la conversión enzimática del PPGIX es requerida para la correcta canalización del precursor PPIX hasta la ferroquelatasa o magnesio quelatasa para la inserción de los iones metálicos correspondientes (160). Hasta la fecha se han encontrado 3 isoformas de proteínas con actividad protoporfirinógeno oxidasa, las cuales difieren en su requerimiento de oxígeno y el tipo de cofactor empleado para llevar a cabo la reacción. La PPOX tipo HemY,

inicialmente identificada en *S. cerevisiae*, es una oxidasa dependiente de oxígeno que utiliza como cofactor el dinucleótido de flavina adenina (FAD), y está presente en la mayoría de eucariotas y muchas bacterias aerobias o aerobias facultativas. Por su parte las enzimas tipo HemG están presentes en γ -proteobacterias como *E. coli*, y presentan actividad tanto en condiciones aerobias como anaerobias utilizando el mononucleótido de flavina (FMN) como cofactor. La isoforma HemJ, recientemente identificada en cianobacterias, es activa bajo condiciones anaerobias y aun es desconocido si requiere la presencia de un cofactor (161). La enzima PPOX tipo HemY humana funciona como un homodímero, con un FAD unido de manera no covalente a cada una de las subunidades, y un péptido señal en el extremo N-terminal que la dirige a la membrana mitocondrial interna, en donde se localiza de cara al espacio intermembrana (Figura 1.15) (144). Por su parte las HemY de algunas bacterias Gram positivas como *B. subtilis*, son monómeros solubles (162). A diferencia de las enzimas tipo HemY dependientes de oxígeno, la PPOX tipo HemG de *E. coli* emplea menaquinona como aceptor final de electrones. Esta característica podría explicar la asociación de la HemG soluble de *E. coli* a la membrana y la estrecha relación de su actividad enzimática con la respiración celular, puesto que los componentes de la cadena respiratoria (incluyendo la reserva de menaquinona-8) están localizados en la membrana bacteriana (163).

Las plantas poseen dos tipos de HemY que se asocian a las membranas internas de los orgánulos donde se localizan; la PPX1 está involucrada en la síntesis de clorofila y hemo en los plastidios mientras que la PPX2 es responsable de la síntesis de hemo en la mitocondria (164). La enzima PPOX es el principal blanco de herbicidas del grupo de los difeniléteres como el acifluorfen (ACF) y el lactofen (LAC), los cuales inhiben la síntesis de clorofila y conducen a la acumulación de PPGIX. Esta acumulación lleva a la formación no enzimática de PPIX en el citoplasma, la cual en presencia de luz induce la formación singletes de oxígeno que median la peroxidación lipídica de las membranas y la muerte celular (165).

En humanos, la reducción de la actividad enzimática de la proteína PPOX debido a mutaciones en su secuencia, causa una enfermedad conocida como porfiria variegata, una porfiria hepática autosómica dominante caracterizada por una sobreproducción y mayor excreción de porfirinas y precursores de porfirinas, que se manifiesta clínicamente con fragilidad de la piel, fotosensibilidad y crisis neurológicas agudas (166).

2.2.3 Ferroquelatasa (FECH)

La ferroquelatasa es la enzima encargada de catalizar el último paso de la biosíntesis del grupo hemo, el cual consiste en la inserción de un ion ferroso en el anillo tetrapirrólico de protoporfirina IX, llevando a la formación de hemo (143) (Figura 1.13).

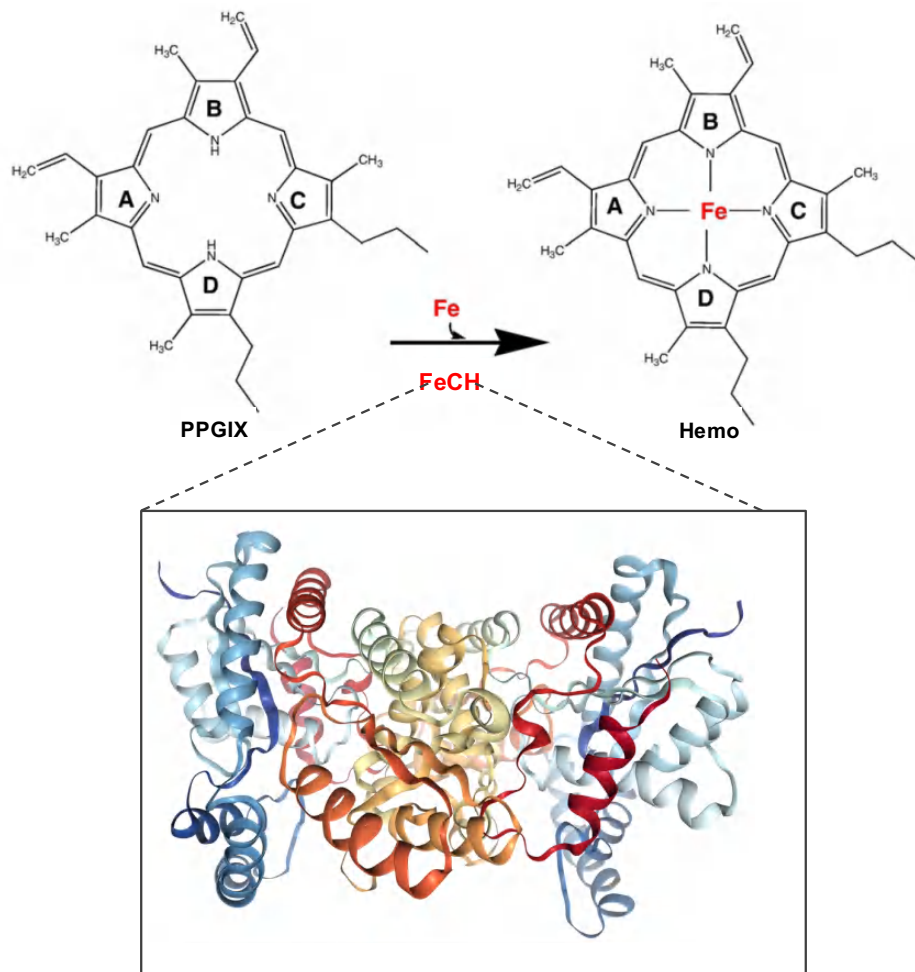


Figura 1.13. Reacción catalizada por la enzima ferroquelatasa (FeCH). Dos protones de los nitrógenos presentes en el anillo tetrapirrólico de PPIX son intercambiados por hierro divalente. Se muestra la estructura proteína de la FeCH humana (PDB 1HRK). Imagen adaptada de (144).

Ambos sustratos (PPIX y Fe^{2+}) son bioquímicamente inestables y potencialmente tóxicos para la célula, lo que supone que el metabolismo mitocondrial del hierro y la síntesis de porfirinas deben estar altamente sincronizados, lo cual ha sido recientemente demostrado mediante la identificación de un complejo multiproteico mitocondrial del que se hablará en el siguiente apartado. El análisis de las secuencias de aminoácidos de las FeCHs de diversas especies indica que existe una identidad global bastante baja

(aproximadamente 10%) con solo 20 residuos conservados entre ellas, tres de los cuales se localizan en el centro activo de la enzima. Estos residuos H263, F337 and E343 (numerados de acuerdo a la secuencia de la FeCH humana), están implicados en la unión a metales, extracción de protones y la interacción con PPIX (167). La FeCH humana es una proteína homodimérica que presenta un péptido señal en su extremo N-terminal que la dirige a la membrana mitocondrial interna, donde se orienta hacia la matriz mitocondrial (Figura 1.15), mientras que en su región C-terminal presenta una secuencia de 30-50 aminoácidos involucrados en la coordinación de los clúster $[2Fe-2S]$ y la estabilización del dímero (168). Estos clúster $[2Fe-2S]$ han sido observados principalmente en las FeCHs de origen animal, con algunas excepciones en hongos y bacterias, cuya única función asignada hasta el momento es el mantenimiento de la integridad estructural de la enzima (169). Por su parte, las FeCHs de origen procariota son estructuralmente más diversas que sus homólogos eucariotas. La gran mayoría son solubles y se encuentran presentes en el citoplasma de las células, donde pueden adoptar conformaciones monoméricas u homodiméricas e inclusive presentar clúster $[2Fe-2S]$ (170). En plantas existen dos isoformas de la FeCH, las cuales parecen estar localizadas solo en los cloroplastos en donde el hemo es altamente requerido para los citocromos de la maquinaria fotosintética, por lo que se ha sugerido que la síntesis de hemo en plantas ocurre casi exclusivamente en dichos orgánulos desde donde puede ser exportado al citosol y a la mitocondria (171). Recientemente se ha demostrado que la actividad FeCH en la mitocondria de las plantas puede ser mediada por la frataxina, la cual es capaz de catalizar la formación de hemo *in vitro* en presencia de hierro y PPIX, sugiriendo que dicha proteína podría estar involucrada en una ruta alternativa que proporcione hemo a las diversas hemoproteínas presentes en la mitocondria (172).

Mutaciones en el gen de la FeCH causan la porfiria eritropoyética, una enfermedad caracterizada por la acumulación de PPIX principalmente en los reticulocitos de la médula ósea, la cual es absorbida en el hígado y excretada en la bilis, lo que conduce a cálculos biliares, colestasis y cirrosis. La característica clínica dominante es la fotosensibilidad cutánea que suele manifestarse desde la infancia, en la cual la piel adquiere una textura coriácea que imita el envejecimiento prematuro (144).

2.3 Degradación del hemo

El único mecanismo fisiológico conocido para la degradación de hemo en vertebrados es mediante la acción enzimática de la proteína hemo oxigenasa (HO), la cual juega un papel fundamental en el control de los niveles intracelulares de hemo protegiendo a las células del estrés oxidativo inducido por su acumulación (173). La HO se localiza principalmente en la membrana del retículo endoplasmático liso, y utiliza NADPH y oxígeno para llevar a cabo la degradación del grupo hemo en hierro (Fe^{2+}), monóxido de carbono (CO) y biliverdina (174) (Figura 1.16). Posteriormente, la biliverdina es reducida a bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa (BVR), y transportada al hígado por medio de proteínas plasmáticas, especialmente la albúmina. Mientras la bilirrubina captura radicales peroxilo inhibiendo la peroxidación lipídica inducida por el hemo, el hierro libre es capturado por la ferritina, proteína que actúa como principal depósito intracelular de hierro no metabólico (175). Se han identificado 3 isoformas de la HO: HO-1, HO-2 y HO-3. La HO-1 es inducible por diversos estímulos como estrés oxidativo, choque térmico, aumento en los niveles intracelulares de hemo e infección por *Leishmania* spp., mientras que la HO-2 y HO-3 son constitutivamente expresadas y participan en los procesos celulares dependientes de hemo (105,134). La regulación de la expresión de la isoforma HO-1 esta principalmente regulada por la proteína represora Bach1, la cual se une al HRE presente en la región promotora de *HO-1*. Cuando los niveles intracelulares de hemo son elevados, el hemo se une a Bach1 induciendo un cambio conformacional que disminuye su capacidad de unión al ADN, seguido de la unión de heterodímeros (Nrf2-Maf) a este mismo elemento, lo cual induce la transcripción y la expresión de la HO-1 con el fin de regular los niveles intracelulares de hemo (176). La mayoría del hemo destinado a la degradación en mamíferos proviene de la hemoglobina liberada por los glóbulos rojos senescentes que son fagocitados por los macrófagos del sistema reticuloendotelial. El hierro liberado por la HO puede ser almacenado dentro de los macrófagos en combinación con ferritina o ser exportado de las células a través de la ferroportina, y una vez en circulación unirse a la transferrina para ser reciclado (129).

2.4 Tráfico del grupo hemo y sus intermediarios en mamíferos

Luego de su síntesis en la matriz mitocondrial, el ALA debe ser transportado a través de las membranas interna (MI) y externa (ME) de la mitocondria hacia el citosol en donde se localizan las siguientes enzimas de la ruta biosintética del hemo. Se ha propuesto que las proteínas SLC25A38 (solute carrier family 25, member 38) y ABCB10 son las encargadas de la exportación de ALA desde la mitocondria (132). Mutaciones en **SLC25A38** causan anemia sideroblástica hereditaria en humanos, un desorden hematológico caracterizado por la acumulación de hierro y defectos en la síntesis de hemo, mientras que en levaduras la delección del gen ortólogo *hem25* disminuye los niveles citosólicos de ALA y hemo, sugiriendo que SLC25A38 facilita la producción de ALA mediante el importe de glicina a la mitocondria o que participa en el intercambio de glicina por ALA a través de la MI mitocondrial (Figura 1.15) (177,178). Recientemente se ha demostrado que ambas proteínas, Hem25p en levaduras y su ortólogo humano SLC25A38, son los principales transportadores de glicina a la mitocondria, sustrato requerido para iniciar la síntesis de hemo en la mitocondria (178,179). Por su parte se ha propuesto que el transportador **ABCB10**, también localizado en la MI mitocondrial, puede facilitar la síntesis de ALA o su salida desde la mitocondria, aunque otros autores excluyen su participación en este proceso (180,181). Lo que si está claro es que ABCB10 forma un complejo multiproteico con la enzima FeCH y con la **MFRN1** (mitoferrina 1), proteína mitocondrial involucrada en el transporte de hierro al interior de la mitocondria, las cuales actúan sinérgicamente en la obtención del hierro y su incorporación en el anillo de PPIX para la formación del grupo hemo (Figuras 1.14 y 1.15) (182,183). La proteína ABCB10, además de estabilizar la MFRN1, también podría participar en el transporte del hemo sintetizado *de novo* en la mitocondria (141). La inestabilidad del hierro ferroso implica que este debe ser directamente canalizado hasta la FeCH por la MFRN1 o a través de una chaperona estabilizadora. Existe evidencia que la FeCH interactúa con la frataxina, una chaperona de hierro mitocondrial, la cual posiblemente sea la encargada de ceder el hierro ferroso requerido para la síntesis de hemo (169). También se ha propuesto que el hierro obtenido por endocitosis de los complejos hierro-transferrina/receptores de transferrina (TRFC), sea liberado a la FeCH mediante una interacción transitoria entre el endosoma y la mitocondria a través de un mecanismo conocido como “*kiss and run*” (184).

La FeCH interactúa físicamente con ABCB10 y ABCB7 al unirse cerca de las regiones NBD (Nucleotide-Binding Domain) de cada proteína, dando lugar a una interacción indirecta entre ambos transportadores y la formación de un complejo multiproteico mitocondrial requerido para la coordinación del metabolismo del hierro (185). Además de estas proteínas, se ha reportado que PPOX, ALAS2, SUCLA2 (subunidad beta de la succinil-CoA sintasa), PGRMC1, TMEM14C y ANT también están presentes en dicho complejo mitocondrial, formando un metabolón (186,187) (Figura 1.14). La proteína **TMEM14C** está localizada en la MI mitocondrial y es la responsable de transportar la PPGIX a la matriz mitocondrial después de su formación en el espacio intermembrana por acción de la enzima CPOX (188), mientras que la proteína **ANT** (Adenine Nucleotide Translocator) sirve como una ruta alternativa para el transporte de PPIX (189). La asociación de TMEM14C, ANT, PPOX y FeCH en el complejo multiproteico facilitarían la canalización de los intermediarios metabólicos altamente reactivos (PPGIX y PPIX) evitando su citotoxicidad y garantizando que no sean desviados a otras posibles reacciones (186).

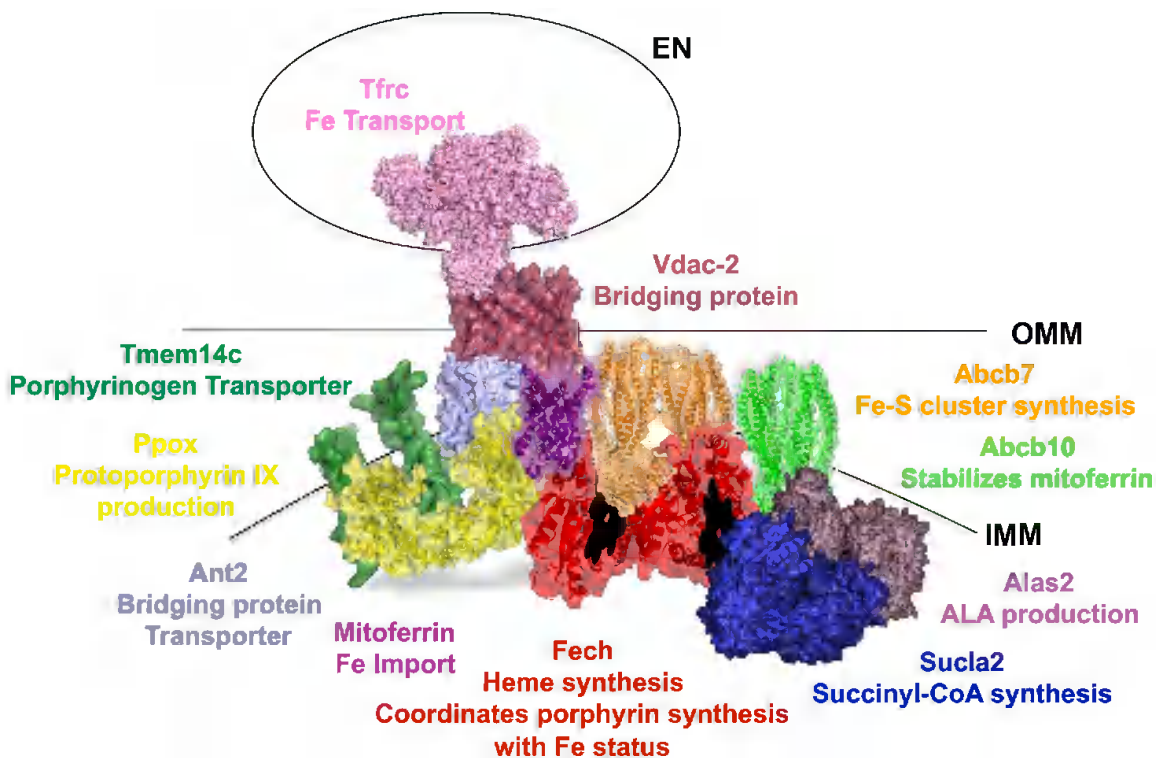


Figura 1.14. Modelo propuesto del complejo de proteínas asociadas con el metabolismo mitocondrial del hemo. Se muestran las proteínas del complejo y sus funciones en la homeostasis de las porfirinas, hierro y hemo. No se muestra la proteína PGRMC1 ni las proteínas adicionales que pueden estar involucradas en la unión de proteínas asociadas. IMM: membrana mitocondrial interna, OMM: membrana mitocondrial externa, EN: endosoma. Imagen tomada de (187).

El transportador **ABCB7**, localizado en la MI mitocondrial, está implicado en la biosíntesis de los clústeres hierro-azufre [2Fe-2S] citosólicos y es esencial para la hematopoyesis (190,191). Por lo tanto, su participación en el complejo mitocondrial anteriormente descrito podría estar relacionada con el ensamblaje o estabilización del clúster [2Fe-2S] de la FeCH (187), la disponibilidad del hierro destinado a la incorporación en el anillo de PPIX (190) o incluso es posible especular que la hidrólisis de ATP por este transportador pueda conducir a un reordenamiento conformacional de la FeCH que le permita abrir su hendidura y liberar el hemo recién sintetizado (185). Por su parte, la proteína **PGRMC1** (Progesterone Receptor Membrane Component 1) es una chaperona de hemo que interactúa directamente con la FeCH participando en la liberación del hemo recién sintetizado para su tráfico dentro de la mitocondria (192).

Dado que los tres últimos pasos de biosíntesis de hemo ocurren en la matriz mitocondrial, es necesario que el intermediario CPIII sea translocado desde el citosol a la mitocondria. Se ha sugerido que el transportador **ABCB6** está localizado en la ME mitocondrial e interactúa de manera específica con porfirinas mediando su transporte desde el citosol, indicando que CPIII podría ser el sustrato más probable (Figura 1.15) (193). Recientemente se confirmó que CPIII, además de presentar una alta afinidad por el transportador ABCB6, estimula su actividad ATPasa aproximadamente 5 veces por encima de su actividad basal y la posterior translocación del sustrato a través de la membrana lipídica (194). Sin embargo, ABCB6 también está presente en membrana plasmática y lisosomas de eritrocitos, y su función no parece ser esencial para la biosíntesis de hemo en la línea celular K562, sugiriendo que ABCB6 no media el transporte directo de porfirinas a la mitocondria (195). Adicionalmente ratones mutantes nulos para ABCB6 son viables y hematológicamente normales, y su deficiencia en humanos, que da lugar a un nuevo grupo sanguíneo denominado Lan(-), no ocasiona ninguna alteración clínica aparente (196,197). Solo en pacientes con variedades de porfirias, la deficiencia de ABCB6 está fuertemente asociado con la intensificación de la enfermedad (198). Por lo tanto, el papel de ABCB6 en la translocación de porfirinas a la mitocondria sigue siendo controversial. También se ha sugerido que el transportador OGC (2-oxoglutarate carrier) puede ser responsable de la acumulación de porfirinas en la mitocondria, cumpliendo la misma función que ABCB6 (199).

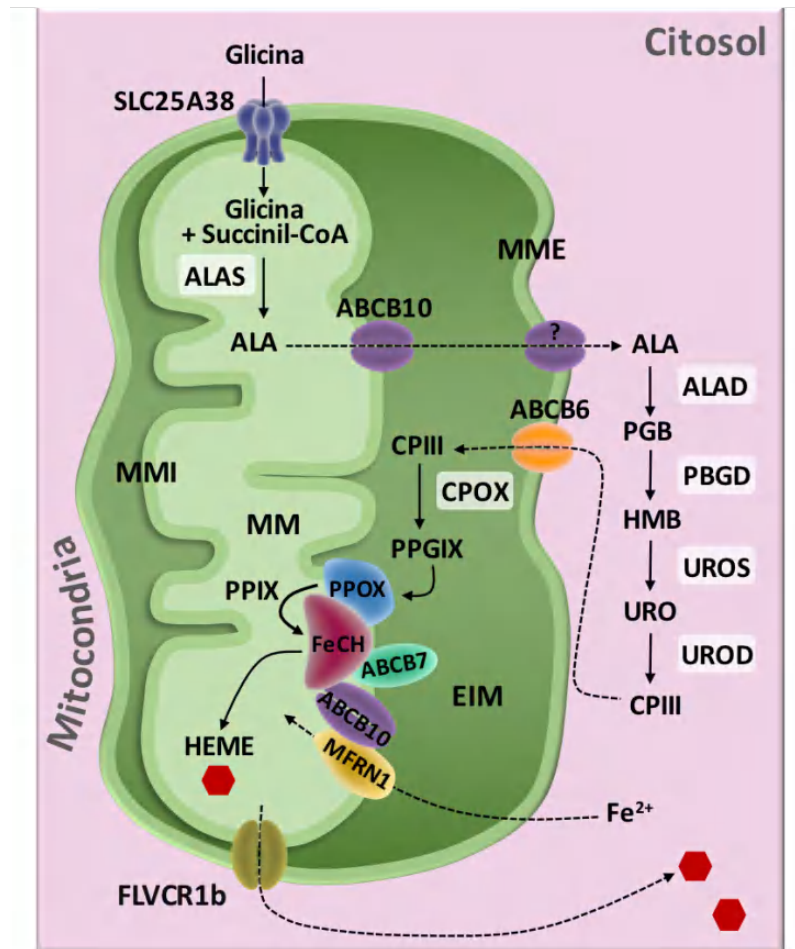


Figura 1.15. Síntesis de hemo y transportadores mitocondriales. En eucariotas la síntesis de hemo es catalizada por 8 pasos enzimáticos, 4 de los cuales tienen lugar en la mitocondria y 4 en el citosol, por lo que los intermediarios ALA, CPIII y el sustrato de glicina necesitan ser transportados a través de las membranas mitocondriales. SLC25A38 participa en el transporte de glicina al interior de la mitocondria, donde se condensa con succinil-CoA para la formación de ALA por acción de ALAS. El intermediario ALA podría ser transportado fuera de la mitocondria por el transportador ABCB10 localizado en la MMI. En el citosol el ALA es convertido a CPIII, que es transportado de vuelta al EIM de la mitocondria posiblemente por el transportador ABCB6, donde es convertido a PPGIX por la enzima CPOX. La conversión de PPGIX a PPIX es catalizada por la enzima PPOX, la cual se localiza en la MMI de cara al EIM. La FeCH, localizada en la MMI orientada hacia la MM, cataliza la adición de hierro a la PPIX para generar hemo. En este proceso intervienen un conjunto de proteínas mitocondriales que participan en el transporte de hierro y porfirinas en la mitocondria, y en la liberación del hemo recién sintetizado (Figura 14). El hemo es transportado fuera de la mitocondria por el transportador mitocondrial FLVCR1b. MME: membrana mitocondrial externa, MMI: membrana mitocondrial interna, EIM: espacio intermembrana, MM: matriz mitocondrial.

Una vez sintetizado en la matriz mitocondrial, el hemo debe ser transportado fuera de la mitocondria para su distribución a las hemoproteínas. La presencia de carboxilatos

en la molécula de hemo que le impiden difundir a través de las membranas, sumado a su capacidad de catalizar la producción de ROS e inducir la peroxidación lipídica, implica que este metabolito deba ser movilizado a través de las bicapas lipídicas mediante proteínas transportadoras o chaperonas (200).

El hemo es transportado fuera de la mitocondria por la proteína FLVCR1 (Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor 1), la cual presenta dos isoformas, FLVCR1a y FLVCR1b. El transportador FLVCR1 pertenece a la superfamilia de proteínas MFS (Major Facilitator Superfamily), una familia de transportadores que participan en el movimiento de pequeñas moléculas como nucleósidos, aminoácidos, azúcares, oligosacáridos, y una amplia variedad de aniones y cationes orgánicos e inorgánicos a través de la membrana celular (201). La isoforma **FLVCR1b** es resultado de una transcripción alternativa en el primer intrón del gen *Flvcr1* dando como resultado una proteína de menor tamaño. FLVCR1b presenta 6 dominios transmembrana y es localizado en la mitocondria, siendo la isoforma involucrada en el transporte de hemo desde la mitocondria al citosol (Figura 1.15). La sobreexpresión de dicho transportador promueve la síntesis de hemo mientras que su silenciamiento causa la acumulación de hemo mitocondrial, por lo que cumple un papel esencial en la diferenciación eritroide tanto *in vitro* como *in vivo* (202). Por su parte **FLVCR1a**, es un transportador con 12 dominios transmembrana localizado en la membrana plasmática que participa en el transporte del grupo hemo al exterior celular, siendo esencial para el proceso de eritropoyesis (Figura 1.16) (203,204). La hemopexina interactúa directamente con FLVCR1a actuando como proteína aceptora del hemo intracelular exportado por el transportador, desempeñando un papel importante en el transporte de hemo en los macrófagos y el reciclaje del hierro. Además, se ha demostrado que el transportador FLVCR1a también puede exportar otras porfirinas como PPIX y coproporfirina (205). La expresión de FLVCR1a y FLVCR1b parece estar finamente coordinada, lo cual contribuye a que el hemo citosólico se mantenga en los niveles requeridos para el adecuado metabolismo celular (206).

El hemo también puede mobilizarse mediante una interacción directa entre la mitocondria y subdominios especializados retículo endoplásmico (RE) denominados **MAM** (mitochondrial-associated membranes) o a través del tráfico vesicular en **MDV** (mitochondrial derived vesicles) (Figura 1.16). Una vez en el RE el hemo puede acceder a las hemoproteínas presentes en todo el espacio celular, gracias a la amplia red de túbulos

que conforma su estructura, además de que el hemo podría incorporarse a las hemoproteínas nacientes a medida que se pliegan y maduran antes de ser distribuidas a través del aparato de Golgi o mediante la vía secretora. Por su parte, en el tráfico mediado por MDV, el hemo recién sintetizado podría movilizarse desde la mitocondria a endolisosomas, siendo directamente exportados al citosol sin pasar por la vía secretora (200). Una vez en el citosol, el hemo puede unirse a diversos factores que permitan su transporte, como la proteína **GAPDH** (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), la cual es capaz de unirse al hemo sintetizado en la mitocondria actuando como chaperona para su liberación a diversas hemoproteínas (como la enzima óxido nítrico sintasa) presentes en el citosol (207).

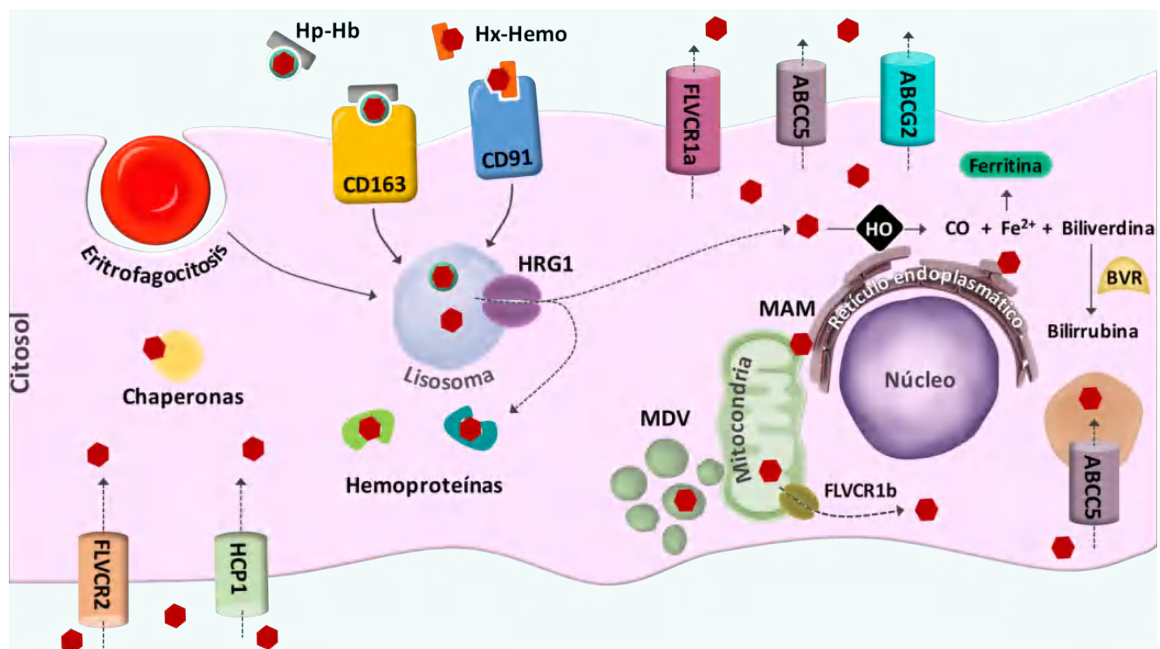


Figura 1.16. Tráfico y control del metabolismo del hemo en mamíferos. Los receptores de superficie CD163 y CD91 del macrófago median la captación de hemo y Hb libre mediante endocitosis de los complejos de Hp-Hb y Hx-Hemo, respectivamente. Además, los macrófagos adquieren hemo derivado de la Hb de los glóbulos rojos senescentes eritrofagocitados, o mediante un importe directo de hemo a través de los transportadores HCP1 y FLVCR2. El hemo liberado en el lisosoma es transportado al citosol por la proteína HRG1, en donde es degradado en hierro ferroso (Fe^{2+}), biliverdina y monóxido de carbono (CO) por acción de la enzima hemo oxigenasa (HO) o es distribuido en el citoplasma para su incorporación en las hemoproteínas. El exceso de hemo intracelular es expulsado de la célula mediante los transportadores FLVCR1a, ABCG2, y ABCC5. El ABCB5 además se encuentra en la membrana de vesículas secretoras, desde donde el hemo puede ser movilizado dentro o fuera de la célula. El hemo sintetizado en la mitocondria (Figura 13) es transportado al citosol por FLVCR1b, o ser movilizado mediante tráfico vesicular (MDV) o interacciones directas con el retículo endoplasmático (MAM), desde donde el hemo puede acceder a las hemoproteínas en todo el espacio celular o incorporarse a las hemoproteínas nacientes.

Además de FLVCR1a, dos transportadores ABC han sido implicados en el transporte de hemo al exterior de la célula, estos son ABCG2 y ABCC5 (Figura 16). El transportador **ABCG2**, inicialmente caracterizado por su asociación a la resistencia al tratamiento en cáncer de mama, está localizado en la membrana plasmática y actúa como transportador de eflujo de una amplia variedad de sustratos como fármacos, toxinas y metabolitos (208). Posteriormente se demostró que ABCG2 interactúa con hemo y otras porfirinas, y que es inducido bajo condiciones de hipoxia, sugiriendo que dicho transportador participa en el eflujo de porfirinas principalmente en células con bajo suministro de oxígeno promoviendo su supervivencia (209,210). Adicionalmente, en células progenitoras eritroides la ausencia de ABCG2 causa la acumulación de PPIX mientras que su sobreexpresión reduce los niveles intracelulares de dicha porfirina (211). Sin embargo, ratones mutantes nulos *Abcg2*^{-/-} solo presentan protoporfiria y fototoxicidad inducida por la dieta (212), lo que indica que este transportador no contribuye significativamente a la homeostasis de las porfirinas intracelulares o que existen mecanismos compensatorios que sean activados en ausencia de ABCG2, por lo que su papel en el exporte de hemo/PPIX en condiciones fisiológicas aun no se ha dilucidado completamente (134). Por su parte la proteína **ABCC5**, también relacionada con la resistencia a múltiples fármacos, se localiza en la membrana plasmática y en vesículas intracelulares participando en el transporte de hemo desde el citosol al medio extracelular y también al lumen de orgánulos implicados en su secreción. Una vez en la vía secretora, el hemo puede ser movilizado a diferentes localizaciones subcelulares, la membrana plasmática o al espacio extracelular (213).

El contenido intracelular de hemo también está determinado por su entrada dentro de las células, el cual puede ser directamente importado a través de transportadores o adquirido por endocitosis mediada por receptor a partir de los complejos Hp-Hb y Hx-Hemo descritos previamente. Una vez importado al citosol, el hemo exógeno puede ser movilizado hasta el RE para su degradación por la HO-1, incorporarse a la vía secretora a través de transportadores como ABCC5 o ser distribuido a través de la célula para ser incorporado en las hemoproteínas (200) (Figura 1.16). Hasta la fecha se han identificado dos proteínas importadoras de hemo localizadas en la membrana plasmática, FLVCR2 y HCP1 (Heme Carrier Protein 1), las cuales también pertenecen a la superfamilia MFS. A diferencia de FLVCR1, la proteína **FLVCR2** es incapaz de exportar hemo y su rol en el importe de este metabolito ha sido sugerido debido a que co-inmunoprecipita con hemina-

agarosa y su sobreexpresión o silenciamiento mediante ARN de interferencia en células mamíferas potencia o disminuye la captación de hemo, respectivamente (214). Sin embargo, la expresión heteróloga del *Flvcr2* humano en levaduras *Δhem1* no potencia su crecimiento en presencia de hemo (215), lo que plantea dudas sobre el papel de FLVCR2 en el importe de hemo al interior de las células. Por otra parte, la proteína **HCP1** está involucrada en el transporte de hemo intestinal y se localiza principalmente en la membrana apical de células duodenales en condiciones de deficiencia de hierro, potenciando la captación del hemo derivado de la dieta, mientras que en condiciones de suficiencia de hierro la proteína se localiza en compartimentos intracelulares (216,217). HCP1 también ha sido detectado en endosomas tempranos de macrófagos, donde colocaliza con los complejos Hp-Hb endocitados a través del receptor CD163, sugiriendo que ambas proteínas actúan de forma asociada en la degradación de la hemoglobina y el reciclaje del hierro (218). Sin embargo, estudios posteriores soportan que HCP1 es principalmente un transportador de folatos y que presenta baja afinidad por hemo (219–221), por lo que su papel en el tráfico del hemo aún es tema de debate.

Las proteínas HRG (Heme Response Genes) fueron identificadas inicialmente en el nematodo auxótrofo *Caenorhabditis elegans*, y son importantes para el transporte y utilización del hemo exógeno. La proteína **CeHRG1** se localiza en las membranas de compartimentos lisosomales y endosomales regulando la disponibilidad del hemo exógeno dentro del citosol, mientras que **CeHRG4** se localiza en la membrana plasmática y media la entrada de hemo exógeno hacia el citosol (Figura 1.14) (222). El homólogo humano de CeHRG1 se llama **HRG1** y es esencial durante el proceso de eritrofagocitosis de los macrófagos, participando en el transporte del hemo desde el fagolisosoma hacia el citosol y en el reciclaje del hierro derivado del grupo hemo (223) (Figura 1.16).

Ponka y colaboradores cuestionan la necesidad de las células mamíferas de llevar a cabo el importe y exporte de hemo a través de transportadores de membrana, ya que los niveles de hemo intracelular pueden ser regulados mediante la expresión inducible de la HO-1 con el fin de prevenir tanto la acumulación de hemo como su déficit (173). Sin embargo, un estudio reciente del tráfico intracelular de hemo utilizando sensores fluorescentes, ha permitido determinar que tanto el hemo endógeno como el exógeno contribuyen al mantenimiento de sus niveles intracelulares y que ambos son movilizados a los compartimentos celulares de manera específica, lo que sugiere la existencia de un

conjunto de factores de tráfico y chaperonas que pueden distinguir la fuente de hemo (224).

2.5 Metabolismo y tráfico del grupo hemo en parásitos tripanosomátidos

Los parásitos tripanosomátidos son auxótrofos para el grupo hemo por lo que deben captarlo de su hospedador. Este defecto metabólico implica que dichos parásitos deban ser cultivados en medios que contengan una fuente de hemo en forma de hemina o hemoglobina para soportar su crecimiento y diferenciación *in vitro* (225).

2.5.1 Auxotrofia para hemo

La auxotrofia para hemo en tripanosomátidos está dada por la ausencia de los genes responsables de su síntesis, los cuales fueron perdidos durante el curso de la evolución probablemente en un ancestro común de vida libre con fácil acceso a fuentes de hemo o bien, como consecuencia de su adaptación a un estilo de vida parasitario (226) (Figura 17). Mientras que *Trypanosoma* spp. se ve obligado a adquirir hemo exógeno para suplir sus necesidades nutricionales debido a la ausencia total de su ruta de síntesis, *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos de insectos probablemente también pueden utilizar precursores de hemo, ya que presentan los genes que codifican para las enzimas CPOX, PPOX y FeCH responsables de los últimos tres pasos de la ruta (227). Como resultado, varios tripanosomátidos como *Crithidia fasciculata* y *Leishmania* spp. pueden crecer en medio de cultivo en donde la fuente de hemo es reemplazada por el precursor PPIX, lo cual provee una evidencia indirecta de que al menos la enzima FeCH es funcional en estos parásitos (225,228,229). Adicionalmente, algunos tripanosomátidos de insectos como *Strigomonas culicis* y *Angomonas deanei* son capaces de crecer en medio libre de hemo, gracias a la presencia de bacterias endosimbiontes en su citosol que le proveen este metabolito esencial o sus precursores, lo que permite a los parásitos sintetizar hemo utilizando sus propias enzimas o incluso las enzimas bacterianas (225,230). Se ha sugerido que las bacterias endosimbióticas de tripanosomátidos podrían actuar como orgánulos celulares responsables de la síntesis de hemo de estos parásitos, ya que carecen de pared celular, se dividen de manera sincrónica con la célula hospedadora y son incapaces de vivir fuera de ella (226). Un caso excepcional es el

kinetoplástido *Phytomonas serpens*, un parásito de plantas que, a pesar de depender del metabolismo oxidativo, no requiere hemo para su supervivencia (231).

Los estudios filogenéticos sugieren que los genes *cpox*, *ppox* y *fech* encontrados en los genomas de tripanosomátidos de las subfamilias Leishmaniinae (*Leptomonas* spp., *Crithidia* spp. y *Leishmania* spp.) y Strigomonadinae (*Angomonas* spp. y *Strigomonas* spp) han sido rescatados mediante transferencia horizontal de genes (HTG, por sus siglas en inglés) a partir de γ -proteobacterias, o bacterias firmicutes en el caso de FeCH (226,232) (Figura 1.17).

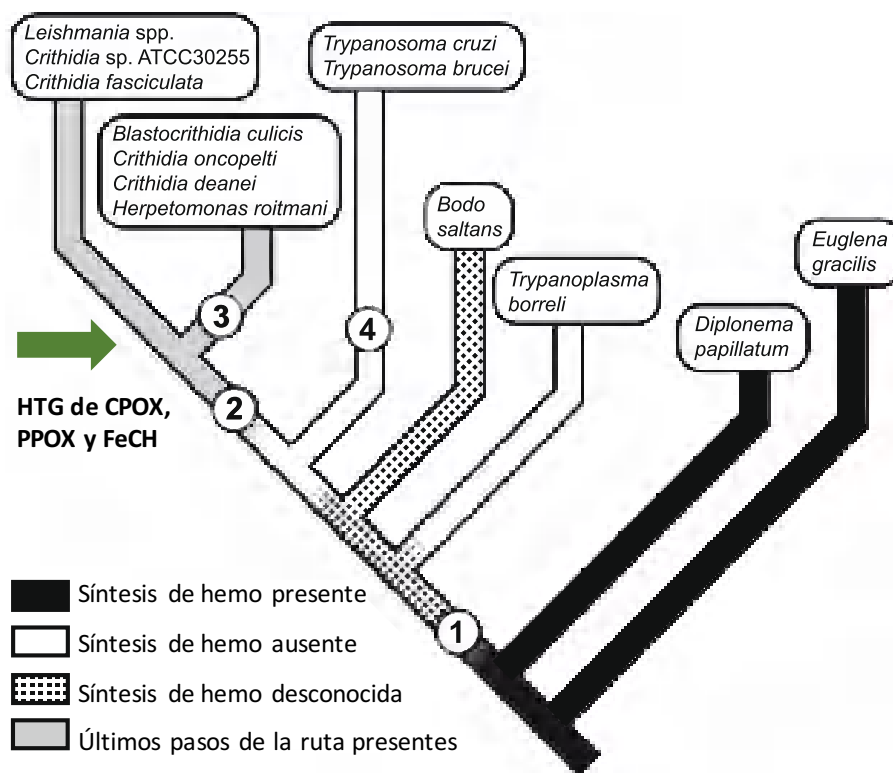


Figura 1.17. Modelo propuesto de la evolución de la ruta de síntesis de hemo en kinetoplástidos. La ruta de síntesis fue probablemente pérdida en un ancestro común de vida libre con fácil acceso a fuentes de hemo (1). Algunos kinetoplástidos rescataron mediante transferencia horizontal de genes (HTG) a partir de bacterias los genes que codifican para las tres últimas enzimas de la ruta de síntesis (2), algunos de los cuales contienen bacterias endosimbiontes que les suplen de hemo o sus precursores (3). Los parásitos de *Trypanosoma* spp. son completamente deficientes en síntesis de hemo, por lo que deben obtenerlo de su hospedador (4). Imagen adaptada de (226).

Se han sugerido tres posibles escenarios para la evolución de la ruta de biosíntesis de hemo en los kinetoplástidos. El primer escenario considera la presencia de la ruta de síntesis de hemo en los organismos ancestrales, la cual fue probablemente perdida durante

la evolución temprana de Kinetoplastea, y recuperada parcialmente por HGT de los genes *cpox*, *ppox* y *feh* a partir de bacterias (Figura 17). Por su parte, la segunda hipótesis apunta a que la ruta fue perdida de manera separada en bodónidos, *Trypanosoma*, y parcialmente perdida en Leishmaniinae y Strigomonadinae, los cuales reemplazaron parte de su metabolismo mediante HGT a partir de diferentes orígenes debido a su adaptación a un estilo de vida parasitario. Finalmente, un tercer escenario sugiere que la presencia o ausencia de los genes que componen la ruta de síntesis de hemo es el resultado de una pérdida diferencial de genes durante la evolución de los kinetoplastidos, a partir de un ancestro común rico en genes procariotas y eucariotas (232). Desde un punto de vista bioquímico, el reemplazamiento génico es la opción más factible, puesto que es más fácil reemplazar enzimas en una ruta bioquímica existente que adquirir *de novo* enzimas individuales que catalicen pasos intermediarios. Por lo tanto, la diversidad en el metabolismo del hemo en kinetoplastidos podría explicarse por la combinación de las dos primeras hipótesis que apuntaría a una pérdida ancestral de parte de la ruta de síntesis de hemo seguida de pérdidas diferenciales de otras enzimas en linajes específicos (232).

2.5.2 Requerimiento de hemo

En tripanosomátidos, el grupo hemo participa como grupo prostético de diversos citocromos, la mayoría de los cuales se encuentran en la mitocondria haciendo parte de los complejos de la cadena respiratoria, como los citocromos a, b, c y c1, esenciales para el metabolismo energético de los parásitos. Adicionalmente, los citocromos b5 participan en la transferencia de electrones en la reacción de desaturación de ácidos grasos, cuya producción endógena es esencial para el ciclo de vida de los parásitos, y en la biosíntesis de ergosterol (CYP51), principal esteroide de la membrana plasmática de tripanosomátidos flagelados (233). Adicionalmente, las hemo peroxidasas presentes en estos parásitos participan en la defensa contra las especies reactivas del oxígeno producidas naturalmente durante los procesos metabólicos o la respiración celular, e incluso durante la respuesta oxidativa desencadenada por el macrófago durante la infección intracelular por *Leishmania* spp (234). El hemo también puede mediar la diferenciación y la proliferación de los parásitos al actuar regulando el estado de fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α . La fosforilación de eIF2 α es considerado uno de los principales mecanismos de inhibición de la traducción en eucariotas, el cual ocurre por la activación

de quinasas bajo diferentes condiciones de estrés como infecciones víricas, disminución de nutrientes, choque térmico, estrés del retículo endoplasmático o por deficiencia de hemo intracelular (235). Recientemente se ha demostrado que el hemo se une al dominio catalítico de la quinasa eIF2 α de *Trypanosoma cruzi* (TcK2), inhibiendo su actividad. En ausencia de hemo, la TcK2 se activa y fosforila la subunidad α del eIF2, lo cual inhibe la síntesis de proteínas llevando a un arresto en el ciclo celular, requisito fundamental para la diferenciación a las formas infectivas no proliferativas del parásito. La disminución en los niveles de hemo simulan las condiciones encontradas en el insecto vector, en donde la digestión de la sangre coincide con la liberación de las formas metacíclicas infectivas de *T. cruzi* mediante la defecación (236). Por otra parte la presencia de hemo promueve la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* de una manera dosis dependiente (237), mientras que un exceso de este metabolito produce cambios morfológicos asociados a su diferenciación a la forma amastigote (238). Para *Leishmania* también se ha demostrado que el hemo promueve la síntesis de proteínas y la proliferación de promastigotes de *L. donovani* cultivados *in vitro* (239) y en nuestro laboratorio datos de secuenciación de ARN (ARNseq) empleando ARN de promastigotes crecidos en ausencia y presencia de hemo, sugieren la importancia de este metabolito en la homeostasis del hierro y la regulación del proceso de diferenciación a las formas infectivas metacíclicas de *L. major* (L.M Orrego y J.M Pérez-Victoria, resultados no publicados).

2.5.3 Tráfico de hemo

La importancia del grupo hemo en la proliferación, diferenciación y síntesis de hemoproteínas en los tripanosomátidos, sumado a la absoluta necesidad de obtenerlo de fuentes exógenas como resultado de su auxotrofia, ha obligado a estos parásitos a desarrollar mecanismos que aseguren la entrada de hemo exógeno y su distribución intracelular. A continuación se describen las proteínas y mecanismos involucrados en el metabolismo del hemo de los tripanosomátidos conocidos hasta la fecha.

2.5.3.1 *Leishmania* spp.

Leishmania spp. puede obtener hemo a través de dos rutas independientes: i) la endocitosis de la hemoglobina mediada por receptor seguido de la liberación de hemo en

el lisosoma (240), y ii) el transporte directo de hemo a través de la membrana plasmática (241,242) (Figura 1.18).

La presencia de un transportador específico o un posible receptor para el grupo hemo en *Leishmania* spp. se había sugerido desde hace más de 30 años, después de demostrarse que promastigotes de *L. amazonensis* tenían la capacidad de unir hemo de manera específica a la superficie celular, y que dicha unión era mayor en promastigotes logarítmicos debido probablemente a una mayor actividad mitocondrial (243). La proteína responsable de este transporte fue descrita recientemente en *L. amazonensis* y fue nombrada como **LHR1** (Leishmania Heme Response 1), la cual es codificada por un gen que comparte homología con la proteína de membrana HRG-4, involucrada en el importe de hemo en *C. elegans*. LHR1 está localizada en la membrana plasmática tanto en promastigotes como amastigotes intracelulares, en donde participa en la captación de hemo exógeno, y también en las membranas de compartimentos endocíticos participando posiblemente en la homeostasis de este metabolito (241) (Figura 18). LHR1 es esencial para la viabilidad y la virulencia de los parásitos, ya que además de la imposibilidad de obtener mutantes nulos para dicha proteína, los parásitos que carecen de un solo alelo son incapaces de replicarse intracelularmente en macrófagos cultivados *in vitro* y presentan una menor infectividad en un modelo murino de leishmaniasis cutánea (244). Estos resultados indican el potencial de LHR1 como blanco terapéutico, apoyado además por la identificación de aminoácidos específicos de LHR1 no presentes en el homólogo humano, que son capaces de modular la capacidad de la proteína para transportar hemo a través de las membranas y su correlación con la habilidad de los parásitos para establecer infección en modelos animales (245). Además de LHR1, la captación de hemo exógeno en *Leishmania* también es mediada por **LFLVCRb**, una proteína ortóloga al transportador FLVCR2 humano descrita por primera vez en nuestro laboratorio, la cual se localiza en la membrana plasmática de promastigotes de *L. major* y participa en el importe de porfirinas (Figura 1.18). La delección de un solo alelo afecta la virulencia de los parásitos, indicando su esencialidad para el establecimiento de la enfermedad en el hospedero mamífero (Cabello-Donayre y col., resultados no publicados).

La endocitosis de hemoglobina en *Leishmania* spp. es un proceso dependiente de clatrina mediado por un receptor (246). El receptor de hemoglobina (**HbR**) es una hexoquinasa de 46 kDa localizada en el bolsillo flagelar de los parásitos, que reconoce específicamente la molécula de hemoglobina y media su rápida internalización a través

de la ruta vesicular (240,247) (Figura 1.18). La proteína Rab5 regula la internalización del HbR unido a la hemoglobina desde la membrana plasmática a endosomas tempranos, los cuales posteriormente se fusionan a los endosomas tardíos en un proceso dependiente de Rab7 (86,87). La región N-terminal extracelular del HbR está involucrada en la unión a la hemoglobina, mientras que la región C-terminal citoplasmática parece ser esencial para la fusión de los endosomas tempranos y tardíos (86). Además de participar en el transporte de la hemoglobina endocitada a los lisosomas para la obtención de hemo intracelular, Rab7 también promueve su captación, por lo que dicha proteína es crítica para el crecimiento de *Leishmania* spp. (87). El HbR también parece ser funcional en amastigotes axénicos, por lo que podría participar en la internalización de la hemoglobina en la forma intracelular *Leishmania* spp. (248).

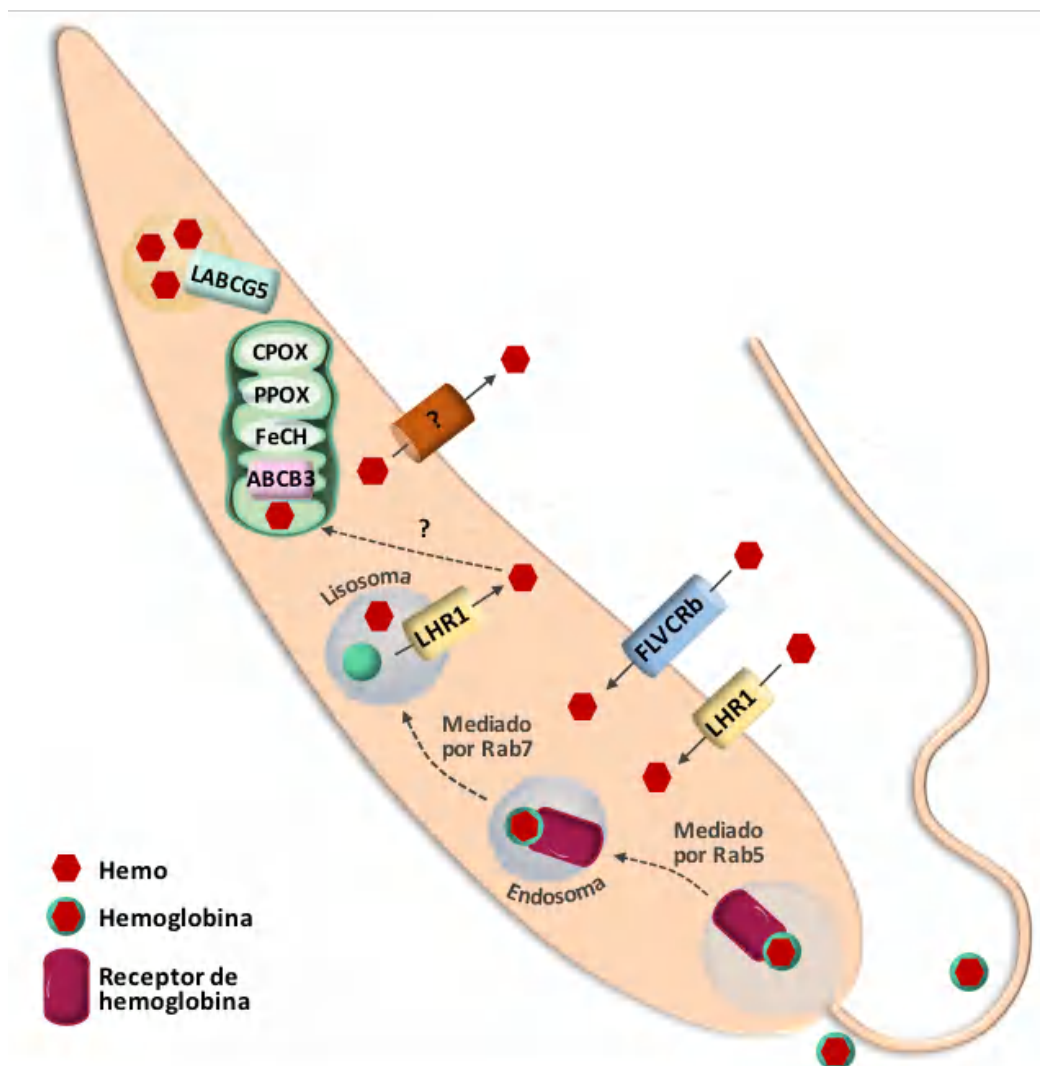


Figura 18. Modelo propuesto de transporte de hemo en *Leishmania* spp.

Una vez que la Hb llega al lisosoma del parásito, el hemo liberado tras su digestión se importa al citosol por medio de LHR1, que además de estar en la membrana plasmática se localiza en este compartimento intracelular (249). Adicionalmente, la proteína LmHR1 expresada de manera heteróloga en las levaduras *Δhem1*, se localiza en la vacuola digestiva y es capaz de rescatar el crecimiento de estas levaduras mutantes en presencia de hemoglobina, confirmando el papel de la proteína LHR1 de *L. major* en el rescate del hemo procedente de la hemoglobina endocitada (249) (Figura 1.18).

Se ha sugerido que los amastigotes pueden captar hemoglobina a través de la fusión de la vacuola parasitófora con las vesículas conteniendo los complejos Hp-Hb endocitados por el receptor CD163 o de las vesículas derivadas de la eritrofagocitosis (248) (Figura 16). Además, es posible que los amastigotes intracelulares puedan captar hemo de manera eficiente dentro de la vacuola parasitófora de los macrófagos, puesto que se ha demostrado que la unión de hemo a la membrana de los amastigotes es 5 veces mayor a un pH de 5.4 (243). Este hemo puede ser obtenido de la degradación proteolítica de las hemoproteínas de la célula hospedera por acción de proteasas endógenas y/o del parásito (248).

Independientemente del mecanismo empleado por los promastigotes y amastigotes para obtener hemo, este metabolito debe ser distribuido a todos los orgánulos donde es requerido, lo cual probablemente sea mediado por proteínas citosólicas que actúen como chaperonas para evitar la citotoxicidad del hemo libre. A pesar de que el mecanismo de distribución intracelular sigue siendo desconocido, se ha especulado que el transportador **LABCG5** podría participar en el tráfico del hemo a la mitocondria mediante una interacción directa con dicho orgánulo, donde el hemo es altamente requerido para los citocromos de la cadena respiratoria (250) (Figura 1.18). El transportador LABCG5 se localiza en las membranas de compartimentos multivesiculares localizados cerca del núcleo y del bolsillo flagelar de los parásitos, sin continuidad con la ruta endocítica, y está involucrado en el rescate de hemo derivado de la degradación de la hemoglobina endocitada. Los parásitos dominantes negativos para esta proteína disminuyen su proliferación celular, la cual es revertida en presencia de hemo exógeno, sugiriendo la importancia de LABCG5 en el transporte intracelular del este metabolito esencial (250).

Otro transportador ABC asociado a la homeostasis de hemo en *Leishmania* es el transportador LABCB3, el cual ha sido descrito en *L. major*. Este transportador, cuyo

homólogo humano es la proteína ABCB7, presenta una región N-terminal única requerida para su localización mitocondrial y parece ser esencial durante la replicación intracelular de los amastigotes y su virulencia en el hospedero mamífero. LABC3 participa en la maduración de los clúster [2Fe-2S], por lo que podría estar indirectamente implicado en la síntesis del hemo mitocondrial en *Leishmania* a partir de los precursores obtenidos de la célula hospedadora (251).

2.5.3.2 *Trypanosoma brucei*

El metabolismo energético en la forma sanguínea de *T. brucei* depende principalmente de la glicólisis y de la Oxidasa Alternativa de Tripanosomas (TAO), una oxidasa terminal independiente de citocromo de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, mientras que la forma procíclica utiliza la fosforilación oxidativa para la producción de ATP (252). A pesar de las diferencias en los requerimientos de hemo, esta molécula es esencial en ambos estadios del parásito, lo que supone el desarrollo de mecanismos que permitan su captación a partir de fuentes exógenas. Recientemente se validó la primera hemoproteína esencial en las formas sanguíneas de *T. brucei*, la enzima esterol 14 α -desmetilasa (**CYP51**) involucrada en la síntesis de ergosterol, representando un potencial blanco de acción para el desarrollo de nuevos fármacos frente a este parásito (253).

La incorporación de hemoglobina en *T. brucei* está mediada por el receptor **TbHpHbR**, una proteína específica del estadio sanguíneo que interviene en la unión y captación de los complejos Hp-Hb, y que no presenta afinidad por el grupo hemo solo. Esta proteína presenta de 200 a 400 copias por célula y está localizada en la región del bolsillo flagelar cerca al kinetoplasto (254). También está presente en *T. brucei* subespecie *rhodesiense* y *T. brucei* subespecie *gambiense* pero ausente en *T. cruzi* y *Leishmania* spp., indicando que este receptor podría ser específico de kinetoplastidos cuyo desarrollo ocurre completamente en la sangre de los hospederos mamíferos (254). Aparentemente, la única fuente de hemo en las formas sanguíneas de *T. brucei* es la hemoglobina ya que, a diferencia de las formas procíclicas, son incapaces de internalizar hemo libre (254). Cabe anotar que el receptor TbHpHbR también está implicado en la respuesta inmunitaria innata, ya que reconoce y endocita el TLF1 (Trypanosome Lytic Factor), una subclase de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que contiene la proteína

relacionada con haptoglobina (Hpr) que media la unión al receptor y la apolipoproteína L-1 (específica de primates) responsable de la actividad tripanolítica del TLF1, causada por la formación de poros en la membrana lisosomal de los parásitos (255,256).

En nuestro laboratorio hemos estudiado el tráfico de hemo en la forma sanguínea de *T. brucei* mediante la caracterización de una proteína a la que denominamos **TbHRG**. El gen que codifica dicha proteína sólo muestra un grado moderado de similitud con otras proteínas HRG fuera del género *Trypanosoma* y se expresa de manera constitutiva en ambos estadios del parásito, siendo 8 veces mayor su expresión en las formas procíclicas. La proteína TbHRG se localiza en el compartimento endolisosomal del parásito y es capaz de rescatar el crecimiento de levaduras mutantes $\Delta hem1$ a concentraciones bajas de hemo, indicando su papel como transportador de hemo. Se demostró mediante ARN interferente que TbHRG es una proteína esencial para las formas sanguíneas de *T. brucei*, en donde participa como un transportador lisosomal responsable del tráfico del hemo derivado de la hemoglobina endocitada al citosol (249).

Posteriormente se describió el papel del transportador TbHRG en las formas procíclicas de *T. brucei*, el cual se localiza en la membrana flagelar del parásito desde donde media el importe de hemo libre, siendo aparentemente el único responsable de esta función en el estadio del insecto vector. A pesar de que el silenciamiento de TbHRG mediante ARN interferente disminuye la proliferación celular y el contenido de hemo intracelular en las formas procíclicas, esta proteína no es esencial para la viabilidad *in vitro* o *in vivo* de los parásitos, y su papel parece estar relacionado con la regulación de cambios morfológicos en los estadios de transición en el insecto vector (257).

2.5.3.3 *Trypanosoma cruzi*

La ausencia de la ruta biosintética de hemo en *T. cruzi* ha sido confirmada mediante estudios bioquímicos en los que la actividad enzimática de ALAD y PBGD han sido indetectables, lo cual es consistente con la ausencia de porfobilinógeno, porfirinas y hemo libre en los extractos celulares (258–260). Por lo tanto, *T. cruzi* depende completamente de la captación de hemo exógeno, lo cual ocurre mediante dos vías diferentes tal como ha sido demostrado mediante estudios de microscopía de fluorescencia, utilizando el análogo fluorescente de hemo Pb-mP (Paladio mesoporfirina) y hemoglobina unida a rodamina. Dichos parásitos utilizan una ruta endocítica para la

incorporación de hemoglobina, que tiene lugar en la región anterior del parásito cerca del citostoma, y un mecanismo independiente de endocitosis que transporta rápidamente el hemo exógeno desde el extremo anterior hacia la región posterior de los epimastigotes. Independientemente de la vía de entrada, tanto el hemo como la hemoglobina se concentran en la región posterior de los parásitos, probablemente dentro de los reservosomas, orgánulos en donde también se acumulan proteínas como transferrina y albumina obtenidas mediante la ruta endocítica (237). Dado que la internalización del hemo es interrumpida por ciclosporina A, un inhibidor de la glicoproteína P, se ha sugerido que la entrada de hemo en *T. cruzi* es mediada por un transportador ABC (237), aunque en eucariotas este tipo de proteínas están involucradas principalmente en el transporte de compuestos más que en el importe.

El estudio del transporte de hemo en los diferentes estadios de *T. cruzi* utilizando análogos fluorescentes de hemo, sugiere que este metabolito solo es captado en los estadios de epimastigotes y amastigotes, que corresponden a las formas replicativas del parásito, mientras que los tripomastigotes aparentemente no incorporan hemo (261).

Recientemente se identificó la proteína **TcHTE** (Transmembrane Heme Transporter Enhancer) en *T. cruzi*, la cual presenta un 38% de similitud con la proteína CeHRG-4 de *C. elegans*, y un 55% y 58% de similitud con las proteínas transportadoras de hemo LHR1 y TbHRG descritas en *Leishmania* y *T. brucei*, respectivamente. La expresión de la proteína TcHTE de *T. cruzi* en levaduras mutantes para la síntesis de hemo ($\Delta hem1$), es capaz de rescatar su crecimiento en bajas concentraciones de hemo. Además, su localización en la membrana plasmática de estas levaduras sugiere su participación en el transporte de hemo al interior de las células (261). En *T. cruzi* la proteína TcHTE se localiza en el bolsillo flagelar de los epimastigotes, donde tiene lugar el transporte de nutrientes, lo cual coincide con el sitio de internalización del hemo y hemoglobina descrito previamente (237,261). La sobreexpresión de la proteína TcHTE en epimastigotes cultivados en medio suplementado con 20 μ M de hemina disminuye el crecimiento parasitario, lo que indica que *T. cruzi* no cuenta con un mecanismo eficiente para controlar el exceso de hemo intracelular (261). Sin embargo, Cupello y colaboradores detectaron productos intermediarios de degradación de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*, y un incremento en los niveles de expresión de una proteína reconocida por anticuerpos contra la HO-1 humana en respuesta a concentraciones crecientes de hemo, lo que sugiere que

el catabolismo del hemo en estos parásitos puede estar mediado por una proteína tipo hemo oxigenasa (262).

2.5.4 Síntesis de hemo en *Leishmania* spp.

Como se ha descrito anteriormente *Leishmania* spp. contiene en su genoma los genes que codifican para las enzimas CPOX, PPOX y FeCH, las cuales catalizan los tres últimos pasos de la ruta biosintética del hemo, mientras que ninguno de los 5 genes que codifican para las enzimas iniciales de la ruta han sido detectados en los genomas de las diferentes especies de *Leishmania* secuenciadas hasta la fecha. La ausencia de actividad enzimática de las primeras proteínas de la ruta en *Leishmania* se ha demostrado mediante ensayos de expresión heteróloga utilizando los genes mamíferos, en los cuales se observó que es necesaria una doble transfección con los genes que codifican para la segunda (ALAD) y tercera (PBGD) enzima de la ruta y la adición de ALA exógeno para producir porfirinas, confirmando la deficiencia de ALAS, ALAD y PBGD en *Leishmania* (228,263). Además, la acumulación de HMB sugiere la ausencia de enzimas UROS y UROD, lo cual fue confirmado mediante una triple transfección con los genes mamíferos que codifican para ALAD, PDGB y UROD, dando como resultado la producción de CPIII solo en parásitos tratados con el precursor ALA (263).

Hasta la fecha solo existe evidencia indirecta de que la enzima FeCH es funcional en *Leishmania* spp., puesto que la fuente de hemo en forma de hemina o hemoglobina puede ser reemplazada por el precursor PPIX, permitiendo el crecimiento de los parásitos en cultivos *in vitro* (228,264). Por otra parte, se ha demostrado la funcionalidad de la enzima PPOX de *L. major* mediante ensayos de actividad enzimática utilizando la proteína recombinante y estudios de complementación funcional en bacterias mutantes $\Delta hemG$ auxótrofas para hemo, demostrando que el gen *ppox* de *L. major* codifica para una enzima PPOX tipo HemG (265). Finalmente, se han obtenido las estructuras cristalizadas de la enzima CPOX de *L. major* (PDB #2QT8, PDB #1VJU), *L. donovani* (PDB #3EJO) y *L. naiffi* (PDB #3E8J), además de la estructura con el ligando unido (PDB #3DWR, PDB #3DWS), sugiriendo que la enzima CPOX de *Leishmania* es dependiente de oxígeno (153). Aún está por evaluar si dichas enzimas son funcionales en *Leishmania* y si participan en la conversión del intermediario CPIII derivado de la célula hospedera para la formación de su propio hemo. Se ha sugerido que el CPIII puede ser obtenido del

citoplasma de los macrófagos (226) o que parte del hemo del macrófago degradado parcialmente o modificado químicamente en el ambiente ácido de la vacuola parasitófora pueda ser reparado por los amastigotes intracelulares utilizando las tres últimas enzimas de la ruta (266). La presencia de los genes *cpox*, *ppox* y *fech* en el genoma de *Leishmania* spp. es intrigante y lleva a cuestionarse la ventaja evolutiva de su adquisición, ya de que los parásitos no pueden sintetizar precursores anteriores de la ruta y los sustratos de las últimas enzimas son potencialmente tóxicos para la célula (226).

2.6 Metabolismo del grupo hemo como blanco terapéutico contra parásitos

Como se ha descrito previamente, las células mamíferas cuentan con una sofisticada maquinaria para controlar los niveles intracelulares de hemo, mediante la regulación de su biosíntesis mitocondrial, degradación enzimática, incorporación en hemoproteínas o su exporte a través de proteínas transportadoras (141). Sin embargo, los parásitos carecen de algunos de estos mecanismos, por lo que cualquier alteración en el metabolismo del hemo puede ser empleado con fines terapéuticos (267). Los parásitos nematodos son conocidos por su incapacidad de sintetizar hemo *de novo*, por lo que necesitan captar esta molécula desde su hospedador para garantizar su crecimiento y desarrollo, tal como *Brugia malayi* y el trematodo *Schistosoma mansoni*, causantes de la filariasis y esquistosomiasis en humanos, respectivamente (268). *B. malayi* carece de una ruta funcional para la síntesis de hemo ya que solo se ha identificado en su genoma el gen que codifica para la enzima FeCH, el cual fue adquirido por transferencia horizontal desde α -proteobacterias (269). Debido a su incapacidad de captar hemo del medio exterior, *B. malayi* está obligado a adquirir hemo o sus precursores a partir de su bacteria endosimbionte *Wolbachia*, que presenta una ruta funcional completa (270). Se ha demostrado que tanto la FeCH de *B. malayi* como la FeCH de *Wolbachia* son esenciales para la movilidad y viabilidad de los nematodos, por lo que son consideradas potenciales dianas terapéuticas. Además, la baja identidad de secuencia y las significativas diferencias bioquímicas entre las FeCHs de *B. malayi* y *Wolbachia* con respecto a su homólogo humano, refuerza el potencial que tiene dicha proteína para ser empleada como blanco para el tratamiento antifilárico (270,271). Por otra parte, se ha demostrado que *S. mansoni* importa hemo exógeno a través del transportador SmHRG-1, el cual es esencial

para la producción y maduración de sus huevos, sugiriendo su posible uso como diana terapéutica (268).

Los parásitos protozoos del género *Plasmodium* causantes de la malaria, presentan una ruta de síntesis de hemo completamente funcional a pesar de tener acceso ilimitado a dicho compuesto durante su estadio intraeritrocítico (272). De hecho, en ausencia de actividad hemo oxigenasa, los parásitos necesitan detoxificar el exceso de hemo derivado de la hemoglobina mediante la formación de cristales de hemozoina, uno de los principales blancos de los fármacos antimaláricos como la cloroquina (273). Recientemente, empleando parásitos mutantes de *Plasmodium* spp. Δ FeCH y Δ ALAS, se ha demostrado que la síntesis de hemo es esencial para el desarrollo del estadio hepático en el hospedero mamífero y la formación de las formas infectivas en el insecto vector, por lo que se ha propuesto que la inhibición de la síntesis de hemo en los estadios hepáticos del parásito puede ser empleada como terapia profiláctica para interrumpir la infección y prevenir la progresión de la enfermedad hasta la fase sanguínea (273,274).

Los parásitos tripanosomátidos, al igual que los nematodos, son de los pocos organismos aeróbicos que, aun dependiendo de la fosforilación oxidativa, son incapaces de sintetizar su propio hemo y deben obtenerlo a partir de fuentes exógenas (233). Por lo tanto, cualquier mecanismo que interfiera con la captación de hemo exógeno, su tráfico intracelular o exporte hacia el citosol puede desencadenar la muerte de los parásitos como consecuencia de la acumulación de hemo potencialmente tóxico o el desequilibrio en los niveles de hemo requeridos para la homeostasis celular (267). De hecho, hace más de 80 años la Dra. Marguerite Lwoff indicó que el “Talón de Aquiles” de los parásitos tripanosomátidos era su dependencia absoluta de hemo exógeno (275). En *L. mexicana* se ha descrito la actividad antiparasitaria de xantonas nitrógenadas, las cuales posiblemente se acumulan en la vacuola parasitófora de los macrófagos infectados formando complejos con el hemo movilizado hacia su interior, lo cual priva a los parásitos intracelulares de su captación (276). Por otra parte, en *T. cruzi* se ha demostrado que el tratamiento con análogos de 4-aminoquinolinas ejerce una acción tripanocida debido a la acumulación de hemo que induce la muerte de los parásitos por estrés oxidativo (277), mientras que el tratamiento con análogos de hemo o inhibidores de transportadores ABC, reducen los niveles intracelulares de hemo afectando la proliferación celular (278). En las formas sanguíneas de *T. brucei*, se ha validado recientemente la primera hemoproteína

esencial, la enzima CYP51 que participa en la síntesis del ergosterol, la cual tiene un alto potencial para ser empleada como blanco terapéutico (253).

Las proteínas LABCG5, LABCB3, LHR1 y LFLVCRb de *Leishmania* spp. descritas anteriormente, parecen ser esenciales para el crecimiento y proliferación de los parásitos, sugiriendo su utilidad como blancos terapéuticos (242,244,251). Además de su esencialidad, las proteínas LHR1 de *Leishmania* y TbHRG de *T. brucei* presentan sólo un 14% y 16% de similitud con su ortólogo humano, respectivamente, lo que supone que se pueden desarrollar inhibidores específicos contra estas proteínas (249).

Hasta la fecha no se ha descrito ningún estudio sobre la esencialidad de las proteínas de la ruta de síntesis de hemo presentes en *Leishmania*. En el caso que se demuestre que la ruta parcial de síntesis de hemo es funcional en *Leishmania* y que las proteínas CPOX, PPOX y FeCH son esenciales para el desarrollo del parásito durante su ciclo de vida en el hospedero mamífero y/o el insecto vector, podrían convertirse en potenciales blancos terapéuticos, sumado además a la baja similitud de secuencia de dichas proteínas con sus homólogos humanos como resultado de su origen bacteriano.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es el estudio de la ruta parcial de síntesis de hemo de *L. major*, un parásito auxótrofo para este metabolito esencial, con el fin de determinar su papel a lo largo del ciclo de vida del parásito y la posible utilidad de las enzimas de la ruta como blancos terapéuticos.

Para ello, los objetivos específicos son:

1. Estudiar la capacidad de los distintos estadios de *L. major* de utilizar porfirinas precursoras para sintetizar su propio hemo.
2. Evaluar la importancia de transportador de porfirinas del macrófago ABCB6 en la proliferación de los amastigotes de *L. major* en cultivos celulares *in vitro* y el desarrollo de la enfermedad en un modelo murino.
3. Caracterizar la funcionalidad y localización de las proteínas de la ruta de síntesis de hemo presentes en *L. major*: coproporfinógeno oxidasa (CPOX), protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) y ferrochelataza (FecH).
4. Delecionar los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfch* de *L. major*. Para ello, implementar la metodología CRISPR-Cas9 para la edición genética de este parásito.
5. Determinar la importancia de las proteínas LmCPOX, LmPPOX y LmFeCH en la proliferación y desarrollo de las formas extracelulares e intracelulares de *L. major* en cultivos *in vitro*.
6. Evaluar el efecto *in vivo* de la delección de los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfch* de *L. major*, tanto en el desarrollo del parásito en el insecto vector como en su capacidad para generar leishmaniasis cutánea en un modelo murino.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo y manipulación de *Leishmania major*

3.1.1 Cultivo *in vitro*

Las formas promastigotes de *Leishmania major* cepa (MHOM/IL/80/Friedlin) se cultivaron *in vitro* a 28 °C en medio RPMI modificado suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFBi) (Anexo 4). Los cultivos fueron mantenidos entre 1×10^6 y 3×10^7 parásitos/mL mediante pases frecuentes en medio fresco cada 48-72 horas. Para los experimentos realizados en ausencia de hemo, se utilizó medio RPMI modificado suplementado con 20% de SFBi depletado de hemo (SFBf) preparado tal y como se describe en (248). Brevemente, el SFBi fue filtrado utilizando columnas Amicon® Ultra Centrifugal Filters 10000 MWCO (Merck Millipore) a 3000 RCF durante 20 minutos para seleccionar la fracción de bajo peso molecular. La depleción de hemo se verificó midiendo la absorbancia del SFBf a una longitud de onda de 405 nm (241) y mediante la determinación de la ausencia o presencia de crecimiento parasitario en los cultivos suplementados con SFBf o SFBf más una fuente exógena de hemo, respectivamente.

Los cultivos fueron ajustados a una concentración inicial de 10^6 parásitos/mL y utilizados durante la fase logarítmica de crecimiento (72 horas) para los experimentos de transfección y microscopia de fluorescencia, mientras que para los ensayos de infección *in vitro* e *in vivo* fueron utilizados durante la fase estacionaria (7 días).

3.1.2 Recuento de promastigotes

Para el recuento celular se utilizó un contador Z1™ Coulter Counter (Beckman Coulter), empleando una dilución 1:100 de los cultivos de parásitos en medio isotón II (Coulter). Para el recuento de promastigotes metacíclicos se utilizó la cámara de Neubauer empleando una dilución 1:50 de los cultivos en tampón PBS 1X (Anexo 4).

3.1.3 Transfección de *Leishmania major* mediante electroporación

3.1.3.1 Método de electroporación con tampón HBS

La transfección se llevó a cabo siguiendo las instrucciones descritas en “Protocols for handling and working with *Leishmania* species” (279). Para ello, se centrifugaron los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica a 1000 RCF por 10 min a 4 °C, se lavaron 2 veces en tampón HBS (Anexo 4) y se resuspendieron en este mismo tampón a una concentración final de 5×10^7 parásitos/mL. Se transfirieron 400 μ L de esta suspensión a cubetas de electroporación de 2 mm (VWR), se mezcló con 5-10 μ g de ADN plasmídico diluido en agua ultrapura y se incubó durante 10 minutos en hielo. Para la electroporación se utilizó el equipo ECM600[®] de BTX con las siguientes condiciones: 0.45 kV, 500 μ F, 13 ohms y dos pulsos de 4.6-5.1 mseg. Tras la electroporación, se adicionaron a las cubetas 600 μ L de medio RPMI modificado suplementado con 20% de SFBi (Anexo 4) y se incubó durante 10 minutos en hielo. Por último, los parásitos se transfirieron a 4 mL del mismo medio de cultivo y se incubaron durante 24 horas a 28 °C, tras las cuales se añadió el medicamento de selección a la mínima concentración utilizada. La selección de los transfectantes se logró mediante la exposición a concentraciones crecientes de los medicamentos.

3.1.3.2 Método de electroporación con el sistema Amaxa[®] Nucleofector[®]

La transfección se llevó a cabo empleando 5×10^7 promastigotes de *L. major* en fase logarítmica de crecimiento, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los parásitos se centrifugaron a 1000 RCF durante 10 minutos a 4 °C, tras lo cual fueron resuspendidos en 100 μ L de la solución comercial Nucleofector Solution (Lonza) y transferidos a las cubetas de electroporación de 2 mm suministradas con el kit. Se adicionaron 5-10 μ g de ADN circular o lineal diluidos en agua ultrapura, según el caso, y se transfectaron por electroporación con el electroporador Nucleofector II (Amaxa) empleando el programa V-033. Los parásitos se transfirieron a 5 mL de medio RPMI modificado suplementado con 20% de SFBi (Anexo 4) y se incubaron durante 24 horas a 28 °C, tras las cuales se añadió el medicamento de selección a la mínima concentración utilizada. La selección de los transfectantes se logró mediante la exposición a concentraciones crecientes de los medicamentos.

3.1.4 Purificación de promastigotes metacíclicos

Para la obtención de promastigotes metacíclicos se utilizó el método de selección negativa mediante aglutinina de cacahuete (PNA) descrito en (280). Brevemente, los parásitos en fase estacionaria de crecimiento (7 días) fueron cosechados e incubados en medio medio RPMI modificado suplementado con 10% de SFBi (Anexo 4) y 100 µg de PNA por cada 10⁸ parásitos durante 15 minutos a 28 °C. El PNA se une selectivamente los carbohidratos de la superficie de Gal-β(1-3)-GalNAc de los parásitos, ausentes en la forma metacíclica, lo que lleva a la aglutinación de los promastigotes no metacíclicos. Finalizada la incubación, los promastigotes se centrifugaron a 70 RCF durante 7 minutos a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes conteniendo los parásitos metacíclicos (PNA-) y se contaron en cámara de Neubauer.

3.2 Cepas de bacterias, cultivo y manipulación

3.2.1 Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas de la especie *Escherichia coli*:

DH5 α: *F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ⁻*. Empleadas para la clonación de genes y amplificación de plásmidos (GibcoBRL).

BL21 (DE3): *B F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)*. Empleadas para la expresión de proteínas recombinantes bajo inducción con IPTG (Invitrogen).

XL10-Gold: *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]*. Bacterias ultracompetentes empleadas para la amplificación de plásmidos modificados mediante mutagénesis dirigida (Stratagene).

SASX38: *HfrC metB1 rel-I ΔhemG38*. Cepa de *E. coli* que carece del gen *ppox* (*ΔhemG*) (281) utilizada para los experimentos de complementación funcional de la proteína PPOX de *L. major*. Amablemente donada por el Dr. Harry A. Dailey (University of Georgia, USA).

VS200: *HfrC lac_{am} trpam ΔvisA*. Cepa de *E. coli* que carece del gen *fech* (*ΔhemH*) (282) utilizada para los experimentos de complementación funcional de la proteína FeCH

de *L. major*. Amablemente donada por el Dr. Harry A. Dailey (University of Georgia, USA).

3.2.2 Cultivo

Las cepas DH5 α , BL21 (DE3) y XL10-Gold fueron cultivadas en medio LB líquido y sólido (Anexo 4) a 37 °C, en constante agitación en el caso de los cultivos líquidos. El medio fue suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la selección de clones de bacterias positivamente transformadas con los plásmidos conteniendo la secuencia codificante del gen de interés y el gen de resistencia al antibiótico respectivo. Las cepas VS200 y SASX38 se cultivaron bajo las mismas condiciones, suplementando además los medios LB líquido y sólido con hemina a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2.3 Lisogenización de cepas de *E. coli* mutantes SASX38 y VS200

Para la integración sitio específica del profago λDE3 en el cromosoma de las cepas SASX38 y VS200 de *E. coli*, se utilizó el sistema λDE3 Lysogenization Kit (Novagen). El fago recombinante λDE3 contiene el gen de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, permitiendo la regulación de su expresión con el análogo de lactosa IPTG. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con 0.2% (p/v) de maltosa, 10mM de MgSO_4 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina, a 37 °C en constante agitación hasta alcanzar una D.O_{600} de 0.5. Se mezclaron 10 μL bacterias con 10^8 UFP de fago λDE3 , 10^8 UFP de fago Helper y 10^8 UFP de fago de selección, se incubaron a 37 °C durante 20 minutos para permitir la adsorción del fago λDE3 y se sembraron en placas de LB sólido suplementado con hemina e incubadas durante 16 horas a 37 °C. Los lisógenos resultantes fueron evaluados mediante la detección de la proteína T7 ARN polimerasa por Western blot y evaluación de crecimiento con el fago T7 Tester, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. El fago T7 Tester, mutante de delección de la T7 ARN polimerasa, sólo es activo en aquellas células hospedadoras que han integrado el profago λDE3 en presencia de IPTG, permitiendo la formación halos lisogénicos. Brevemente, las bacterias lisogenizadas fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con 0.2% (p/v) de maltosa, 10mM de MgSO_4 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina a 37 °C en constante agitación hasta alcanzar una D.O_{600} de 0.5. Se mezclaron 100 μL

bacterias crecidas con 10^3 UFP de fago T7 tester, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la adsorción del fago y se diluyeron en 3 mL de agarosa fundida. Esta mezcla fue vertida sobre placas de LB sólido suplementado con 20 $\mu\text{g/mL}$ de hemina y 0.4 mM de IPTG e incubadas durante 16 horas temperatura ambiente, para evaluar la inducción de la T7 ARN polimerasa y la correspondiente formación de halos lisogénicos.

Para la evaluación por Western blot, las bacterias lisogenizadas fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con 20 $\mu\text{g/mL}$ de hemina a 37 °C en constante agitación hasta alcanzar una $D.O_{600}$ de 0.5, tras lo cual se indujo la expresión de la proteína T7 ARN polimerasa con 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37 °C. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada al 5% en PBS-T (Anexo 4) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidamente se incubó con el anticuerpo primario anti-T7 ARN polimerasa (Novagen) con una dilución 1:10.000 durante una hora, y luego con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa con una dilución 1:10.000 durante 1 hora. Finalmente, la membrana se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (Pierce).

3.2.4 Preparación de bacterias competentes

3.2.4.1 Bacterias competentes por choque térmico

Se emplearon bacterias *E. coli* cepas DH5 α y BL21 (DE3), las cuales fueron cultivadas en 5 mL de medio LB líquido a 37 °C con agitación constante durante 16 horas. Se realizó una dilución 1:100 de este precultivo en medio LB fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una $D.O_{600}$ de 0.375. Las bacterias se enfriaron en hielo durante 15 minutos, se centrifugaron a 3500 RCF durante 7 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial de MgCl_2 100 mM estéril frío, se incubaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron nuevamente a 3500 RCF durante 7 minutos a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de CaCl_2 100 mM estéril frío, se incubaron en hielo durante 1 hora y se añadió glicerol para obtener una concentración final de 15%.

Las bacterias competentes se almacenaron en alícuotas de 50 μL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

3.2.4.2 Bacterias electro-competentes

Se emplearon bacterias *E. coli* cepas SASX38 y VS200, las cuales fueron cultivadas en 5 mL de medio LB líquido suplementado con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina en agitación constante durante 16 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó una dilución 1:100 de este precultivo en medio LB fresco suplementado con hemina y se dejó crecer hasta alcanzar una D.O_{600} de 0.375. Las bacterias se enfriaron en hielo durante 20 minutos, se centrifugaron a 1000 RCF durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente las bacterias se resuspendieron en 1 y luego en 1/2 del volumen inicial de agua estéril fría, centrifugando cada vez a 1000 RCF durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras eliminar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de glicerol al 10% estéril frío y se centrifugaron nuevamente a 1000 RCF durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente las bacterias se resuspendieron en 1/500 del volumen inicial de glicerol al 10% estéril y se almacenaron en alícuotas de 50 μL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

3.2.5 Transformación de bacterias

3.2.5.1 Transformación de bacterias competentes por choque térmico

Se descongeló en hielo una alícuota de 50 μL de bacterias competentes, se añadió el ADN plasmídico diluido en agua ultrapura (5 μL de producto de ligación o 10 ng de plásmido) y se incubó la mezcla en hielo durante 20 minutos. Tras este tiempo, las bacterias se incubaron a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos y luego en hielo durante 5 minutos. Se adicionaron 950 μL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en constante agitación. Finalmente, las bacterias se centrifugaron a 1000 RCF durante 5 minutos, se descartaron 800 μL de sobrenadante y se resuspendieron en los 200 μL de medio restante, el cual fue sembrado en placas de LB sólido suplementadas con ampicilina o kanamicina e incubadas durante 16 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5.2 Transformación de bacterias electro-competentes por electroporación

Se descongeló en hielo una alícuota de 50 μ L de bacterias electro-competentes y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm (VWR), donde se mezclaron con 5-10 μ g de ADN plasmídico diluido en agua ultrapura y se incubó durante 1 minuto en hielo. Para la electroporación se utilizó el equipo ECM600® de BTX con las siguientes condiciones: 2.5 kV, 129 ohms y un pulso de 5-6 mseg. Tras la electroporación, las bacterias fueron resuspendidas en 950 μ L de medio LB suplementado con 20 μ g/mL de hemina y 20 mM de glucosa, transferidas a un vial de 1.5 mL e incubadas durante 1 hora a 37 °C en constante agitación. Finalmente, las bacterias se centrifugaron a 1000 RCF durante 5 minutos, se descartaron 800 μ L de sobrenadante y se resuspendieron en los 200 μ L de medio restante, el cual fue sembrado en placas de LB sólido suplementadas con ampicilina y hemina e incubadas durante 16 horas a 37 °C.

3.3 Levaduras, cultivo y manipulación

3.3.1 Cepas de levaduras y cultivo

Se empleó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* haploide de *hem13* derivada de la diploide de EUROSCARF BY4742 por disección de esporas, amablemente donada por la Dra. Esperanza Cerdán (Universidad de la Coruña, España).

Esta cepa mutante, con el gen *hem13* (*cpoX*) delecionado y sustituido por el cassette de resistencia a geneticina KANMX4, fue utilizada para los experimentos de complementación funcional de la proteína CPOX de *L. major*. Las levaduras mutantes fueron cultivadas a 30 °C en medio rico YPD (Anexo 4) suplementado con geneticina 60 μ g/mL para evitar contaminaciones y hemina 50 μ g/mL para suplir la auxotrofia de hemo.

3.3.2 Transformación de levaduras de *S. cerevisiae*

Se empleó el método de acetato de litio (AcLi) descrito por Gietz y Woods (283). Las levaduras se cultivaron en 5 mL de medio YPD líquido suplementado con hemina y geneticina y se crecieron a 30 °C durante 16 horas en constante agitación. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4000 RCF durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sedimento celular resultante se lavó en 1 mL de agua estéril y se centrifugó nuevamente

a 6000 RCF durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación las levaduras se lavaron en 1 mL de tampón AcLi 100 mM, se centrifugaron a 6000 RCF durante 2 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron por pipeteo en 345 μ L de una solución compuesta por 35% (p/v) de PEG3350, 100 mM de AcLi y 100 μ g de ADN transportador (Salmon Sperm DNA, Invitrogen). Seguidamente se añadieron a la mezcla 2 μ g de DNA plasmídico transformante diluido en agua ultrapura, se incubó durante 30 minutos a 30 °C y se sometió a choque térmico durante 20 minutos a 42 °C. Las levaduras se recuperaron mediante centrifugación a 6000 RCF durante 1 minuto a temperatura ambiente, y el sedimento celular resultante se lavó en 1 mL de agua estéril centrifugando nuevamente a 6000 RCF durante 1 minuto. Las levaduras se resuspendieron en 200 μ L de agua estéril para la siembra en placas de medio selectivo adecuado (SC-Ura) (Anexo 4) e incubadas a 30 °C hasta observar el crecimiento de transformantes (2-3 días).

3.4 Ensayos de complementación funcional en sistemas heterólogos de los genes *cpox*, *ppox* y *feh* de *L. major*

3.4.1 Complementación funcional de LmCPOX en mutante de *S. cerevisiae* Δ hem13

El gen *cpox* de *L. major* (LmjF.06.1270) fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico utilizando el par de oligonucleótidos CPOXTopoFw/CPOXTopoRv (Anexo 3). El producto de PCR fue clonado de forma dirigida en el vector de entrada TOPO[®] entre los sitios de recombinación attL1 y attL2, siguiendo las recomendaciones descritas por la casa comercial en el kit pENTR/SD/D-TOPO[®] Cloning Kit (Invitrogen). Brevemente, se mezclaron 4 μ L del producto de PCR, 1 μ L de solución salina y 1 μ L del vector TOPO y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se transformaron bacterias DH5 α con 2 μ L del producto utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.2.5.1, y se cultivaron en placas de LB sólido suplementado con 50 μ g/mL de kanamicina. Una vez clonado en el vector de entrada, el gen *cpox* se secuenció y se subclonó por recombinación en el vector de expresión constitutiva para levaduras pDR empleando el kit Gateway[®] LR Clonase[®] Enzyme Mix (Invitrogen). Brevemente, se mezclaron 100 ng del constructo TOPO-CPOX diluido en agua ultrapura y 100 ng del vector pDR en un volumen final de 4 μ L, se adicionó 1 μ L de LR Clonase II[®] y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se adicionaron 0.5 μ L

de solución de Proteinasa K (2 µg/µL) y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Seguidamente, se transformaron bacterias DH5α con 2 µL del producto de recombinación utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.2.5.1, y se cultivaron en placas de LB sólido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

Las levaduras mutantes $\Delta hem13$ se transformaron con el plásmido pDR-CPOX resultante y con el plásmido pDR vacío como control, utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.3.2, y se cultivaron en placas de SC-Ura (Anexo 4) suplementadas con 60 µg/mL de geneticina y 50 µg/mL de hemina. Finalmente, se seleccionaron diferentes clones de levaduras para evaluar su crecimiento en medio SC-Ura en ausencia de hemina, permitiendo determinar la funcionalidad de la proteína CPOX de *L. major*.

3.4.2 Complementación funcional de LmPPOX en mutante de *E. coli* $\Delta hemG$

El gen *ppox* de *L. major* (LmjF.06.1280) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico utilizando el par de oligonucleótidos PPOX*NheI*Fw/PPOX*XhoI*Rv (Anexo 3) y se clonó en los sitios de restricción *NheI* y *XhoI* del plásmido de expresión pET21b(+) (Novagen), dando como resultado el plásmido pET21b-PPOX que se secuenció posteriormente. Las bacterias mutantes SASX38 lisogénicas se transformaron por electroporación con el plásmido pET21b-PPOX y con el plásmido vacío como control diluidos en agua ultrapura, utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.2.5.2, y se cultivaron en placas de LB sólido suplementado con 1 mM de IPTG y 20 µg/mL de hemina. Finalmente, se seleccionaron diferentes clones para evaluar el crecimiento bacteriano en medio LB en ausencia de hemina, permitiendo determinar la funcionalidad de la proteína PPOX de *L. major*. Adicionalmente se evaluó la inhibición del crecimiento de las bacterias expresando la proteína PPOX de *L. major* en presencia de los herbicidas lactofen (100 y 500 nM) y acifluorfen (1 y 10 µM) en ausencia o presencia de 20 µg/mL de hemina.

3.4.3 Complementación funcional de LmFeCH en mutante de *E. coli* $\Delta hemH$

El gen *fech* de *L. major* (LmjF.17.1460) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico utilizando el par de oligonucleótidos FeCH*NheI*Fw/FeCH*XhoI*Rv (Anexo 3) y se clonó en los sitios de restricción *NheI* y *XhoI* del plásmido de expresión pET21b(+) (Novagen), dando como resultado el plásmido pET21b-FeCH que se secuenció

posteriormente. Las bacterias mutantes VS200 lisogénicas se transformaron por electroporación con el plásmido pET21b-FeCH y con el plásmido vacío como control diluidos en agua ultrapura, utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.2.5.2, y se cultivaron en placas de LB sólido suplementado con 1 mM de IPTG y 20 µg/mL de hemina. Finalmente, se seleccionaron diferentes clones para evaluar el crecimiento bacteriano en medio LB en ausencia de hemina, permitiendo determinar la funcionalidad de la proteína FeCH de *L. major*. Adicionalmente se evaluó la inhibición del crecimiento de las bacterias expresando la proteína FeCH de *L. major* en presencia del inhibidor N-metil-mesoporfirina (10 µM) en ausencia o presencia de 20 µg/mL de hemina.

3.5 Localización subcelular de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major* mediante microscopia

3.5.1 Generación de constructos para la expresión de proteínas de fusión fluorescentes

Los genes *cpox*, *ppox* y *fech* de *L. major* se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico utilizando los pares de oligonucleótidos CPOXBamHIFw/CPOXEcoRVrv, PPOXBglIIFw/PPOXNheIRv y FeCHBamHIFw/FeCHEcoRVrv (Anexo 3), respectivamente, eliminando el codón de parada del marco de lectura abierto de cada proteína para permitir la fusión en el extremo carboxilo terminal de las proteínas fluorescentes. Los genes *cpox* y *fech* se clonaron en los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRV* del plásmido de expresión para *Leishmania* pXG-/GFP+ (strain B2863), amablemente cedido por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University School of Medicine, USA). El gen *ppox* se clonó en los sitios de restricción *BglII* y *NheI* del plásmido de expresión para *Leishmania* pLEXSy-hyg2 conteniendo el gen de la proteína mCherry, amablemente cedido por el Dr. José María Requena (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, España). Se transfectaron promastigotes de *L. major* en fase logarítmica de crecimiento con cada uno de los constructos quiméricos, pXG-CPOX/GFP, pXG-FeCH/GFP y pLEXSy-PPOX/mCherry, previamente secuenciados, empleando el protocolo de transfección mediante electroporación con tampón HBS descrito en el apartado 3.1.3.1.

Los parásitos transfectados con los constructos pXG-CPOX/GFP+ y pXG-FeCH/GFP+ se seleccionaron con geneticina (G418), mientras que los parásitos

transfectados con el constructo pLEXSY-PPOX/mCherry se seleccionaron con higromicina hasta obtener líneas de parásitos con expresión estable de las proteínas fluorescentes.

3.5.2 Marcaje *in situ* de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L.major* mediante CRISPR-Cas9

Los oligonucleótidos requeridos para amplificación por PCR de los ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los ARNg y los ADN donadores para la integración de la proteína de fusión mediante recombinación homóloga fueron obtenidos mediante la herramienta online LeishGEdit (<http://leishgedit.net/>). Las proteínas fueron marcadas *in situ* en el extremo C-terminal utilizando la estrategia CRISPR-Cas9 basada en plásmidos descrita en el Anexo 2.

Los ADN donadores se amplificaron utilizando como molde el plásmido pPLOT-mNG-Puro, utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido C-TagCPOXFw/C-TagCPOXRv, C-TagPPOXFw/LmPPOXRv y C-TagFeCHFw/C-TagFeCHRv (Anexo 3), los cuales contienen regiones de homología de 30 pares de bases correspondientes a secuencias corriente arriba y corriente abajo del codón de parada específicas para los genes *cpx*, *ppox* y *fech*, respectivamente. Para el marcaje de las proteínas en la región C-terminal se empleó solo un ARNg dirigido a la región 3'UTR próxima al codón de parada. Los ADN molde para la transcripción *in vivo* de los ARNg se amplificaron empleando 2 μ M del oligonucleótido sentido 3'gRNACPOX, 3'gRNAPPOX o 3'gRNAFeCH (Anexo 3) conteniendo la secuencia de ARN guía de 20 nt específica para el gen *cpx*, *ppox* o *fech*, respectivamente, y el oligonucleótido antisentido común G00 (Anexo 3). Las concentraciones de reactivos y condiciones de la PCR son las mismas descritas en el apartado 3.6.2.1.2. Los productos de las PCRs se purificaron por columna mediante el kit NucleoSpin® Gel and DNA Clean-up (Macherey-Nagel) y los ADNs obtenidos se diluyeron en agua ultrapura.

Los promastigotes de *L. major* expresando las proteínas Cas9/T7 ARN polimerasa se transfectaron por electroporación con 4 μ g de ADN donador y 4 μ g de ADN molde para la transcripción *in vivo* del 3'ARNg correspondientes a cada gen empleando el sistema Amaxa Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. En este caso se emplearon

3×10^7 promastigotes para la transfección, los cuales se seleccionaron en medio RPMI modificado líquido suplementado con 10% de SFBi y 30 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina.

3.5.3 Microscopía de fluorescencia

Para los estudios de co-localización se utilizaron 1×10^7 promastigotes de *L. major* en fase logarítmica de crecimiento que expresaban las proteínas CPOX, PPOX y FeCH fusionadas a las proteínas fluorescentes. Para el marcaje de la mitocondria o la membrana plasmática, se emplearon 50 nM de Mitotracker (Red o Green) o 5 μM del marcador FM4-64 (Molecular Probes) a una temperatura de 28 °C y 4 °C, respectivamente. En ambos casos los promastigotes se incubaron durante 30 minutos con la sonda correspondiente en medio RPMI modificado sin SFBi y se lavaron con PBS 1X en frío para su posterior visualización mediante microscopía. Las imágenes se adquirieron en un microscopio de fluorescencia Olympus IX81 y se deconvolucionaron utilizando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging).

3.6 Generación de líneas de *L. major* mutantes nulas para genes CPOX, PPOX y FeCH mediante el sistema CRISPR-Cas9

3.6.1 Estrategia CRISPR-Cas9 para generación de líneas mutantes de *L. major* CPOX^{-/-} y FeCH^{-/-}

La delección de los genes *cpx* y *feh* de *L. major* fue realizada mediante el sistema CRISPR-Cas9 descrito en (284) empleando los vectores pTCas9 y pLS7 amablemente cedidos por el Dr. Yvon Sterkes (Facultad de Medicina, Universidad de Montpellier, Francia).

3.6.1.1 Generación de línea de *L. major* con expresión estable de la proteína Cas9

Los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica se transfectaron por electroporación con 10 μg de plásmido pTCas9 circularizado diluido en agua ultrapura empleando el sistema Amaxa Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. Los parásitos transfectados se seleccionaron en medio de cultivo RPMI modificado sólido (Anexo 4) suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B para la obtención de clones y posteriormente se evaluó la correcta expresión de la proteína Cas9 en diferentes clones

aislados mediante Western blot (Anexo 2). Brevemente, se cosecharon 5×10^6 parásitos, se lavaron dos veces en PBS 1X y se resuspendieron en tampón Laemmli 1X (Anexo 4) para ser lisados por calor a 75°C durante 10 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada al 5% en PBS-T (Anexo 4) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidamente se incubó con el anticuerpo anti-FLAG (Invitrogen) con una dilución 1:2000 durante una hora, y luego con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa con una dilución 1:10000 durante 1 hora. Finalmente, la membrana se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (Pierce). Se seleccionó uno de los clones de *L. major* expresando la proteína Cas9 como línea base para la generación de parásitos mutantes nulos, denominada *L. major* Cas9, a la cual se realizó un pase *in vivo* en ratones BALB/c para garantizar la virulencia de la línea (Anexo 2).

3.6.1.2 Construcción de plásmidos pLS7-CPOX y pLS7-FeCH

La construcción de los plásmidos pLS7-CPOX y pLS7-FeCH fue basada en el plásmido pLS7, en el cual se clonaron inicialmente los ARNg y luego las regiones de homología correspondientes a de cada uno de los genes de interés. Los ARNg de los genes *cpoX* y *feh* se seleccionaron empleando la herramienta de diseño online EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu>). Se eligieron los ARNg que presentaran una predicción de eficiencia alta, sin efectos off target (reconocimiento de un gen distinto al deseado) y cuya secuencia de 20 nucleótidos comenzara con G para una óptima transcripción. Las secuencias de los ARNg se flanquearon con adaptadores de 16 nucleótidos requeridos para el clonaje usando el sistema InFusion®, y se sintetizaron como oligonucleótidos sentido y antisentido: SeedCPOXfw-SeedCPOXRv y SeedFeCHfw-SeedFeCHRv (Anexo 3). Cada pareja de oligonucleótidos se mezcló en proporción 1:1 (100 μM) en presencia de tampón estándar de ADN polimerasa y 0.5mM de MgCl_2 , y se alinearon por incubación en agua a punto de ebullición durante 2 minutos después de los cuales se enfrió gradualmente a temperatura ambiente hasta alcanzar 25°C . Los ARNg alineados se clonaron en el plásmido pLS7 previamente digerido con la enzima *BsgI* utilizando el kit In-Fusion HD Cloning (Clontech). Sobre los plásmidos conteniendo los ARNg, se clonaron las regiones de homología correspondientes a cada gen. Para ello, se eligieron regiones de homología de aproximadamente 1 kb de los extremos 5'UTR y 3'UTR de los

genes *cpx* y *feh* y se amplificaron por PCR a partir ADN genómico utilizando los pares de oligonucleótidos 5'UTRCPOXFw/Rv y 3'UTRCPOXFw/Rv, y 5'UTRFeCHFw/Rv y 3'UTRFeCHFw/Rv (Anexo 3), respectivamente. Las regiones 5'UTR y 3'UTR se clonaron de manera secuencial en los sitios de restricción *HpaI/MfeI* y *XbaI/KpnI* del plásmido pLS7, respectivamente, flanqueando el gen de resistencia a puromicina.

3.6.1.3 Delección de los genes *cpx* y *feh* de *L. major*

Los promastigotes de *L. major* expresando la proteína Cas9 se transfectaron por electroporación con 10 µg de plásmido circularizado o linearizado pLS7-CPOX o 10 µg de plásmido circularizado pLS7-FeCH diluidos en agua ultrapura, empleando el sistema Amaxa Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. Los parásitos transfectados se seleccionaron en medio RPMI modificado líquido suplementado con 10% de SFBi y 30 µg/ml de puromicina, realizando diluciones seriadas de los cultivos y sembrando en placas de 96 pocillos. Luego de 7 días post-transfección se seleccionaron aquellos pocillos donde se observó crecimiento parasitario, y se cultivaron en medio de cultivo RPMI modificado sólido suplementado con 20% de SFBi y 30 µg/ml de puromicina para la obtención de clones. Finalmente se evaluó la correcta delección del gen de interés e integración del cassette de resistencia en los clones obtenidos mediante PCR y Southern blot como se describe en el apartado 3.7.

3.6.2 Estrategia CRISPR-Cas9 para generación de línea de *L. major* PPOX^{-/-}

La delección del gen *ppox* de *L. major* se realizó mediante el sistema CRISPR-Cas9 descrito en (285) empleando los vectores pRM006, pTB008, pT y pPLOT amablemente cedidos por la Dra. Eva Gluenz (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, UK).

3.6.2.1 Generación y validación de la línea de *L. major* con expresión constitutiva de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa

Los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica se transfectaron por electroporación con 10 µg de plásmido linealizado pRM006, conteniendo el gen de la proteína Cas9 y el gen de resistencia a higromicina, empleando el sistema Amaxa

Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. Los parásitos transfectados se seleccionaron en medio RPMI modificado líquido suplementado con 10% de SFBi y 40 µg/ml de higromicina B. Posteriormente la población de parásitos expresando la proteína Cas9 se transfectó de igual manera con 10 µg de plásmido linearizado pTB008 conteniendo el gen de la proteína T7 ARN polimerasa y el gen de resistencia a fleomicina, y se seleccionaron en medio de cultivo RPMI modificado sólido con 40 µg/ml de higromicina B y 50 µg/ml de fleomicina para la obtención de clones.

Se evaluó la correcta expresión de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa en diferentes clones aislados mediante Western blot (Anexo 2). Brevemente, se cosecharon 2×10^7 parásitos, se lavaron dos veces en PBS 1X y se resuspendieron en tampón Laemmli 1X (Anexo 4) para ser lisados por calor a 60 °C durante 10 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada al 5% en PBS-T (Anexo 4) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidamente se incubó con los anticuerpos anti-FLAG (Invitrogen) con una dilución 1:2000 y anti-T7 ARN polimerasa (Novagen) con una dilución 1:1000 durante una hora, y luego con los anticuerpos secundarios IRDye[®] 800CW anti-Rabbit y IRDye[®] 680RD anti-Mouse (LI-COR Biosciences) con una dilución 1:20000 durante 1 hora. Finalmente, se adquirieron las imágenes empleando el sistema Odyssey CLx (LI-COR Biosciences).

Se seleccionó uno de los clones de *L. major* expresando ambas proteínas como línea base para la generación de parásitos mutantes utilizando esta estrategia, denominada *L. major* Cas9/T7, a la cual se realizó un pase *in vivo* en ratones BALB/c para garantizar la virulencia de la línea (Anexo 2).

3.6.2.1.1 Deleción del gen *LmRos3* de *L. major*

El gen *LmRos3* de *L. major* (LmjF.32.0510) fue utilizado para validar la generación de mutantes nulos utilizando la línea *L. major* Cas9/T7. Los oligonucleótidos requeridos para amplificación por PCR de los ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los ARNg y el ADN donador para la deleción del gen se obtuvieron mediante la herramienta online LeishGEdit (<http://leishgedit.net/>).

El fragmento de ADN donador se amplificó utilizando el par de oligonucleótidos sentido y antisentido LmRos3Fw/LmRos3Rv (Anexo 3), los cuales contienen regiones

de homología de 30 nt correspondientes a secuencias 5'UTR y 3'UTR específicas del gen *LmRos3* y 20 nt correspondientes a la secuencia común flanqueante a todos los cassettes de resistencia de los plásmidos pT. Para la amplificación del ADN donador se mezclaron 60 ng de plásmido pTNeo, 0.2 mM de dNTPs, 1 μ M de oligonucleótidos y 2 unidades de ADN polimerasa Platinum SuperFiTM (Invitrogen) en tampón SuperFiTM 1X suplementado con MgCl₂ (concentración final de MgCl₂, 1.5 mM), en un volumen final de 100 μ L. Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de PCR: 5 min a 98 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 98 °C, 15 s a 65 °C, 60 s a 72 °C, y una elongación final de 7 min a 72 °C.

Para el reemplazamiento alélico del gen *LmRos3* por el cassette de resistencia a geneticina, se emplearon dos ARNg dirigidos a las regiones 5'UTR y 3'UTR cercanas al codón de inicio y el codón de parada del marco de lectura abierto de la proteína, respectivamente, no incluidas en las regiones de homología del ADN donador. Los ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los ARNg se amplificaron de forma individual empleando 2 μ M de los oligonucleótidos sentido de la región 5'UTR o 3'UTR del gen *LmRos3* y el oligonucleótido antisentido común G00 (Anexo 3), 0.2 mM de dNTPs y 2 unidades de ADN polimerasa Platinum SuperFiTM (Invitrogen) en tampón SuperFiTM 1X suplementado con MgCl₂ (concentración final de MgCl₂, 1.5 mM) en un volumen final de 40 μ L. Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para las reacciones de PCR: 30 s a 98 °C seguido de 35 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 60 °C y 15 s a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron por columna mediante el kit NucleoSpin® Gel and DNA Clean-up (Macherey-Nagel) y se diluyeron en agua ultrapura.

Posteriormente, los promastigotes de *L. major* expresando las proteínas Cas9/T7 ARN polimerasa se transfectaron por electroporación con 4 μ g del ADN donador y 4 μ g de ADN molde de ambos ARNg para su transcripción *in vivo*, empleando el sistema Amaxa Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. En este caso se emplearon 3×10^7 promastigotes para la transfección, los cuales se seleccionaron en medio RPMI modificado líquido suplementado con 10% de SFBi y 40 μ g/ml de geneticina. Finalmente se evaluó la correcta delección del gen *LmRos3* e integración del cassette de resistencia en los clones obtenidos mediante PCR, Western blot y ensayo de citotoxicidad mediante el método colorimétrico de MTT en presencia de miltefosina (Anexo 2).

Brevemente, para el Western blot se cosecharon 5×10^7 parásitos, se resuspendieron en tampón Laemmli 1X (Anexo 4) y se lisaron por calor a 60 °C durante

10 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada al 5% en PBS-T (Anexo 4) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidamente se incubó con los anticuerpos anti-LiRos3 (amablemente cedido por el Dr. Santiago Castanys, IPBLN) con una dilución 1:500 y anti- α -tubulina (Sigma) con una dilución 1:12500 durante una hora, y luego con los anticuerpos secundarios IRDye® 800CW anti-Rabbit y IRDye® 680RD anti-Mouse (LI-COR Biosciences) con una dilución 1:20000 durante 1 hora. Finalmente, se adquirieron las imágenes empleando el sistema Odyssey CLx (LI-COR Biosciences). Para el ensayo de citotoxicidad, los promastigotes en fase logarítmica se incubaron a 26 °C con concentraciones crecientes de miltefosina (0,19 a 200 μ M), y el crecimiento celular se determinó mediante MTT después de 72 horas.

3.6.2.1.2 Marcaje *in situ* de la proteína PF16 de *L. major*

El gen LmPF16 de *L. major* (LmjF.20.1400) fue utilizado para validar el marcaje *in situ* de proteínas utilizando la línea *L. major* Cas9/T7. Los oligonucleótidos requeridos para amplificación por PCR de los ADN moldes para la transcripción *in vivo* del ARNg y el ADN donador para la integración de la proteína fluorescente en el extremo C-terminal, se obtuvieron mediante la herramienta online LeishGEdit (<http://leishgedit.net/>).

El ADN donador se amplificó a partir del plásmido pPLOT-mNG-Puro, el cual contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente NeonGreen seguido del gen de resistencia a puromicina que permite la selección de los parásitos genéticamente modificados. Los fragmentos de ADN donador se amplificaron utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido C-TagPF16Fw y C-TagPF16Rv (Anexo 3), los cuales contienen regiones de homología de 30 pares de bases correspondientes a secuencias corriente arriba y corriente abajo del codón de parada específicas para el gen *pf16*. Para la amplificación del fragmento de ADN donador se mezclaron 60 ng de plásmido pPLOT-mNG-Puro, 0.2 mM de dNTPs, 1 μ M de oligonucleótidos sentido y antisentido y 2 unidades de ADN polimerasa Platinum SuperFiTM (Invitrogen) en tampón SuperFiTM 1X suplementado con MgCl₂ (concentración final de MgCl₂, 1.5 mM), en un volumen final de 100 μ L. Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de PCR: 5 min a 98 °C seguido de 40 ciclos de

15 s a 98 °C, 15 s a 65 °C, 90 s a 72 °C, y una elongación final de 7 min a 72 °C. Para el marcaje de la proteína en la región C-terminal se empleó solo un ARNg dirigido a la región 3'UTR próxima al codón de parada.

El ADN molde para la transcripción *in vivo* del ARNg se amplificó empleando 2 µM del oligonucleótido sentido 3'gRNAPF16 conteniendo la secuencia de ARN guía de 20 nt y el oligonucleótido antisentido común G00 (Anexo 3), 0.2 mM de dNTPs y 2 unidades de ADN polimerasa Platinum SuperFi™ (Invitrogen) en tampón SuperFi™ 1X suplementado con MgCl₂ (concentración final de MgCl₂, 1.5 mM) en un volumen final de 40 µL. Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para las reacciones de PCR: 30 s a 98 °C seguido de 35 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 60 °C y 15 s a 72 °C. Los productos de ambas PCR se purificaron por columna mediante el kit NucleoSpin® Gel and DNA Clean-up (Macherey-Nagel) y se diluyeron en agua ultrapura.

Los promastigotes de *L. major* expresando las proteínas Cas9/T7 ARN polimerasa se transfectaron por electroporación con 4 µg de ADN donador y 4 µg de ADN molde para la transcripción *in vivo* del 3'ARNg, empleando el sistema Amaxa Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. Los parásitos transfectados se seleccionaron en medio RPMI modificado líquido suplementado con 10% de SFBi y 30 µg/ml de puromicina. El marcaje *in situ* de la proteína se evaluó mediante microscopia de fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81 (Anexo 2).

3.6.2.2 Delección del gen *ppox* de *L. major*

Los oligonucleótidos requeridos para amplificación por PCR de los ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los ARNg y el ADN donador para la delección del gen *ppox* se obtuvieron mediante la herramienta online LeishGEdit (<http://leishgedit.net/>).

El fragmento de ADN donador se amplificó utilizando el par de oligonucleótidos sentido y antisentido LmPPOXFw/LmPPOXRv (Anexo 3), los cuales contienen regiones de homología de 30 nt correspondientes a secuencias 5'UTR y 3'UTR específicas del gen *ppox* y 20 nt correspondientes a la secuencia flanqueante al cassette de resistencia a genética del plásmido pTNeo. Por otra parte, los ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los ARNg dirigidos a las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen se amplificaron de forma individual empleando los oligonucleótidos sentido 5'gRNAPPOX y

3'gRNAPPOX y el oligonucleótido antisentido común G00 (Anexo 3). Las concentraciones de reactivos y condiciones de la PCR son las mismas descritas en el apartado 3.6.2.1.1.

Los promastigotes de *L. major* expresando las proteínas Cas9/T7 ARN polimerasa se transfectaron por electroporación con 4 µg del ADN donador y 4 µg de ADN molde para la transcripción *in vivo* de los ARNg, empleando el sistema Amaxa Nucleofector descrito en el apartado 3.1.3.2. En este caso se emplearon 3×10^7 promastigotes para la transfección, los cuales se seleccionaron en medio RPMI modificado líquido suplementado con 10% de SFBi y 40 µg/ml de geneticina y posteriormente se cultivaron en medio de cultivo RPMI modificado sólido suplementado con la misma concentración del fármaco para la obtención de clones. Finalmente se evaluó la correcta delección del gen *ppox* e integración del cassette de resistencia en los clones obtenidos mediante PCR y Southern blot como se describe en el siguiente apartado.

3.7 Caracterización de líneas de *L. major* LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-} y LmFeCH^{-/-}

La delección de los genes e integración de los cassettes de resistencia se confirmó mediante PCR, Southern Blot y RT-qPCR utilizando como controles las líneas de parásitos *L. major* Cas9 y *L. major* Cas9/T7.

3.7.1 Obtención de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de promastigotes en fase logarítmica de crecimiento, mediante tratamiento fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Brevemente, se cosecharon 5×10^8 parásitos y se lavaron 2 veces en PBS 1X frío centrifugando cada vez a 1000 RCF por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, los parásitos se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X frío y se lisaron añadiendo NP40 a una concentración final de 1% (v/v) mezclando por agitación suave durante unos segundos, y se centrifugó a 16000 RCF durante 5 minutos a 4 °C. El sedimento resultante, conteniendo los núcleos, se resuspendió en SDS al 1% (v/v) en PBS 1X y se añadió de forma sucesiva 1 volumen de fenol y luego 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), separando cada vez las fases acuosa y orgánica por centrifugación a 16000 RCF durante 10 minutos a temperatura ambiente. El ADN contenido en la fase acuosa se precipitó añadiendo 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla de precipitación se incubó a -80 °C durante 2 horas y luego se centrifugó a 16000

RCF durante 30 minutos a 4 °C. El botón de ADN obtenido se lavó con etanol al 70% frío, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en agua ultrapura.

3.7.2 Análisis de ADN genómico mediante PCR

Para las amplificaciones por PCR se mezclaron 100 ng de ADN genómico, 0.25 µM de oligonucleótidos sentido y antisentido, y 1 unidad de MyTaqTM DNA Polymerase (Bioline) en tampón de reacción 1X suplementado con MgCl₂ (concentración final 3.0 mM) y dNTPs (concentración final 1.0 mM), en un volumen final de 25 µL. Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para las reacciones de PCR: 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 25 s a 95 °C, 15 s a 58 °C, 2 min a 72 °C, y una elongación final de 5 min a 72 °C. Para cada gen se empleó un oligonucleótido sentido común que hibrida corriente arriba de la región 5'UTR elegida para la recombinación homóloga (KOCPOXFw1, KOPPOXFw1, KOFeCHFw1) y dos oligonucleótidos antisentido, uno específico del gen delecionado (KOCPOXRv3, KOPPOXRv3, KOFeCHRv3) y otro específico del gen de resistencia integrado (PuroRv o NeoRv) (Anexo 3).

3.7.3 Análisis de ADN genómico mediante Southern blot

Para el análisis por Southern blot se emplearon sondas de ADN marcadas con digoxigenina (DIG) dirigidas a las regiones codificantes y regiones UTR de los genes en estudio, utilizando el DIG DNA Labeling (Roche). Para ello, el ADN se amplificó por PCR utilizando 0.25 µM de oligonucleótidos sentido y antisentido específicos de cada sonda (Anexo 3) y 1 unidad de MyTaqTM DNA Polymerase (Bioline) en tampón de reacción 1X suplementado con MgCl₂ (concentración final 3.0 mM) y dNTPs (concentración final 1.0 mM), en un volumen final de 15 µL. Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para las reacciones de PCR: 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 40 s a 72 °C, y una elongación final de 5 min a 72 °C. Como ADN molde se emplearon 10 ng de ADN genómico o 10 pg de plásmido, para la amplificación de sondas dirigidas a regiones codificantes/UTR o cassettes de resistencia, respectivamente. Los productos de PCR se desnaturalizaron a 98 °C durante 10 minutos, se añadió una mezcla de 2 µL de hexanucleótidos, 2 µL DIG DNA Labeling Mix y 1 µL de polimerasa Klenow y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Finalmente las sondas de ADN marcadas se precipitaron por incubación a -80 °C durante 30 minutos

con 2 μ L de EDTA 0.2 M, 2 μ L de LiCl 4 M y 60 μ L de etanol absoluto, y se resuspendieron en tampón TE (Anexo 4). El Southern blot se realizó mediante transferencia alcalina por capilaridad. Para ello, inicialmente el ADN genómico purificado de las líneas control y mutantes nulas para los genes *cpox*, *ppox* y *fech* fue digerido con enzimas de restricción específicas para cada caso:

Gen	Región de hibridación	Enzima
<i>cpox</i>	5'UTR	<i>XmnI</i>
	Secuencia codificante	<i>SmiI</i>
<i>ppox</i>	5'UTR	<i>AlwNI</i>
	Secuencia codificante	<i>AvaI</i>
<i>fech</i>	5'UTR	<i>Sall</i>
	Secuencia codificante	<i>SnaBI</i>

El ADN genómico digerido se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) durante 120 minutos a 60 V, y luego se trató sucesivamente durante 7 minutos con solución de depurinación, 30 minutos con solución desnaturalizante y 30 minutos con solución de neutralización (Anexo 4). El ADN se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta-Probe[®] Membrane, BioRad) mediante capilaridad en tampón SSC 10X durante toda la noche, según la técnica descrita por (286). Posteriormente las membranas se lavaron en SSC 2X (Anexo 4) y el ADN se fijó covalentemente a la membrana por irradiación con luz UV (120 μ J/cm²). Las membranas se prehibridaron en solución de hibridación DIG Easy Hyb Granules (Roche) a 42 °C durante 2 horas y seguidamente se incubaron con las sondas diluidas en la misma solución de hibridación durante 16 horas a 45 °C en agitación suave. Las sondas marcadas se utilizaron a una concentración final entre 5-25 ng/mL. Tras la hibridación, las membranas se lavaron sucesivamente con diferentes concentraciones de SSC (2X SSC y 0.1X SSC) al 0.1% (p/v) de SDS para remover el exceso de sonda hibridada inespecíficamente a la membrana. Finalmente, el ADN se detectó mediante el sistema de detección DIG (Roche) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Brevemente, las membranas se lavaron durante 3 minutos con solución de lavado (Anexo 4), e incubadas durante 30 minutos con solución de bloqueo (Anexo 4) y posteriormente durante 30 minutos con el anticuerpo anti-DIG (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) a una dilución 1:10.000 en solución de bloqueo. Tras la incubación con el anticuerpo, las membranas se

lavaron dos veces durante 15 minutos con solución de lavado, equilibradas durante 5 minutos con solución de detección (Anexo 4) e incubadas con solución de detección más el sustrato cromogénico NBT/BCIP (Roche) hasta la visualización de bandas.

3.7.4 Análisis de ARNm mediante RT-qPCR

Se cosecharon 5×10^7 promastigotes en fase logarítmica de las líneas de *L. major* control, LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-} y LmFeCH^{-/-}, y se enviaron al Servicio de Genómica del IPBLN para la extracción de ARN total empleando el RNA Isolation Kit (Roche Biochemicals). El ARN obtenido se trató con DNasa libre de RNasa, utilizando 1 unidad de enzima por μg de ARN e incubando la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. El ARN tratado se purificó por columna utilizando el kit NucleoSpin[®] RNA Clean-up (Macherey-Nagel) y se diluyó en agua ultrapura libre de RNasas. Posteriormente, el ADN complementario se sintetizó a partir de 1 μg de ARN total utilizando el qSCRIPT[™]cDNA Synthesis kit (Quanta Biosciences, Inc) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. El ADN complementario obtenido de las líneas LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-}, LmFeCH^{-/-} se amplificó con las parejas de oligonucleótidos CPOX-RTFw/Rv, PPOX-RTFw/Rv y FeCH-RTFw/Rv (Anexo 3) específicos para los genes *cpx*, *ppox* y *feh*, respectivamente, al igual que el ADN complementario de la línea control. Se utilizó el gen *gadh* como normalizador, ya que es un gen de expresión constitutiva. La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando el PerfeCta SYBR Green SuperMix for iQ[™] (Quanta Biosciences, Inc) en un termociclador BioRad CFX96 (BioRad).

3.7.5 Ensayos de funcionalidad de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major*

3.7.5.1 Complementación genética

Se realizó la complementación genética de las líneas de *L. major* mutantes nulas LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-} y LmFeCH^{-/-} mediante la transfección con una copia episomal del gen delecionado correspondiente.

Los genes *cpx*, *ppox* y *feh* fueron amplificados por PCR a partir de ADN genómico utilizando los pares de oligonucleótidos CPOXBamHIFw/Rv, PPOXBamHIFw/Rv y FeCHBamHIFw/Rv (Anexo 3), respectivamente. Los genes *cpx* y *feh* se clonaron en el sitio de restricción *BamHI* del plásmido de expresión para

Leishmania pXGNEO (strain B1288), amablemente cedido por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University School of Medicine, USA), y el gen *ppox* se clonó en el sitio de restricción *BamHI* del plásmido pXGPURO. El plásmido pXGPURO se generó mediante la sustitución del cassette de resistencia a geneticina presente en el plásmido pXGNEO por el cassette de resistencia a puromicina obtenido del plásmido pLS7. Posteriormente se realizó mutagénesis dirigida de los plásmidos pXGNEO-CPOX y pXGNEO-FeCH para introducir mutaciones en las secuencias PAM (del inglés Protospacer Adjacent Motif) utilizadas en el diseño de los ARNg, con el fin de prevenir el reconocimiento de la copia episomal de los genes por la proteína Cas9. Para la obtención de los plásmidos pXGNEO-CPOX^{V33} y pXGNEO-FeCH^{G17A} se utilizaron los oligonucleótidos CPOXV33Fw/Rv y FeCHG17AFw/Rv (Anexo 3), respectivamente, y se empleó el kit QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para el plásmido pXGPURO-PPOX no fue necesario realizar mutagénesis dirigida, puesto que para la obtención de los parásitos mutantes nulos se empleó el sistema CRISPR-Cas9 en el cual los ARNg son dirigidos a las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen, a diferencia de la estrategia empleada para la delección de los genes *cpx* y *feh* en donde los sgRNA son dirigidos a la secuencia codificante. Los plásmidos obtenidos se secuenciaron para verificar la introducción de las mutaciones puntuales dirigidas y la ausencia de mutaciones inespecíficas.

Finalmente, los promastigotes de las líneas de *L. major* LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-} y LmFeCH^{-/-} se transfectaron con los constructos pXGNEO-CPOX^{V33}, pXGPURO-PPOX y pXGNEO-FeCH^{G17A}, respectivamente, y con los plásmidos vacíos pXGNEO y pXGPURO como controles. Los parásitos se transfectaron utilizando el protocolo de electroporación con tampón HBS descrito en el apartado 3.1.3.1, y seleccionados con concentraciones crecientes de geneticina (6-50 µg/mL) y puromicina (5-30 µg/mL).

3.7.5.2 Evaluación de actividad enzimática en promastigotes de *L. major*

Para evaluar la ausencia de actividad enzimática de la FeCH en la línea mutante LmFeCH^{-/-} y la correcta complementación genética con la copia episomal del gen, los parásitos control y los parásitos mutantes nulos transfectados con los plásmidos pXGNEO y pXGNEO-FeCH se incubaron a 28°C en medio RPMI modificado suplementado con 20% de SFBi depletado de hemo (SFBf) en ausencia y presencia de 10 µM de PPIX.

Como control del experimento se empleó medio suplementado con 20% de SFBf y 10 μ M de hemina. La multiplicación de los promastigotes en cultivo fue determinada mediante recuento celular utilizando un contador Z1TMCoulter Counter (Beckman Coulter) durante 9 días.

En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Dieter Jahn y la Dra. Martina Jahn (Universidad de Brunswick, Alemania), se evaluó la ausencia de actividad enzimática de las enzimas CPOX y PPOX en las líneas LmCPOX^{-/-} y LmPPOX^{-/-} y la correcta complementación genética con la copia episomal del gen correspondiente, mediante análisis de HPLC.

3.8 Generación de líneas de *L. major* bioluminiscentes

Se utilizó el plásmido pTb-AMLuc que contiene la secuencia codificante de la proteína luciferasa “red-shifted” de *Photinus pyralis* (PpyRE9H), el cual ha sido descrito previamente en (287) y amablemente cedido por el Dr. Martin C. Taylor (London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom) y el Dr. Bruce Branchini (Connecticut College, USA).

El gen de la luciferasa “red-shifted” (*lucRE9*) se subclonó en el vector de expresión constitutivo pLEXSy-bsd2.1 (Jena bioscience, Jena, Germany). El plásmido resultante, pLEXSy-bsd-LucRE9, se digirió con la enzima de restricción *SwaI* para obtener un ADN lineal conteniendo el gen *lucRE9* y el gen de resistencia a blasticidina (*bsd*) flanqueado por secuencias específicas del gen 18S rRNA para permitir su integración en el genoma. Los promastigotes de las diferentes líneas de *L. major* se transfectaron con 5 μ g de plásmido pLEXSy-bsd-LucRE9 linearizado utilizando el protocolo de electroporación con tampón HBS descrito en el apartado 3.1.3.1, y se seleccionaron con concentraciones crecientes de blasticidina (10-50 μ g/mL). La integración del fragmento en el locus 18S rRNA se confirmó mediante PCR utilizando los pares de oligonucleótidos 5’*ssu* (F3001) y 5’*utr* (A1715), y *bsd* (H4895) y 3’*ssu* (F3002) descritos en el manual LEXSYcon2.1 Expression Kit (Jena bioscience, Jena, Germany) (Anexo 1). Una vez confirmada la integración del gen *luc* en las diferentes líneas de *L. major* transfectadas, se determinó la correlación entre el número de parásitos y el valor de luminiscencia utilizando el kit Luciferase Assay System (Promega[®]). Brevemente, se cosecharon 40x10⁶ promastigotes en fase exponencial de crecimiento, se

resuspendieron en 1 mL de PBS 1X y se realizaron 5 diluciones seriadas 1:4 en el mismo tampón. Posteriormente, se sembraron 20 μ L de cada una de las diluciones por triplicado en placas de 96 pocillos blancas, se mezclaron con 20 μ L de tampón de lisis 1X y se incubaron durante 40 minutos a -80 °C, luego de los cuales se añadieron 30 μ L de sustrato de luciferasa a cada pocillo y se midieron los valores de luminiscencia utilizando un lector de microplacas TECAN® (Anexo 1).

3.9 Cultivos celulares de macrófagos e infección *in vitro* por *L. major*

Los cultivos celulares utilizados fueron la línea celular tumoral THP-1 y cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea de ratones C57BL/6 silvestres o mutantes nulos para la proteína ABCB6.

3.9.1 Cultivo y diferenciación de monocitos de la línea tumoral THP-1

La línea celular de monocitos humanos THP1 (Sigma) se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFBi, L-glutamina 2 mM, y 100 U/mL de penicilina/100 μ g/mL de estreptomicina, y mantenida a 37 °C y 5% de CO₂ en atmosfera humidificada a una densidad máxima de 2x10⁶ células/mL. Para los experimentos de infección, las células se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 3x10⁵ células por pocillo en 500 μ L del medio para evaluación por fluorescencia o en placas de 96 pocillos a una densidad de 3x10⁴ células por pocillo en 100 μ L del medio para evaluación por luminiscencia. Las células se diferenciaron en medio de cultivo suplementado con 20 ng/mL de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, Sigma) durante 72 horas a 37 °C y 5% de CO₂ en atmosfera humidificada. Posteriormente, el medio con las células en suspensión fue retirado y los macrófagos adheridos se cultivaron en medio fresco sin PMA. Los macrófagos adherentes se infectaron con las diferentes líneas de *L. major* como se describe en el apartado 3.9.3.

3.9.2 Obtención, cultivo y diferenciación de macrófagos murinos derivados de médula ósea

Los macrófagos de médula ósea se obtuvieron a partir de fémures de ratones C57BL/6 entre 6 y 8 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical

y se manipularon en cabina de flujo laminar vertical para garantizar la esterilidad de las células obtenidas. Se apartaron ambas patas posteriores y se obtuvieron los fémures intactos eliminando toda la musculatura circundante utilizando material quirúrgico estéril. Se cortaron las cabezas de los fémures y se introdujo una aguja calibre 25G en el centro del hueso, a través de la cual se adicionó lentamente medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de SFBi y 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomina utilizando una jeringa de 10 mL para obtener la médula ósea. Se recogió el eluido de varias médulas óseas en una misma solución, y seguidamente toda la suspensión de células se filtró utilizando un filtro Nylon Cell Strainer de 40 µm (BD Falcon), se centrifugaron a 300 RCF durante 8 minutos a 4°C y se lavaron con 5 mL del mismo medio. Las células obtenidas se contaron en cámara de Neubauer, se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 200.000 células por pocillo en 500 µL de medio de cultivo suplementado con 20 ng/mL de M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor, R&D Systems) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ en atmosfera humidificada. Luego de 72 horas se añadieron 500 µL adicionales de medio de cultivo fresco suplementado con 20 ng/mL de M-CSF, para permitir la completa diferenciación de los precursores de médula ósea a macrófagos adherentes. Las células se cultivaron por 3-5 días más hasta observar una confluencia superior al 70%, momento en el cual se empleó medio de cultivo sin M-CSF. Los macrófagos adherentes obtenidos fueron infectados con la línea de *L. major* LucRE9 como se describe en el siguiente apartado.

3.9.3 Infección *in vitro* de macrófagos por *L. major*

Los macrófagos THP-1 y los macrófagos derivados de médula ósea se infectaron con promastigotes de *L. major* en fase estacionaria de crecimiento en un ratio 1:10 (macrófagos:parásitos) en medio RPMI1640 o DMEM suplementado con 5% de SFBi y 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL, respectivamente, durante 24 horas a 35 °C y 5% de CO₂. Después de 24 horas de infección, se removió el exceso de parásitos y los macrófagos se incubaron nuevamente con el medio de cultivo habitual durante 5 días a 37 °C y 5% de CO₂ en atmosfera humidificada. Para la evaluación por fluorescencia, los cristales conteniendo los macrófagos infectados se retiraron de las placas, se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) y se tiñeron con DAPI (ProLong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen). Los cristales se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus IX81, y el número de parásitos intracelulares se determinó mediante el conteo

del número total de macrófagos, el número total de parásitos intracelulares y el porcentaje de macrófagos infectados por campo microscópico utilizando la herramienta de conteo del software de análisis de imágenes Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los resultados se expresaron como parásitos intracelulares por cada 100 macrófagos como se describe en (288).

Para la evaluación por luminiscencia se empleó el kit Luciferase Assay System (Promega). Brevemente, los pocillos conteniendo los macrófagos infectados fueron lavados 3 veces con PBS 1X, tras los cuales se añadieron 20 μ L de tampón de lisis 1X y las placas se incubaron durante 40 minutos a -80°C . Posteriormente, se añadieron 30 μ L de sustrato de luciferasa a cada pocillo y se midió la actividad luciferasa de los amastigotes intracelulares. Los valores de luminiscencia se registraron mediante un lector de microplacas TECAN Infinite F200[®].

3.9.4 Inhibición de síntesis de hemo en macrófagos infectados por *L. major*

Se emplearon dos inhibidores de la síntesis del grupo hemo, succinil acetona (SA) y lactofen (LAC), los cuales inhiben las enzimas ALAD y PPOX de la ruta de síntesis, respectivamente. Para verificar el bloqueo de la ruta de síntesis, se determinaron los niveles de hemo intracelular de las células THP1 tratadas con los inhibidores mediante el método de piridina hemocromo.

Los macrófagos THP1 se incubaron con 2.5 mM de SA o 10 μ M de LAC durante 24 horas previas a la infección con promastigotes de la línea *L. major* LucRE9 en fase estacionaria de crecimiento, tal como describe en el apartado 3.9.3. El tratamiento con los inhibidores se mantuvo hasta la finalización del experimento (120 horas post-infección). Para garantizar la ausencia de hemo intracelular en los parásitos, los promastigotes se cultivaron en medio de cultivo suplementado con 20% de SFBf durante las 72 horas previas a la infección. La replicación intracelular se determinó mediante la actividad luciferasa de los amastigotes intracelulares utilizando el kit Luciferase Assay System (Promega), tal como se describe en el apartado 3.9.3.

3.10 Infecciones *in vivo*

3.10.1 Modelos murinos de leishmaniosis cutánea

Se emplearon ratones de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos de Charles River Breeding Laboratories y mantenidos en las instalaciones del animalario del IPBLN. Para todos los procedimientos se siguieron las recomendaciones del CCAC (Canadian Council on Animal Care) y se solicitó la aprobación del protocolo de experimentación al CEPAFIC (Comité Español para la Protección de los Animales Utilizados con Fines Científicos).

3.10.1.1 Modelo murino en ratones BALB/c

Se emplearon ratones BALB/c para evaluar la habilidad de las líneas mutantes nulas de generar infección y producir la enfermedad. Para ello se emplearon 40 ratones machos, los cuales se dividieron en 8 grupos de 5 animales cada uno, los cuales se infectaron con diferentes líneas de parásitos: LmCas9, LmCas9/T7, LmCPOX^{-/-}, LmPPOX^{-/-}, LmFeCH^{-/-}, LmCPOX^{-/-}+CPOX, LmPPOX^{-/-}+PPOX y LmFeCH^{-/-}+FeCH. Los animales se infectaron subcutáneamente en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha con 10⁴ promastigotes metacíclicos contenidos en 40 µL de PBS estéril, empleando jeringas BD Ultra-Fine™ previa anestesia de los animales con xilacina (1 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal. La progresión de la enfermedad fue monitoreada semanalmente durante 8 semanas midiendo el espesor de la pata infectada con un calibrador digital (Mitutoyo, Japan). Se registró el espesor de la pata contralateral no infectada y se calculó la diferencia (Δ) entre ambas patas como parámetro de inflamación. La media y el error medio estándar se calcularon a partir de los valores Δ obtenidos para cada uno de los grupos de animales, y se graficaron usando el programa GraphPad Prism7.

A la semana 8 post-infección los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y se obtuvieron la pata infectada y el nódulo linfático poplíteo de cada animal para la determinación de la carga parasitaria por el método de dilución limitante. Brevemente, las células de cada órgano se obtuvieron mediante disrupción mecánica de los tejidos en 3 mL medio RPMI modificado suplementado con 10% de SFBi y 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomycin, utilizando émbolos de jeringas de 5 mL y cajas de Petri de 60x15mm para llevar a cabo la maceración. Las soluciones se

centrifugaron a 150 RCF durante 10 minutos a 4 °C para remover los restos de tejido, se recuperó el sobrenadante, y se centrifugó nuevamente a 1000 RCF durante 10 minutos a 4 °C para concentrar las células obtenidas, las cuales se resuspendieron en 5 mL de medio RPMI modificado suplementado con 20% de SFBi y 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomicina. Se adicionaron 200 µL de la solución obtenida en la primera columna de una placa de 96 pocillos transparente, a partir de la cual se realizaron 16 diluciones seriadas 1:10 en los pocillos restantes conteniendo 180 µL del mismo medio de cultivo, cambiando las puntas cada 4 diluciones para evitar trasladar parásitos adheridos a la cara exterior de las puntas a las siguientes diluciones. Las soluciones de cada órgano se plaquearon por triplicado, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 9 días a 28°C.

La lectura de las cargas parasitarias se realizó en un microscopio invertido determinando visualmente la dilución máxima en la que se observaron promastigotes. La carga parasitaria se expresó como la máxima dilución en la cual se observó crecimiento de promastigotes para cada uno de los órganos procesados. En los casos en que se utilizó solo una porción del órgano para la determinación de las cargas parasitarias, estas se expresaron como: (dilución máxima/ mg de órgano macerado) x mg de órgano total.

3.10.1.2 Modelo murino en ratones C57BL/6

Se emplearon ratones C57BL/6 para determinar la importancia del transportador ABCB6 en el desarrollo de la leishmaniosis cutánea causada por *L. major*. Para ello se emplearon 14 ratones machos, 7 ratones silvestres y 7 ratones mutantes nulos para ABCB6 amablemente cedidos por el Dr. Gergely Szakacs (Institute of Cancer Research, Medical University of Viena, Austria). Los animales se infectaron subcutáneamente en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha con 10^4 promastigotes metacíclicos de *L. major* LucRE9 contenidos en 40 µL de PBS estéril, empleando jeringas BD Ultra-Fine™ previa anestesia de los animales con xilacina (1 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal. La progresión de la enfermedad fue monitoreada semanalmente durante 8 semanas midiendo el espesor de la pata infectada con un calibrador digital (Mitutoyo, Japan). Se registró el espesor de la pata contralateral no infectada y se calculó la diferencia (Δ) entre ambas patas como parámetro de inflamación. La media y el error medio estándar se calcularon a partir de los valores Δ obtenidos para cada uno de los grupos de animales, y graficados usando el programa GraphPad Prism7.

A la semana 8 post-infección los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y se obtuvieron la pata infectada y el nódulo linfático poplíteo de cada animal para la determinación de la carga parasitaria mediante actividad luciferasa utilizando el kit ONE-Glo™ Luciferasa Assay System (Promega). Brevemente, las células de cada órgano se obtuvieron mediante disrupción mecánica de los tejidos en 3 mL medio RPMI modificado suplementado con 10% de SFBi y 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomina, utilizando un embolo de una jeringa de 5 mL y cajas de Petri de 60x15mm para llevar a cabo la maceración. Las soluciones obtenidas se incubaron durante 10-15 minutos en hielo para permitir la decantación de los restos de tejidos. Posteriormente se tomaron 30 µL de la parte superior de las soluciones y se adicionaron en placas de 96 pocillo blancas conteniendo 90 µL de PBS 1X estéril, por triplicado. Se añadieron 30 µL del reactivo ONE-Glo™ Luciferasa Assay System (Promega) a cada pocillo y se midió la actividad luciferasa de los amastigotes intracelulares tras 3-5 minutos de incubación. Los valores de luminiscencia se registraron mediante un lector de microplacas TECAN Infinite F200®.

3.10.2 Infección artificial de *Phlebotomus perniciosus*

Las infecciones artificiales de los insectos vectores fueron realizadas por la Dra. Maribel Jiménez y el Dr. Ricardo Molina del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España), utilizando una colonia de *Phlebotomus perniciosus* previamente establecida (289). Para evaluar la importancia de la ruta de síntesis de hemo en el desarrollo de promastigotes metacíclicos infectivos de *L. major* en el insecto vector, los flebótomos fueron infectados con promastigotes de las líneas LmCas9, LmFeCH^{-/-} y LmFeCH^{-/-}+FeCH. *Phlebotomus perniciosus* hembras de 5 a 7 días de edad fueron alimentadas artificialmente durante al menos una hora con sangre de conejo desfibrinada infectada con promastigotes estacionarios (5×10^7 parasitos/mL) a través de una membrana de piel de pollo unida a un dispositivo de alimentación. Los flebótomos fueron diseccionados a los 4, 7 y 9 días post-infección para evaluar la localización y la intensidad de la infección en el intestino medio utilizando un microscopio de contraste de fases (290).

Resultados

ANTECEDENTES

La auxotrofia para hemo ha sido considerada por muchas décadas como el “Talón de Aquiles” de los parásitos tripanosomátidos (275). Esto debido a que, aunque necesitan el grupo hemo, no pueden sintetizarlo y por lo tanto deben adquirirlo de su hospedador. La secuenciación de los genomas de varias especies de tripanosomátidos mostró que, tal como se esperaba, estos organismos no contienen los genes que sintetizan para las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de hemo (263). Mediante análisis filogenéticos se ha demostrado que la ausencia de estos genes en los parásitos tripanosomátidos se debe a su pérdida completa durante el curso de la evolución de los kinetoplástidos y que *Leishmania* spp., a diferencia de *Trypanosoma* spp, sorprendentemente ha rescatado por transferencia horizontal a partir de γ -proteobacterias los genes que codifican para las tres últimas enzimas de esta ruta, CPOX, PPOX y FeCH (226,232).

La presencia de estos tres últimos genes en *Leishmania* spp. es enigmática, teniendo en cuenta que no son capaces de sintetizar un precursor anterior de la ruta. Se ha sugerido que además de la captación de hemo preformado, los parásitos podrían obtener precursores de porfirinas del macrófago para la síntesis de su propio hemo. Para ello, el precursor CPIII sintetizado en el citoplasma de las células hospederas podría ser transportado a la vacuola parasitófora a través de un mecanismo desconocido, tras lo cual sería captado por los parásitos intracelulares que convertirían dicho precursor en hemo, utilizando las últimas tres enzimas de la ruta (226) (Figura 2.1). También se ha propuesto que el hemo que alcanza la vacuola parasitófora podría ser parcialmente degradado o químicamente modificado en el ambiente ácido de este compartimento, requiriendo estas enzimas para su reconstitución (266) (Figura 2.1).

Sin embargo hasta la fecha es desconocida la funcionalidad de esta ruta parcial de síntesis de hemo en *Leishmania* y de su importancia en el ciclo de vida de los parásitos. En los siguientes capítulos estudiamos la capacidad que tienen los parásitos de *L. major* para utilizar precursores de porfirinas en sus estadios promastigote y amastigote para la síntesis de su propio hemo, y además evaluamos la funcionalidad y posible esencialidad de las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major* a lo largo del ciclo del parásito.

En el caso de demostrar que las proteínas de síntesis de hemo en *L. major* son esenciales su proliferación y virulencia, podrían constituir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis.

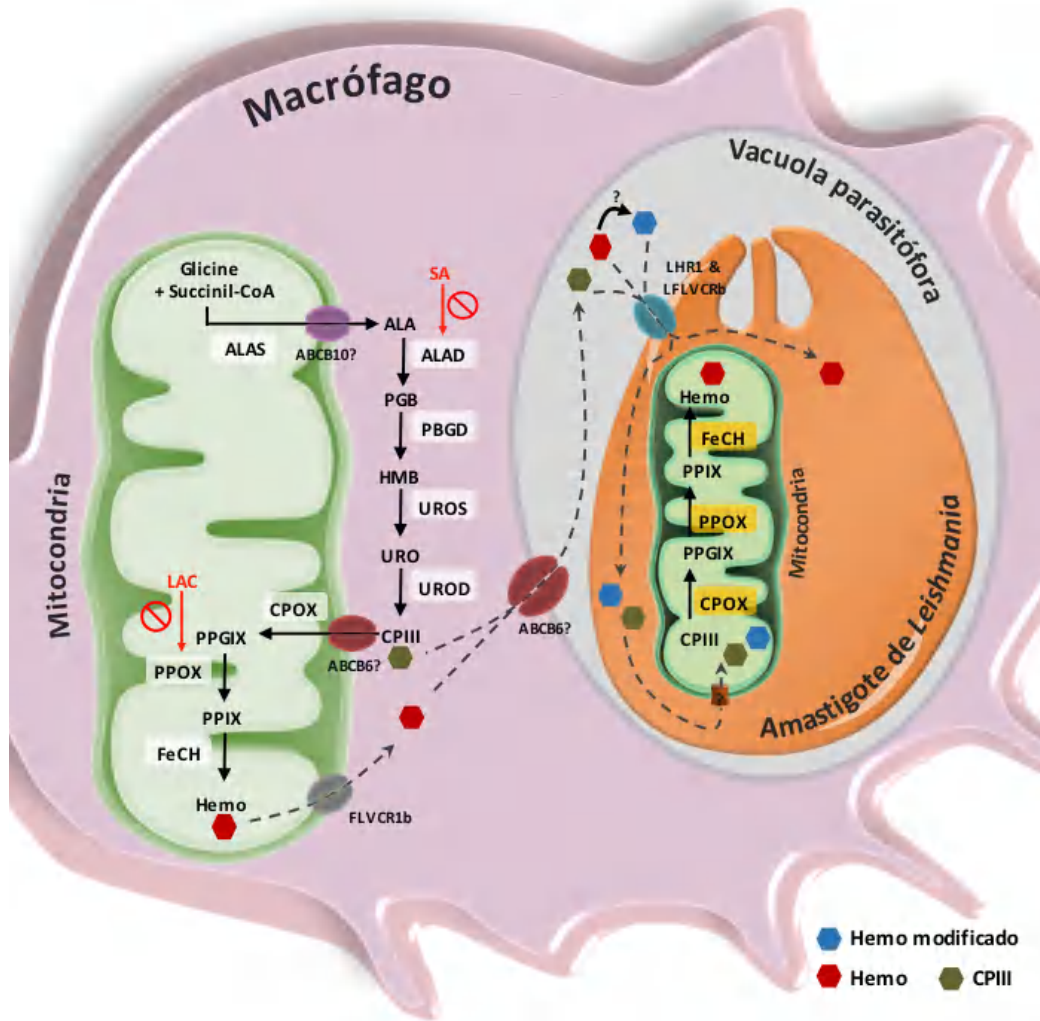


Figura 2.1. Modelo propuesto para el tráfico y captación de porfirinas en amastigotes de *Leishmania*.

En el macrófago, el hemo se sintetiza a través de una ruta enzimática de ocho pasos dividida entre la mitocondria y el citosol. Tras la síntesis del ácido delta-aminolevulínico (ALA) por condensación de glicina y succinil-CoA, el ALA sale de la mitocondria por un mecanismo desconocido y se convierte en porfobilinógeno (PGB) por acción de la ALA deshidratasa (ALAD), una enzima que puede ser inhibida por succinilacetona (SA). El PGB luego se convierte en coproporfirinógeno III (CPIII) a través de tres reacciones enzimáticas citosólicas. El CPIII es transportado dentro de la mitocondria, probablemente por la proteína ABCB6, donde se convierte en protoporfirinógeno IX (PPGIX) por la actividad de la coproporfirinógeno oxidasa (CPOX). El PPGIX luego se transforma en protoporfirina IX (PPIX) mediante la protoporfirinógeno oxidasa dependiente de oxígeno (PPOX/HemY), que es inhibida por el lactofen (LAC). Finalmente, la ferrochelataza (FeCH) cataliza la inserción de hierro ferroso en el anillo de PPIX para generar hemo, que sale de la mitocondria a través de FLVCR1b. Las porfirinas (hemo o CPIII) podrían ser internalizadas a la vacuola parasitadora por mecanismos desconocidos. Allí, el amastigote puede importar hemo, CPIII o hemo modificado químicamente en el ambiente ácido de la vacuola parasitadora a través de los transportadores LHR1 y LFLVCRb. La internalización de los precursores y/o derivados del hemo en la mitocondria de los amastigotes podría permitir que los parásitos intracelulares sinteticen su propio hemo usando las enzimas CPOX, PPOX (HemG) y FeCH.

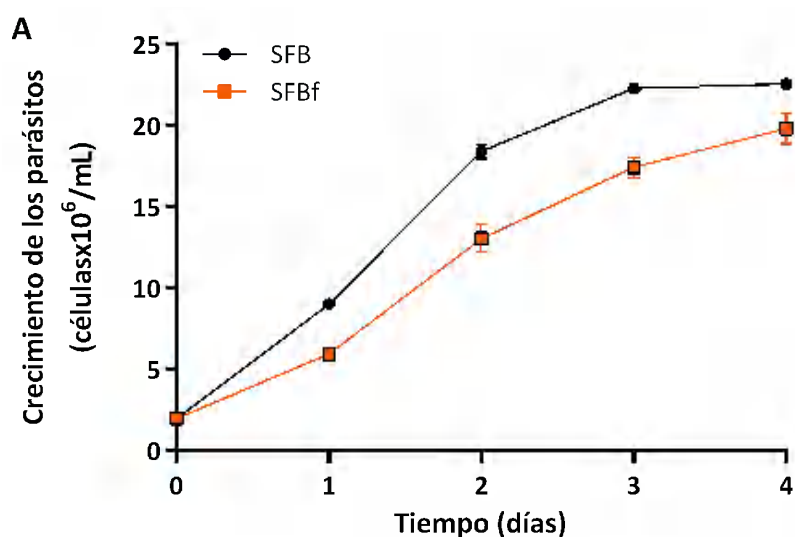
4 RESULTADOS

CAPÍTULO I: Captación de porfirinas precursoras de hemo en *L. major*

1. *Leishmania* puede utilizar precursores de hemo para garantizar su supervivencia y proliferación en los estadios de promastigote y amastigote

Teniendo en cuenta el modelo propuesto para captación de porfirinas en amastigotes de *Leishmania* descrito previamente (Figura 2.1), decidimos estudiar si los parásitos intracelulares utilizan su ruta parcial de síntesis de hemo para su crecimiento y supervivencia. Adicionalmente, también confirmamos el uso de precursores en el estadio promastigote de los parásitos.

En primer lugar, los promastigotes de *L. major* fueron cultivados en medio RPMI modificado en el que se sustituyó el SFB habitual por un SFB depletado de hemo (20% de SBFf), cuya obtención se detalla en el apartado 3.1.1 de materiales y métodos. Se empleó medio suplementado con 10% de SFB como control. Como se observa en la figura 2.2, los parásitos son capaces de crecer durante 96 horas (4 días) en ausencia de una fuente de hemo, tras las cuales comienzan una fase estacionaria de manera similar a los parásitos crecidos en medio habitual (SFB) (Figura 2.2A). El número de generaciones acumuladas en el día 4 día fueron similares entre los parásitos cultivados en presencia (3.5 generaciones) y ausencia de hemo (3.3 generaciones) (Figura 2.2B). Este resultado sugiere que los parásitos almacenan hemo intracelular que les permiten crecer *in vitro* en ausencia de cualquier fuente de hemo exógeno.



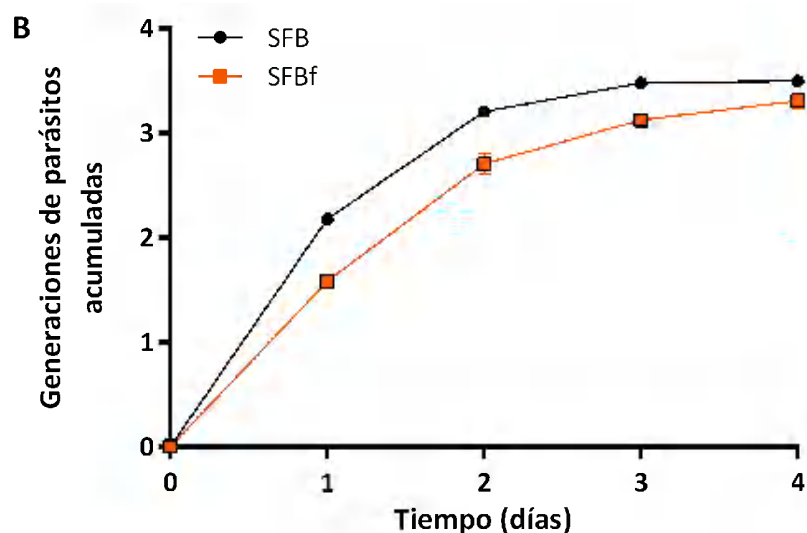


Figura 2.2. Los promastigotes de *L. major* pueden multiplicarse durante un pase en ausencia de hemo exógeno. Curvas de crecimiento (A) y número de generaciones (B) de parásitos crecidos en presencia (10% de SFB) o ausencia de hemo (20% de SFBf). Los promastigotes fueron ajustados a una concentración inicial de 2×10^6 parásitos/mL y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 7 días. El número de generaciones acumuladas se calculó empleando la fórmula $[n = (\log \text{número final de parásitos} - \log \text{número inicial de parásitos}) / \log 2]$. Los experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

Sin embargo, en un segundo pase en ausencia de este metabolito, los parásitos son incapaces de crecer a menos de que el medio de cultivo sea suplementado con una fuente de porfirinas exógena como hemoglobina (2.5 μ M), hemina (10 μ M) o PPIX (10 μ M) (Figura 2.3).

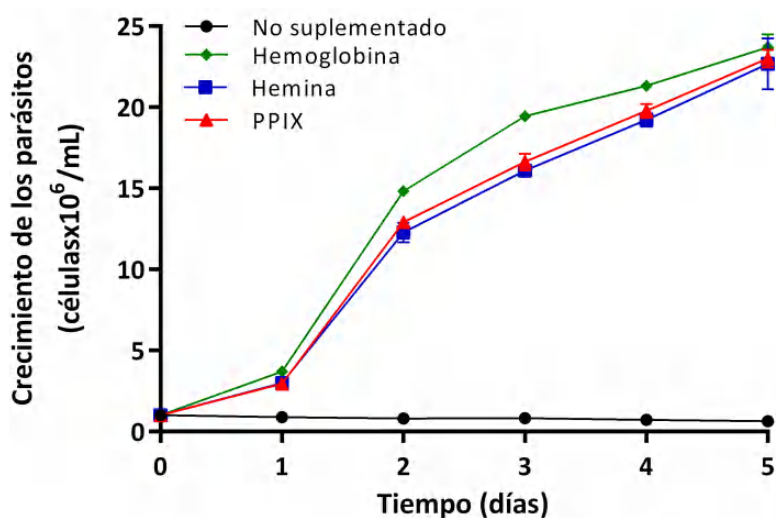


Figura 2.3. Los promastigotes de *L. major* pueden utilizar PPIX como fuente de hemo. Curvas de crecimiento de parásitos depletados de hemo subcultivados en medio RPMI modificado suplementado con 20% de SFBf y diversas fuentes de porfirinas: 2,5 μ M hemoglobina, 10 μ M hemina o 10 μ M PPIX. Los

promastigotes fueron ajustados a una concentración de 10^6 parásitos/mL y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 5 días. Los experimentos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Es posible que los parásitos agoten las reservas de hemo durante los primeros días de cultivo en medio depletado y, por lo tanto, en un segundo pase no cuenten con esta fuente endógena que les proporcione dicho metabolito esencial para su crecimiento.

El crecimiento de los promastigotes en medio suplementado con PPIX (Figura 2.3) indica de manera indirecta que los parásitos de *L. major* expresan una ferroquelatasa funcional que les permite sintetizar su propio hemo a partir de dicho precursor, tal como había sido reportado previamente (228,264). Los precursores CPIII y PPGIX no son comercialmente disponibles debido a su inestabilidad, por lo que no fue posible evaluar su efecto sobre el crecimiento de los promastigotes en medio de cultivo depletado de hemo.

En cuanto al estadio amastigote, previamente se había reportado un estudio en el cual se sugería que *Leishmania* era incapaz de utilizar intermediarios metabólicos del macrófago para sintetizar su propio hemo, puesto que el bloqueo de la ruta de síntesis de hemo de la célula hospedera utilizando el inhibidor SA no afectaba la replicación intracelular de los amastigotes. Por lo tanto, se propuso que los parásitos eran incapaces de sintetizar hemo a partir de porfirinas del macrófago y que debían adquirirlo a partir de fuentes exógenas (264). Para comprobar dichos resultados, realizamos ensayos de infección intracelular en células THP1 con promastigotes de la línea luminiscente *L. major* LucRE9, cuya generación y validación se describe en el Anexo I. Los macrófagos se infectaron durante 5 días con promastigotes en fase estacionaria no depletados de hemo, crecidos en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB hasta el día de la infección. Los macrófagos THP1 fueron tratados durante 24 horas previas a la infección y durante los 5 días post-infección con el inhibidor SA, utilizando como control macrófagos no tratados.

Tal y como estaba descrito, no se observaron diferencias significativas en la replicación intracelular de los amastigotes cuando las células fueron tratadas con 1 mM o 2.5 mM de SA en comparación con las células control sin tratamiento (Figura 2.4).

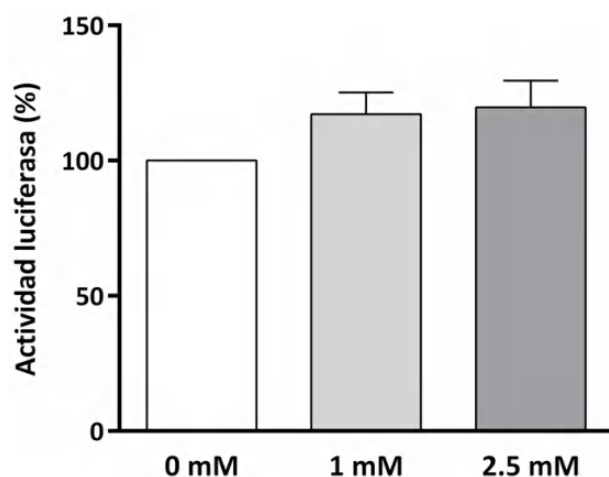


Figura 2.4. Los amastigotes de *L. major* no depletados de hemo son capaces de replicarse en ausencia de precursores de porfirinas sintetizadas por el macrófago. Los macrófagos THP1 sin tratar (0 mM) o tratados con 1 mM y 2.5 mM de SA fueron infectados con promastigotes de *L. major* LucRE9 en fase estacionaria de crecimiento que no habían sido previamente depletados de hemo. Tras 5 días de infección se determinó la actividad luciferasa de los macrófagos infectados. Los valores se expresan como el porcentaje de la actividad luciferasa respecto al valor obtenido de las células sin tratamiento (100%).

Sin embargo, en estos experimentos los parásitos no fueron previamente depletados de hemo y por lo tanto, los parásitos podrían utilizar el hemo almacenado para su replicación dentro de los macrófagos durante el tiempo del ensayo *in vitro*, sin necesidad de captar las porfirinas intermediarias de la célula hospedera, de manera similar a los promastigotes que son capaces de crecer durante un pase en medio de cultivo sin una fuente exógena de hemo.

Para comprobar nuestra hipótesis, decidimos realizar las infecciones de las células THP1 con parásitos depletados de hemo. Para ello, los promastigotes fueron cultivados durante 72 horas previas a la infección en medio de cultivo suplementado con 20% de SFBf, con el fin de agotar las reservas intracelulares de este metabolito en los parásitos.

Por su parte, los macrófagos THP-1 fueron tratados en los casos indicados durante 24 horas previas a la infección y durante los 5 días post-infección con dos inhibidores de la síntesis de hemo: i) la succinilacetona (SA) que inhibe la enzima ALAD, la cual cataliza el segundo paso de la ruta de síntesis y por lo tanto, bloquea la formación de cualquier tipo de porfirina, y ii) el lactofen (LAC) que inhibe de manera específica la enzima PPOX del macrófago (Figura 4.7, Capítulo 3) por lo que permite la formación de CPIII pero evita la formación de PPIX y hemo (Figura 2.1).

Los macrófagos infectados y tratados con 2.5 mM de SA mostraron una reducción significativa de la luminiscencia (84%, $p < 0.001$) en comparación con los macrófagos control no tratados (Figura 2.5), indicando que los parásitos utilizan las porfirinas sintetizadas por los macrófagos para soportar su replicación intracelular. Adicionalmente, en los macrófagos infectados y tratados con 10 μ M de LAC se observó una mayor luminiscencia a la observada con el inhibidor SA (3.2 veces más, $p < 0.005$) (Figura 2.5), sugiriendo que los amastigotes también pueden sintetizar hemo utilizando las porfirinas precursoras, posiblemente CPIII, acumuladas en el macrófago por efecto del inhibidor.

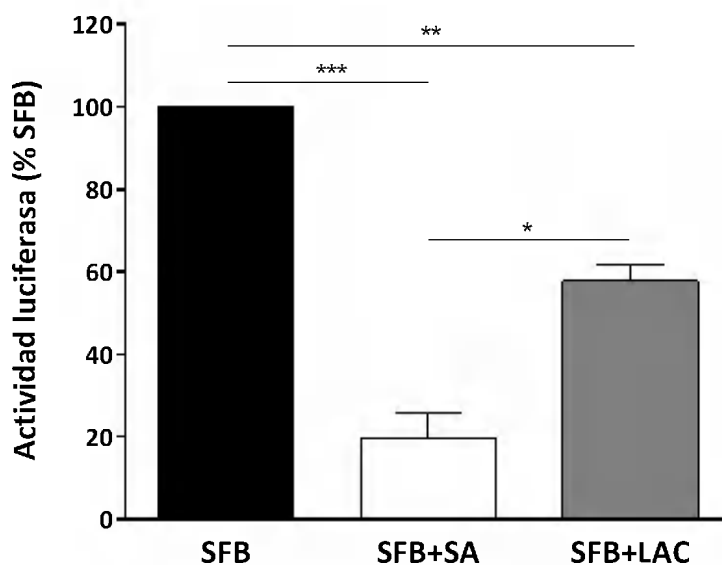


Figura 2.5. Los amastigotes de *L. major* pueden utilizar porfirinas sintetizadas por el macrófago para su replicación intracelular. Los macrófagos THP1 sin tratar (SFB) o tratados con 2.5 mM de SA o 10 μ M de LAC fueron infectados con promastigotes de *L. major* LucRE9 en fase estacionaria de crecimiento, previamente depletados de hemo. Tras 5 días de infección se determinó la actividad luciferasa de los macrófagos infectados. Los valores se expresan como el porcentaje de la actividad luciferasa respecto al valor obtenido de las células sin tratamiento (100%). Los valores representan la media de 3 experimentos independientes \pm SEM. (*, $p < 0.005$, **, $p < 0.002$, *** $p < 0.001$)

Este efecto no se debe a una citotoxicidad de los inhibidores sobre las células THP1, ya que como se observa en la figura 2.4 la actividad luciferasa de los macrófagos infectados no disminuye al utilizar parásitos no depletados de hemo. Para verificarlo se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro* utilizando el método colorimétrico MTT, en los que se observó que las concentraciones de SA y LAC empleadas en los experimentos no eran tóxicas para las células THP1, alcanzando en ambos casos porcentajes de supervivencia celular $>99\%$. Finalmente, tampoco se debe a un efecto citotóxico de los compuestos sobre los parásitos de *L. major*, ya que mediante MTT también se alcanzaron

valores de supervivencia >99% para las concentraciones de inhibidores utilizados en los ensayos de infección.

2. Papel del transportador ABCB6 del macrófago en el rescate de hemo por *L. major*

Como se ha descrito en el apartado anterior, los amastigotes de *L. major* son capaces de captar hemo y porfirinas precursoras de los macrófagos, las cuales son probablemente convertidas en hemo por acción de las 3 últimas enzimas de la ruta presentes en estos parásitos. Además, estudios previos han demostrado que las porfirinas generadas por los macrófagos son capaces de llegar al interior de la vacuola parasitófora a través de un mecanismo desconocido y alcanzar los amastigotes intracelulares (229) (Figura 2.6).

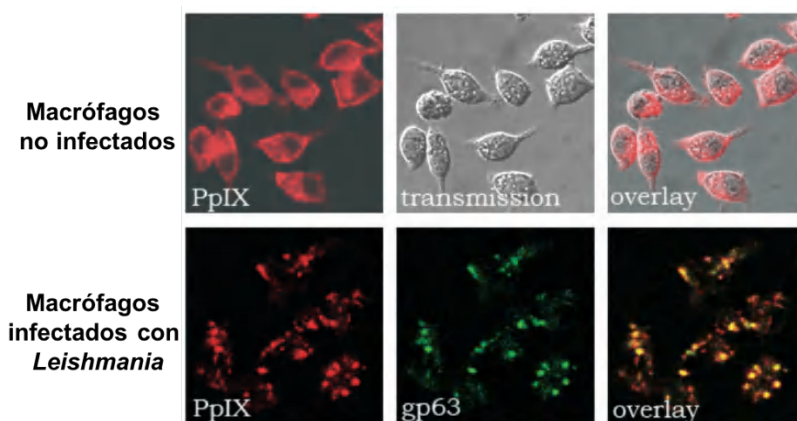


Figura 2.6. Entrada de porfirinas a la vacuola parasitófora de macrófagos infectados con *Leishmania*. Los macrófagos no infectados tratados con 1 mM del precursor ALA acumulan la porfirina PPIX fluorescente (color rojo) en la mitocondria (arriba). Sin embargo, en macrófagos infectados con *Leishmania* (verde), la porfirina PPIX se acumula en el interior de los parásitos (abajo). Figura tomada de (229)

La proteína ABCB6 es un transportador de porfirinas que se localiza en la membrana externa de la mitocondria en donde contribuye a la entrada a este organelo de la porfirina precursora CPIII de la síntesis de hemo, aunque también se ha descrito su localización en membrana plasmática y lisosomas (193,195). De manera interesante, el transportador ABCB6 también se ha visto localizado alrededor de la vacuola parasitófora de macrófagos infectados con *Leishmania* (291) (Figura 2.7). En esta localización, ABCB6 podría ejercer el papel de transportador de porfirinas, especialmente CPIII y hemo, al interior de la vacuola parasitófora conteniendo los amastigotes de *Leishmania*.

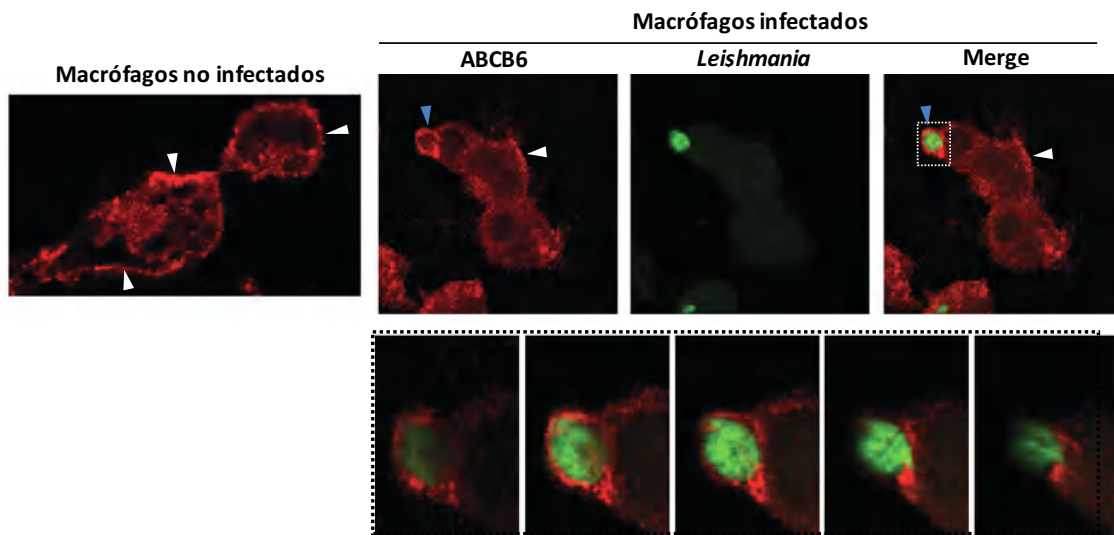


Figura 2.7. Localización subcelular de la proteína ABCB6 en macrófagos no infectados e infectados con *Leishmania*. El transportador ABCB6 se indica en rojo y los amastigotes intracelulares de *Leishmania* en verde. ABCB6 se localiza en la membrana celular tanto en células infectadas como no infectadas (flechas blancas) y alrededor de la vacuola parasitófora en macrófagos infectados con *Leishmania* (flecha azul). Imágenes ampliadas a diferentes planos del eje Z mostrando la localización específica del transportador ABCB6 en la membrana de la vacuola parasitófora conteniendo los amastigotes intracelulares (abajo). Figura modificada de (291)

Teniendo en cuenta las anteriores evidencias, nuestra hipótesis es que el transportador ABCB6 podría tener un papel determinante en la replicación intracelular de *Leishmania*, al participar en la entrada de porfirinas, especialmente hemo y CPIII, a la vacuola parasitófora. Para comprobarlo, se realizaron infecciones *in vitro* de los macrófagos de médula ósea de ratones C57BL/6 silvestres y ABCB6^{-/-} con parásitos de la línea *L. major* luminiscentes LucRE9, previamente depletados de hemo, durante 5 días. La actividad luciferasa de los macrófagos ABCB6^{-/-} infectados fue significativamente menor (37.3%, p<0.05) a la obtenida en los macrófagos silvestres (Figura 2.8), lo indica que los amastigotes se replicaron de manera menos eficiente en ausencia del transportador.

Tras estos resultados decidimos analizar si este comportamiento podría correlacionarse con un retraso en el establecimiento de la enfermedad empleando un modelo murino de leishmaniasis cutánea. Para llevar a cabo este experimento, se infectaron ratones C57BL/6 WT y ABCB6^{-/-} con 10⁴ promastigotes metacíclicos de *L. major* LucRE9 por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha, como se indica en el apartado 3.10.1.2 de materiales y métodos. La inflamación de la pata infectada fue monitoreada semanalmente durante 8 semanas.

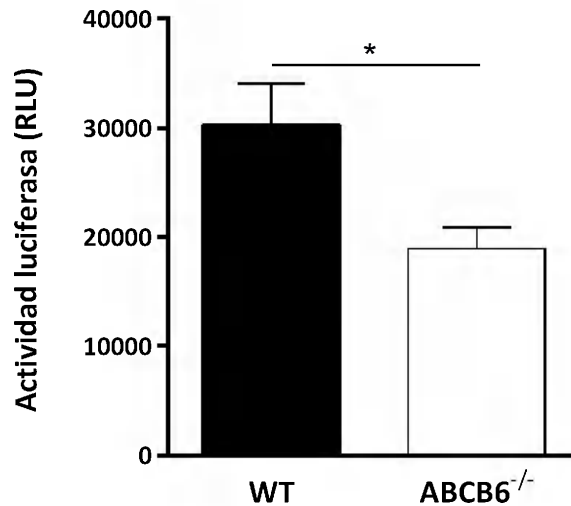


Figura 2.8. La replicación intracelular de los amastigotes de *L. major* se ve disminuida en ausencia del transportador mamífero ABCB6. Los macrófagos derivados de médula ósea de ratones silvestres (WT) y mutantes nulos para el transportador ABCB6^{-/-} fueron infectados con promastigotes de *L. major* LucRE9 en fase estacionaria de crecimiento, previamente depletados de hemo. Tras 5 días de infección se determinó la actividad luciferasa de los macrófagos infectados, cuyos resultados se expresan en unidades relativas de luz (RLU). Los valores representan las medias \pm SEM de 6 replicas experimentales (*, $p < 0.05$).

Ambos grupos de ratones comenzaron a desarrollar una inflamación progresiva en el sitio de inoculación a partir de la segunda semana post-infección, alcanzando un nivel máximo a la cuarta semana, a partir de la cual las patas infectadas comenzaron a recuperarse tal como se espera de este modelo (Figura 2.9A). Sin embargo los ratones ABCB6^{-/-} mostraron una menor inflamación en la almohadilla plantar desde la semana 4 hasta la semana 8 post-infección en comparación con el grupo control, alcanzado diferencias estadísticamente significativas en las últimas tres semanas (Figura 2.9A-B).

Al final del experimento se determinaron las cargas parasitarias de las patas infectadas utilizando el sistema ONE-Glo™ Luciferase (Promega) como se detalla en el apartado 3.10.1.2 de materiales y métodos. Aunque se observó una tendencia a la reducción en las cargas parasitarias de las patas de los ratones ABCB6^{-/-} en comparación con los ratones WT (Figura 2.9C), esta disminución no fue estadísticamente significativa.

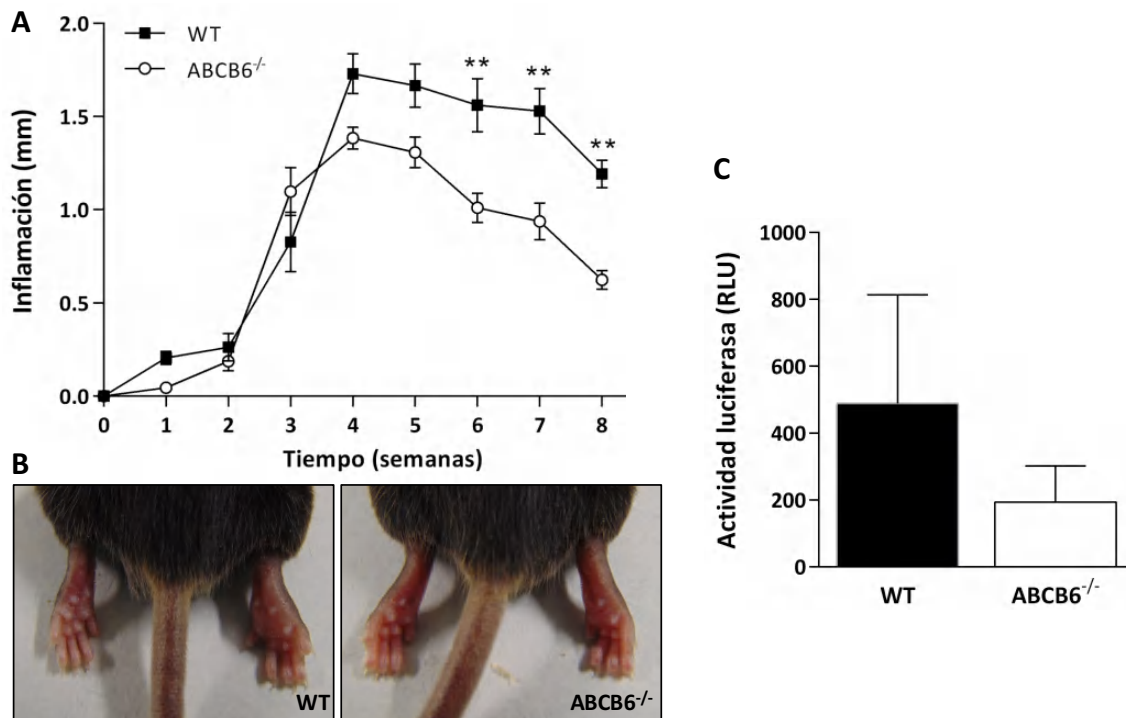


Figura 2.8. Efecto del transportador ABCB6 en la progresión de la enfermedad en un modelo murino de leishmaniasis cutánea. A) Progresión de la inflamación monitoreada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada). B) Imágenes representativas de la inflamación en la almohadilla plantar de los ratones WT y ABCB6^{-/-} tras 6 semanas de infección. C) Carga parasitaria de las patas infectadas determinadas mediante la actividad luciferasa de los amastigotes presentes en el tejido infectado, expresadas en unidades relativas de luz (RLU). Los valores representan las medias \pm SEM de 7 ratones. (**, $p < 0.002$)

En conjunto, nuestros resultados sugieren que ABCB6 no parece tener un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad y por lo tanto no representaría un blanco interesante para el tratamiento de la leishmaniasis.

CAPITULO II: Caracterización de la enzima coproporfirinógeno oxidasa de *L. major*

La coproporfirinógeno oxidasa (CPOX) es la antepenúltima enzima de la ruta de biosíntesis de hemo (Figura 1.10). La evolución ha seleccionado dos tipos de CPOX cuya estructura proteica y mecanismos de acción son diferentes, y aún así catalizan la misma reacción de descarboxilación oxidativa del CPIII para la formación de PPGIX. La forma HemF, presente en animales y microorganismos aerobios, utiliza oxígeno como aceptor final de electrones mientras que la forma HemN, presente en microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos, utilizan un clúster [4Fe-4S] y S-adenosil-L-metionina como cofactores (142). Algunos microorganismos como *E. coli* tienen ambas formas de la CPOX que son catalíticamente activas durante la síntesis de hemo (157).

Todas las especies de *Leishmania* secuenciadas hasta la fecha contienen en su genoma un gen putativo que codifica para coproporfirinógeno oxidasa, de las cuales se han obtenido las estructuras cristalizadas de las especies *L. naiffi*, *L. donovani* y *L. major*. Sin embargo aún no existe evidencia experimental de la funcionalidad de la proteína CPOX en *Leishmania* ni de su posible participación en la utilización del intermediario CPIII derivado de los macrófagos para la síntesis de su propio hemo. En el presente capítulo se describe la caracterización de la enzima coproporfirinógeno oxidasa de *L. major* y el estudio de su esencialidad en parásitos de esta especie.

1. *L. major* contiene un gen que codifica para una enzima tipo coproporfirinógeno oxidasa tipo HemF

El genoma de *L. major* contiene un gen putativo coproporfirinógeno oxidasa (LmCPOX) de copia única localizado en el cromosoma 6 (LmjF.06.1270) que codifica una proteína de 301 aminoácidos con un peso molecular teórico de 34.3 kDa. Este gen presenta una elevada sintonía con respecto a los genes ortólogos de otras especies de *Leishmania* anotados hasta la fecha. Asimismo, se observa un elevado porcentaje de identidad entre los genes tanto en longitud (906 pb) como en secuencia (Figura 3.1).

Adicionalmente se observa una elevada identidad entre las enzimas de *Leishmania* spp. con la CPOX tipo HemF dependiente de oxígeno de *E. coli* ($\geq 80\%$), en contraste con la baja identidad observada con la CPOX tipo HemN independiente de oxígeno de esta

misma bacteria ($\leq 28\%$). Por otra parte, la identidad y la similitud con respecto a las enzima humana y de levaduras es cercana al 42% y 61% respectivamente.

	LmCPOX	LdCPOX	LinCPOX	LmxCPOX	LbrCPOX	LpaCPOX	EcHemF	EcHemN	ScCPOX	HsCPOX
LmCPOX		95.68	95.35	94.35	90.03	90.03	63.79	11.38	43.16	31.28
LdCPOX	99.00		99.67	95.02	90.70	90.70	63.12	11.60	42.55	30.62
LinCPOX	98.67	99.67		94.68	90.37	90.37	62.46	11.60	42.55	30.62
LmxCPOX	98.00	98.67	98.33		93.36	93.36	62.79	10.72	42.55	30.62
LbrCPOX	96.67	97.34	97.01	97.35		99.34	62.46	10.72	43.47	30.62
LpaCPOX	96.34	97.01	96.68	97.01	99.67		62.13	11.60	42.86	30.62
EcHemF	80.40	80.73	81.06	80.40	80.40	80.07		10.28	42.68	32.38
EcHemN	28.01	28.01	28.01	27.13	26.69	27.35	25.82		10.92	11.56
ScCPOX	61.09	61.70	61.70	61.39	60.49	60.19	60.36	28.61		36.77
HsCPOX	41.85	42.07	42.07	41.85	42.29	42.51	46.26	29.76	48.81	

Figura 3.1. Matriz de identidad y similitud entre diferentes proteínas CPOX. Los alineamientos de las secuencias fueron realizados utilizando el software Clustal Omega. Los porcentajes de identidad se muestran en verde y los porcentajes de similitud en blanco. Números de acceso a Genbank: *Escherichia coli* HemN (EcHemN) AZH89636.1, *Escherichia coli* HemF (EcHemF) AAC76864.2, *Saccharomyces cerevisiae* (ScHem13) ONH79886.1, *Homo sapiens* (HsCPOX) BAA04033.1, *L. braziliensis* (LbrCPOX) XP_001562058.1, *L. panamensis* (LpaCPOX) AIN95685.1, *L. mexicana* (LmxCPOX) XP_003872141.1, *L. major* (LmCPOX) XP_001680900.1, *L. infantum* (LinCPOX) XP_001463209.1, *L. donovani* (LdCPOX) AYU76165.1.

El análisis filogenético de las proteínas CPOX dependientes de oxígeno de diversos organismos indican que la LmCPOX se agrupa con las proteínas homólogas pertenecientes a γ -proteobacterias, mientras que encuentra distantemente relacionado con sus contrapartes en plantas, levaduras y mamíferos (Figura 3.2).

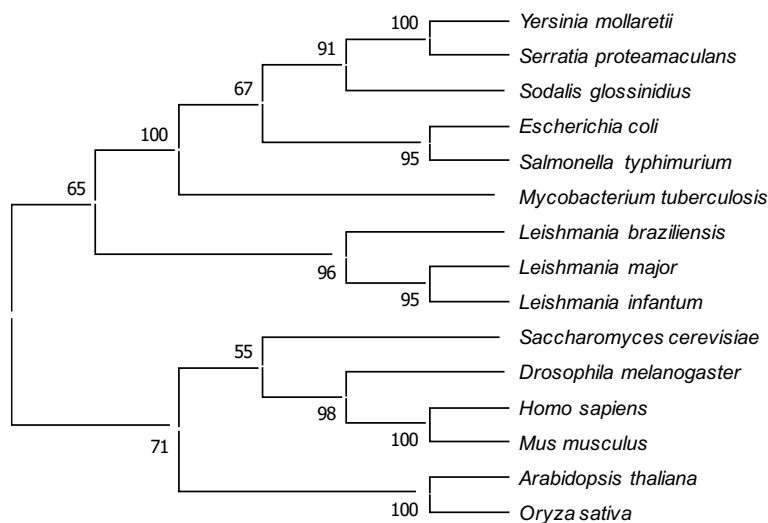


Figura 3.2. Análisis filogenético de CPOXs de diversos organismos. El árbol filogenético fue generado por máxima verosimilitud con un *bootstrapping* de 100 iteraciones utilizando el software MEGA 6.0. Los números en cada uno de los clados indican el porcentaje de veces que ese clado se repitió tras el análisis de *bootstrap*, tomando como significativos aquellos superiores al 50% de las veces. Números de acceso a UniProt: *Arabidopsis thaliana* (CPX1) Q9LR75, *Drosophila melanogaster* (DmCPOX) Q9V3D2, *Escherichia coli* (EcHemF) P36553, *Homo sapiens* (HsCPOX) P36551, *L. braziliensis* A4H4T9, *L. infantum* A4HT18, *L. major* (LmCPOX) P84155, *Mus musculus* P36552, *Mycobacterium tuberculosis* A0A1K3DP06, *Oryza sativa* Q7XPL2, *Saccharomyces cerevisiae* (ScHem13) P11353, *Serratia proteamaculans* A8GHH2, *Sodalis glossinidius* Q2NS88, *Yersinia mollaretii* (YmHemF) C4SI07.

Estas observaciones están de acuerdo con los datos obtenidos previamente en los análisis evolutivos de la ruta de síntesis de hemo en kinetoplastos, que indican que el gen *cpx* de *Leishmania* spp. ha sido adquirido mediante transferencia horizontal a partir de proteobacterias (226,230,232).

Utilizando el software Clustal Omega (292), se realizó un alineamiento de la secuencia proteica de LmCPOX con secuencias de aminoácidos de otras proteínas homólogas de origen procariota y eucariota conocidas. Este análisis comparativo permitió determinar que a diferencia de otras enzimas de origen eucariótico (*H. sapiens* y *D. melanogaster*), la LmCPOX carece de una región N-terminal de localización mitocondrial, al igual que las proteínas homólogas tipo HemF de levadura y bacterias (Figura 3.3). El alineamiento múltiple también indica que la LmCPOX contiene los residuos Arg 262 (111), Asp 400 (249) y Arg 401 (250), los cuales son esenciales para la unión del sustrato y/o la reacción de catálisis (Figura 3.3). Existen también 4 residuos de histidina 248 (97), 258 (107), 297 (146) y 327 conservados en las proteínas CPOX de todas las especies, de los cuales 3 están presentes en *L. major* (Figura 3.3). Los números fuera y dentro de los paréntesis indican la posición de aminoácidos en la secuencia de la proteína humana y de *L. major* respectivamente.

LmCPOX	-----	0
EcCPOX	-----	0
YmCPOX	-----	0
ScCPOX	-----	0
HsCPOX	MALQLGRLLSSGGPCWLVARGGGCGGPRAWSQCGGGGLRAWRSQRSAAGRVCRRPPGPAGTEQSR	60
DmCPOX	----- MNALRHT ----- ISLVSLSLGTFLV	19
LmCPOX	-----	0
EcCPOX	-----	0
YmCPOX	-----	0
ScCPOX	-----	0
HsCPOX	GLGHGSTSRGGPPWVGTGLAAALAGLVGLATAAFGHVQRAEMLPKTSGTRATSLGRPEEEEE	120
DmCPOX	RRTRGPH-ARGFLLGTGLGL-----ASFSAVTYAH-----SAEAVDPKV	57
LmCPOX	-----MSLAVEAVKDFLLKLQDDICEALEA-EDGQATFVED	35
EcCPOX	-----MKPDAHQVQKQFLNLQDTICQQLTA-VDGA-EFVED	34
YmCPOX	-----MNLPDIAQIKTYLLSLQDKICVALAA-ADGSATFAEE	36
ScCPOX	-----MPAPQ-----DPRNLPIRQQMEALIRRKQAEITQGLS--IDTVKFHAD	42
HsCPOX	DELAHRCSSFMAPPVTDLDELRRRPGDMKTKMELLILETQAQVCQALAQ-VDGGANFSVD	179
DmCPOX	NGVQMNTSRFMAEPI TDSKALLGDKENMRHRMELIMEIQAEFCRALEAEENCQKFKVD	117
	: : * . * * :	
LmCPOX	KWTRE-GGGGRTRVMVDGAVIEKGGVNFSHVYGKGLPMSSTERH-----	79
EcCPOX	SWQRE-AGGGGRSRVLRNGGVFEQAGVNFSHVHGEAMPASATAHR-----	78
YmCPOX	NWTRE-EGGGGRSRVLINGAVFEQAGVNFSHVSGATLPASATAHR-----	80
ScCPOX	TWTRGNDGGGGTSMVIQDGTTFEKGGVNVSVVYGQLSPAASAMKADHKNLRLPEDPKTG	102
HsCPOX	RWERK-EGGGGISCVLQDGCVF EKAGVSI SVHGNLSEEAQMRSRGKVLKTK-----	232
DmCPOX	RWERP-EGGGGITCVLQDGDVFEKAGVNI SVVTGSLPPAAVQMRARGKNLKE-----	169
	* * **** : * : * . * : * * : :	
LmCPOX	-PDIAGCNFEAMGVSLVHHPKPNHVPTSEANVRRLFVAERE-GKEPVWVFGGGFDLTPYYA	137
EcCPOX	-PELAGRSFEAMGVSLVHHPHNYPVPTSEANVRFVIAEKP-GADPVWVFGGGFDLTPFYG	136
YmCPOX	-PELAGRSFQALGVSLVHHPPLSPYLPTSEANVRFVIAEKP-GEDPVWVFGGGFDLTPFYG	138
ScCPOX	LPVTDGVKFFACGLSMVIHPVNPAPTTELNYRYFETWNQDGTPTQWVFGGGADLTPSYL	162
HsCPOX	---DGKLKPFAMGVSSVHHPKNPAPTTELHFNRYFEVEEADGN-KQWVFGGGCDLTPYYL	288
DmCPOX	---GASLPPFFASGVSAVHHPRNPHVPTTELHFNRYFEVETAKGE-KQWVFGGGTDLTPYYL	225
	* * *:* * :* . * : * * * * * . * * * * * * * * *	
LmCPOX	VEEDCRDFHQAQDLCKPFGADVYARFKGWCDEYFFI PYRNEARGIGLFFDDLNEWPF	197
EcCPOX	FEEDAIHWERTARDLCLPFGEDVYPRYKKWCDEYFYLKHRNEQRGIGLFFDDLNPDFD	196
YmCPOX	FEEDAVHWHTAYQLCQPFGEQIYPRYKKWCDDYFYIKHRHEARGIGLFFDDLNSPDFD	198
ScCPOX	YEEDGQLFHQLHKDALDKHDTALYPRFKKWCDEYFYITHRKETRGIGGIFDDYDERDPQ	222
HsCPOX	NQEDAVHFRHTLKEACDQHGPDLYPKFKKWCDDYFFIAHRGERRGIGGIFDDLSPSKE	348
DmCPOX	CEKDASHFHQTLKSACDEHDPYYPFRFKKWCDDYFRKHRNESRGIGGIFDDIDSPNQE	285
	: : * : * : . . * : * * * * * : : * * * * * * * * * :	
LmCPOX	KCFEFVQAVGKGYMDAYIPIVNRKNTPYTEQQVEFQEFRGRYAEFNLVIDRGTGKFLGQ	257
EcCPOX	RCFAFMQAVGKGYTDAYLPIVERRKAMAYGERERNFQLYRRGRYVEFNLVWDRGTLFGLQ	256
YmCPOX	TCSFTQAVGDDGLDAYLPIVARRKALSWGERERQFQLYRRGRYVEFNLVWDRGTLFGLQ	258
ScCPOX	EILKMVEDCFDAFLPSYLTIVKRRKDMPTKEEQWQAIRRGRYVEFNLIYDRGTQFGLR	282
HsCPOX	EVFRFVQSCARAVVPSYIPLVKKHCDDSFTPQEKLWQQLRRGRYVEFNLIYDRGTGKFLG	408
DmCPOX	AAFNFVSSCARAVIPSYVPLVRKHKNREYGNNERQWQLLRGRYVEFNLIYDRGTGKFLY	345
	: : . . : * : * : : : . : : * * * * * . * * * * * * * * *	
LmCPOX	S-GGRTESILISLPPRARWGYNWQPEPGTPEARLLEYFLTKRQWV-----	301
EcCPOX	T-GGRTESILMSMPLVRWEYDYQPKDGSPEAAL-SEFIKVRDWW-----	299
YmCPOX	T-GGRTESILMSLPLVRWEYNYQPAADSPEAALYRDFLPVKDWLSAGGH	308
ScCPOX	TPGSRVESILMSLPEHASWLYNHPAGSREAKLLEVTTKPREWVK-----	328
HsCPOX	TPGSRYESILMSLPLTARWEYMHSPSENSKEAEILEVLRHPRDWR-----	454
DmCPOX	TPGARYESILMSLPLHARWEYMHEPKSQSEEGKLMKVLKNPKDWW-----	390
	: * . * * * * : * : * . * * * * : * : : : * * * * * * * * * :	

Figura 3.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas CPOX dependientes de oxígeno (HemF) de organismos procariontes y eucariotes. El péptido señal de direccionamiento a mitocondria presente en la región N-terminal se indica en negrita. Las histidinas conservadas en todas las enzimas CPOX se coloran en negro (excepto la His327 ausente en *L. major* coloreada en gris) y los

aminoácidos conservados en el centro activo se colorean en rojo (Arg), amarillo (Asp) y azul (Arg). También se indican los aminoácidos idénticos (*), aminoácidos con propiedades muy similares (:) y aminoácidos con propiedades poco similares (.). El alineamiento fue realizado mediante el software Clustal Omega.

A diferencia de las proteínas de origen eucariota, algunas bacterias contienen además una CPOX tipo HemN, las cuales contienen un motivo cisteína altamente conservado CXXXCXXXC esencial para la formación de los clúster [4Fe-4S] y la posterior catalización de la reacción de descarboxilación oxidativa en ambientes anaerobios. El alineamiento múltiple de la LmCPOX con secuencias de enzimas CPOX independientes de oxígeno, indican la ausencia del motivo CXXXCXXXC y de otros residuos catalíticos esenciales en la LmCPOX, mostrando valores de identidad y similitud de solo 11.38% y 28.01% con la HemN de *E.coli*, indicando que es poco probable que la enzima CPOX de *L. major* haya evolucionado a partir de una enzima anaerobia (Fig 3.4).

LmCPOX	MSLAVEAVKDFLLKLDQDDICEALEAEDGQATFVEDKWTREGGGGRTRVMVDGAVIEKGG	60
EcHemN	MS--VQQI-DWDLAL-----IQKYNYSG---PRYT-----SYPTA	29
	** * : * : * * * : * : . * * *	
LmCPOX	VNFESHVYGKGLPMSSTERHPD-----IAGCNFEAMGVSLVIHPKNPHV	103
EcHemN	LEFSEDFGEQAFLOAVARYPERPLSLVHIIPFCHKLCYFCGCNKIVTRQ---QHKADQYL	86
	::** . : * : : : . * : * : : : * : * * * . * : : :	
LmCPOX	PTS----HANVRLFVAEREGKEPVWWFGGGFDLTPYYAVEEDCRDFHQ-----	147
EcHemN	DALEQEI VHRAPLFA-GR-HVSQLHWGGGTP----TYLNKAQISRLMKLLRENQFNADA	140
	: : * * . * : : * * * * * : : : :	
LmCPOX	-----VAQDLCKPF-----GADVYARFKGWCDEYFFIPYRNEARG	182
EcHemN	EISIEVDPREI ELDVLDHLRAEGFNRLSMGVQDFNKEVQRLVNRQDEEFIFALLNHARE	200
	: * : . : : : * : * : * * * : * : * * *	
LmCPOX	IGGL-----FFDDLNEWFFE-----	197
EcHemN	IGFTSTNIDLIYGLPKQTPESFAFTLKRVAELNPDRLSVFNIAHLPTIFAAQRKIKDADL	260
	** * * . : : :	
LmCPOX	-----KCFEFVQAVGKGYMD--AY-----IPIVNR-----R-----	221
EcHemN	PSPQQKLDILQETIAFLTQSGYQFIGMDHFARPDELAVAQREGVLRNFQGYTTQGDTD	320
	: : * : * : : : : : : : * * *	
LmCPOX	-----KNTPYTEQQVEFQEFRGRYAEFNLVIDRGTKFGQLQSGGRTESILISLP	270
EcHemN	LLGMGVS AISMIGDCY AQNKELKQYYQQV-DEQGNALWRGIALTRDDCIRR-DVIKSLI	378
	. * : * * * : : : : * . : : * * : : . * : : * *	
LmCPOX	PRARWGNWQPEPGTPEARLTHEYFLTKRQWV-----	301
EcHemN	--CNFRLDYAPIEKQWDLHFADYFAEDLKL LAPLAKDGLVDVDEKGIQVTAKGRLLIRNI	436
	. : : : * : : : * * . : : :	
LmCPOX	-----	301
EcHemN	CMCFD TYLRQKARMQQFSRVI	457

Figura 3.4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína CPOX de *L. major* y la CPOX tipo HemN de *E. coli*. El motivo CXXXCXXXC conservado en las CPOX independientes de oxígeno se colorea en negro y otros los residuos catalíticos esenciales en rojo. Se indican los aminoácidos

idénticos (*), aminoácidos con propiedades muy similares (:) y aminoácidos con propiedades poco similares (.). El alineamiento fue realizado mediante el software Clustal Omega.

Conforme a lo anterior, las estructuras cristalizadas de la CPOX de *L. major* con el ligando unido, indica que LmCPOX es una proteína tipo HemF que requiere oxígeno molecular como aceptor final de electrones (PDB # 3DWR, PDB # 3DWS). Además, la estructura tridimensional muestra que LmCPOX es una proteína homodimérica, en la que los residuos conservados Arg111, Asp249 y Arg250 se encuentran localizados posiblemente en el sitio activo de la proteína (Figura 3.5).

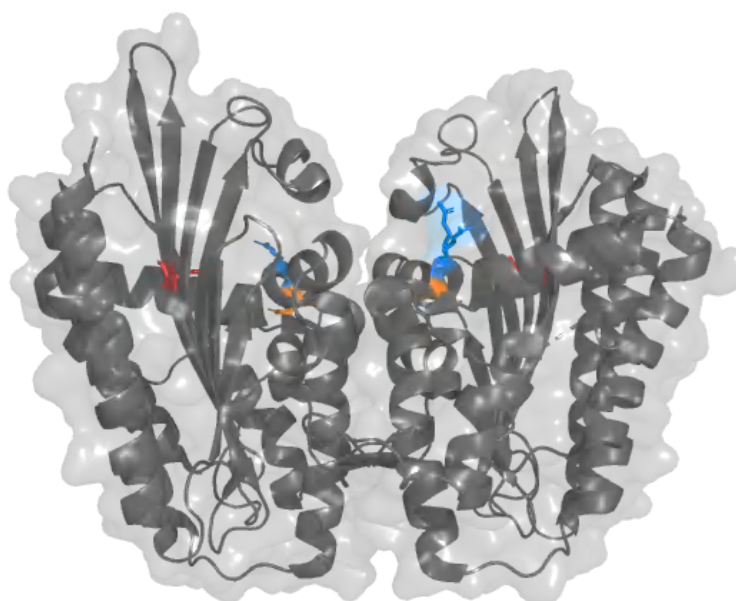


Figura 3.5. Estructura de la proteína LmCPOX. Se utilizó el programa PyMOL para indicar en el homodímero de la proteína LmCPOX la localización de los residuos conservados de Arg111 (rojo), Asp249 (amarillo) y Arg250 (azul), posiblemente localizados en el sitio activo de la proteína. Se utilizó la estructura cristalográfica de la proteína de *L. major* descrita previamente en PDB (2QT8).

Gracias a la estructura cristalizada de la proteína LmCPOX se pudo realizar un alineamiento estructural con la base de datos de proteínas PDB utilizando el servidor DALI (293). Se observó una significativa similitud estructural con la proteína Hem13 de *S. cerevisiae* (PDB #1TLB), lo cual se corresponde con el alto porcentaje de identidad (43%) entre las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas observado previamente (Figura 3.1). Nuestros resultados coinciden con un estudio previo en el cual se describió la estructura cristalizada de la Hem13 de *S. cerevisiae*, en el cual se observó que dicha

proteína sólo presentaba una similitud estructural significativa con la proteína CPOX de *L. major* (153). La LmCPOX tiene la misma topología y forma el mismo homodímero que su contraparte Hem13, además, presenta la misma estructura de conformación abierta en la que el sitio activo se encuentra abierto y accesible. Los residuos de arginina se encuentran dirigidos hacia la hendidura del sitio activo, en donde parecen interactuar con las cadenas laterales de los grupos propionato del sustrato, mientras que el residuo aspartato está implicado en la coordinación de los grupos NH del tetrapirrol (153) (Figura 3.5).

Cada monómero de la proteína LmCPOX, al igual que Hem13, consiste en una larga lámina beta antiparalela de siete cadenas rodeada por hélices alfa (153) (Figura 3.6). Aunque la CPOX humana también tiene la misma topología, presenta un porcentaje de identidad inferior con respecto a LmCPOX (31%), lo cual se evidencia en una menor similitud estructural (Figura 3.6).

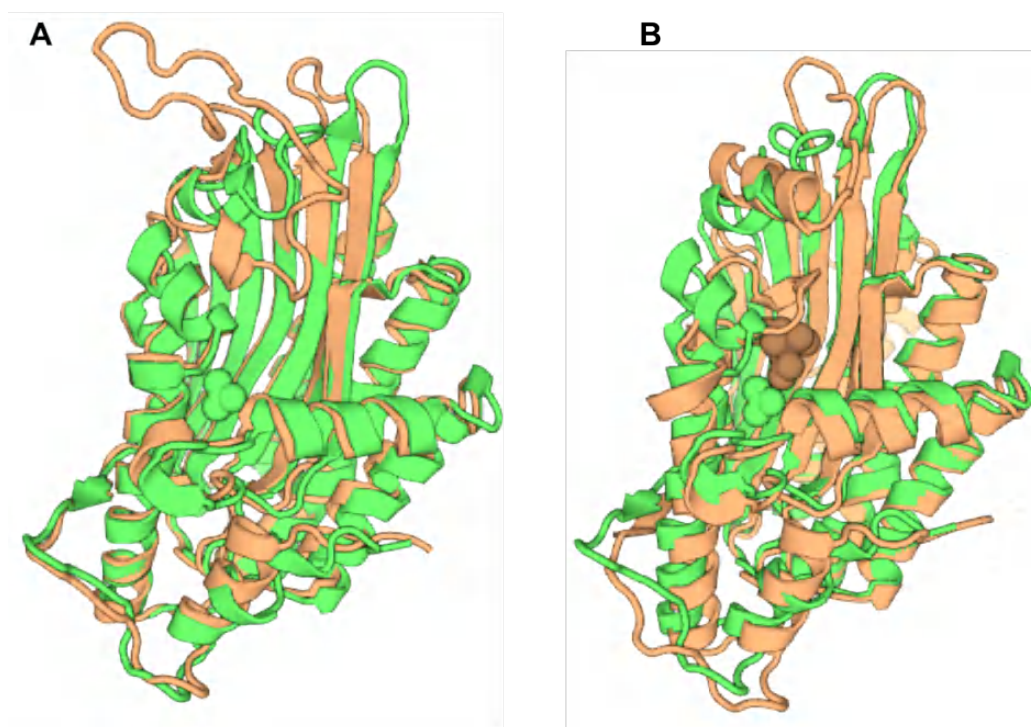


Figura 3.6. La LmCPOX presenta la misma topología que otras CPOX tipo HemF eucariotas. Superposición de los modelos de las estructuras 3D de las proteínas LmCPOX (PDB#2QT8), Hem13 (PDB#1TLB) y HsCPOX (PDB#2AEX). Se muestra que el monómero de la LmCPOX (verde) es estructuralmente similar a su contraparte Hem13 (naranja) en levaduras (A), mientras que su estructura es menos conservada en comparación con la CPOX de humanos (naranja) en la cual el sitio activo se localiza en otra región del monómero (B).

2. El gen *lmcpx* codifica una enzima coproporfirinógeno oxidasa funcional

Para conocer si el gen *cpox* de *L. major* codifica una proteína funcional se realizó un ensayo de complementación utilizando la cepa haploide $\Delta hem13$ de *S. cerevisiae* auxótrofa para hemo, en la cual el gen que codifica para la CPOX (Hem13) fue deletado y sustituido por el cassette de resistencia a geneticina. Como resultado, las levaduras mutantes solo crecen en medio rico YPD suplementado con hemina.

En primer lugar, se clonó el gen *cpox* de *L. major* (LmCPOX) en el plásmido de expresión constitutiva para levaduras pDR y se transformaron las levaduras $\Delta hem13$ con esta construcción. Adicionalmente, las levaduras fueron transformadas con el plásmido pDR vacío como control. Como se observa en la figura 3.7, las levaduras auxótrofas $\Delta hem13$ transformadas con el plásmido pDR vacío no presentan crecimiento en el medio YPD, a menos de que las placas de cultivo sean suplementadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina (izquierda). Por el contrario, las levaduras transformadas con el plásmido pDR conteniendo el gen *lmcpx* fueron capaces de crecer en ausencia de una fuente exógena de hemo (derecha), indicando que las levaduras han recuperado la habilidad de sintetizar su propio hemo como resultado de la actividad enzimática de la proteína LmCPOX.

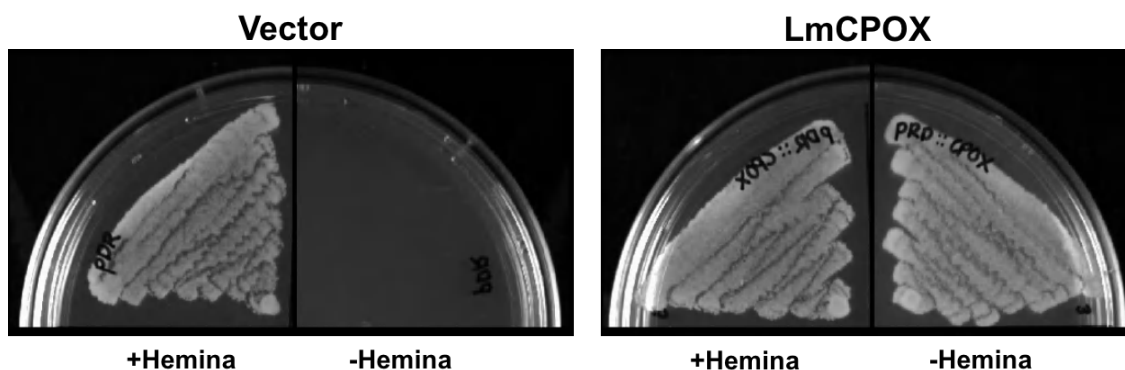


Figura 3.7. La LmCPOX es una enzima funcional. Las imágenes muestran el crecimiento de las levaduras $\Delta hem13$ transformadas con el vector pDR vacío como control (izquierda) o con el vector conteniendo el gen *lmcpx* (derecha) en placas de medio YPD sólido suplementadas (+) o no (-) con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina.

La complementación funcional las levaduras $\Delta hem13$ mediante la expresión heteróloga del gen *lmcpx*, confirma que la LmCPOX es una proteína funcionalmente activa que media la conversión del intermediario CPIII a PPGIX en ambientes aerobios.

3. La LmCPOX de *L. major* es una enzima citosólica

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la LmCPOX muestra que esta proteína no contiene en su región N-terminal la señal de localización mitocondrial presente en otras proteínas homólogas de origen eucariota (Figura 3.3). Además, los programas de predicción de localización celular indicaron que esta proteína no presenta ningún péptido señal aparente (SignalIP4.0, TargetP) y que no se localiza en la mitocondria (MitoProII).

Para estudiar la localización celular de la proteína CPOX de *L. major*, el gen *lmcpx* fue clonado en el plásmido de expresión para *Leishmania* pXG-/GFP+, eliminado el codón de parada de la secuencia de ADN para permitir su fusión a la proteína GFP en su extremo C-terminal. Los promastigotes de *L. major* transfectados con el constructo pXG-CPOX/GFP+ fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia, observando que la proteína se localiza en el citosol de los parásitos (Figura 3.8).

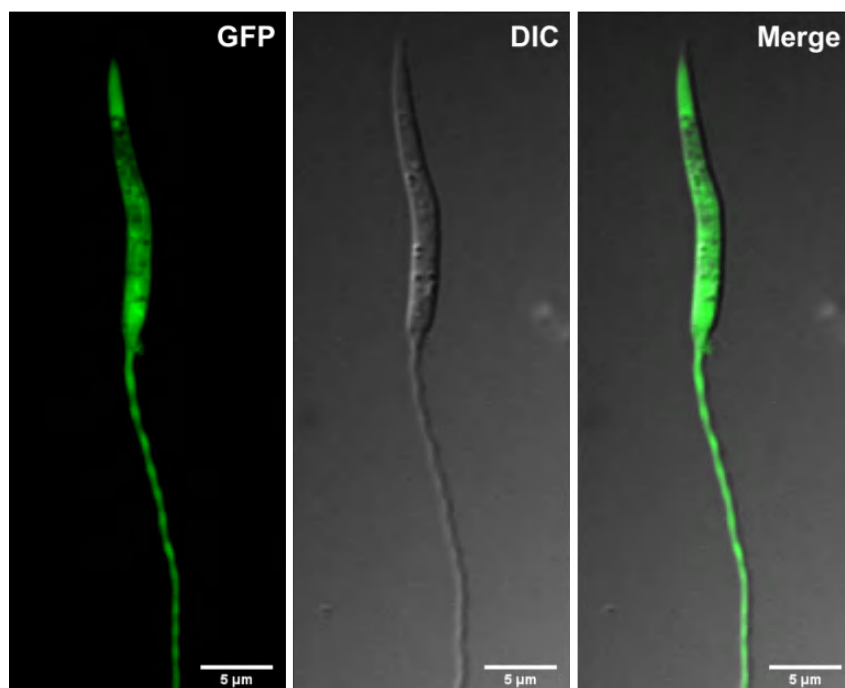


Figura 3.8. Localización celular de LmCPOX-GFP. Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia para determinar la localización la proteína. La imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) se observa a la derecha. Barra de escala: 5 µm. Imagen representativa de promastigotes de *L. major* que expresan la proteína fluorescente LmCPOX-GFP.

Dado que la proteína quimérica fluorescente es de expresión episomal, decidimos confirmar que la localización de la LmCPOX observada no era consecuencia de la sobreexpresión del gen. Para ello, realizamos un marcaje endógeno de LmCPOX con la

proteína fluorescente mNeonGreen en su extremo C-terminal, utilizando la metodología CRISPR-Cas9 descrita previamente (285) e implementada en nuestro laboratorio (Anexo 2).

Los parásitos de la línea de *L. major* Cas9/T7 fueron transfectados con dos productos de PCR correspondientes a: i) un ADN molde para la transcripción *in vivo* del ARNg por acción de la T7 ARN polimerasa, el cual hibrida cerca del codón de parada de la LmCPOX, y ii) un ADN donador conteniendo la proteína fluorescente mNeonGreen y el cassette de resistencia a puromicina flanqueado por regiones de homología de 30 nucleótidos específicos del gen *lmcpx*, que se integra en la región C-terminal de la proteína por recombinación homóloga en el sitio previamente clivado por el Cas9 (Figura 3.9A). Los parásitos transfectados fueron seleccionados con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina durante una semana, y posteriormente fueron observados mediante microscopía de fluorescencia.

Similar a lo observado con la proteína quimera LmCPOX-GFP, la proteína marcada endógenamente con mNeonGreen se localiza en el citosol de los promastigotes de *L. major*.

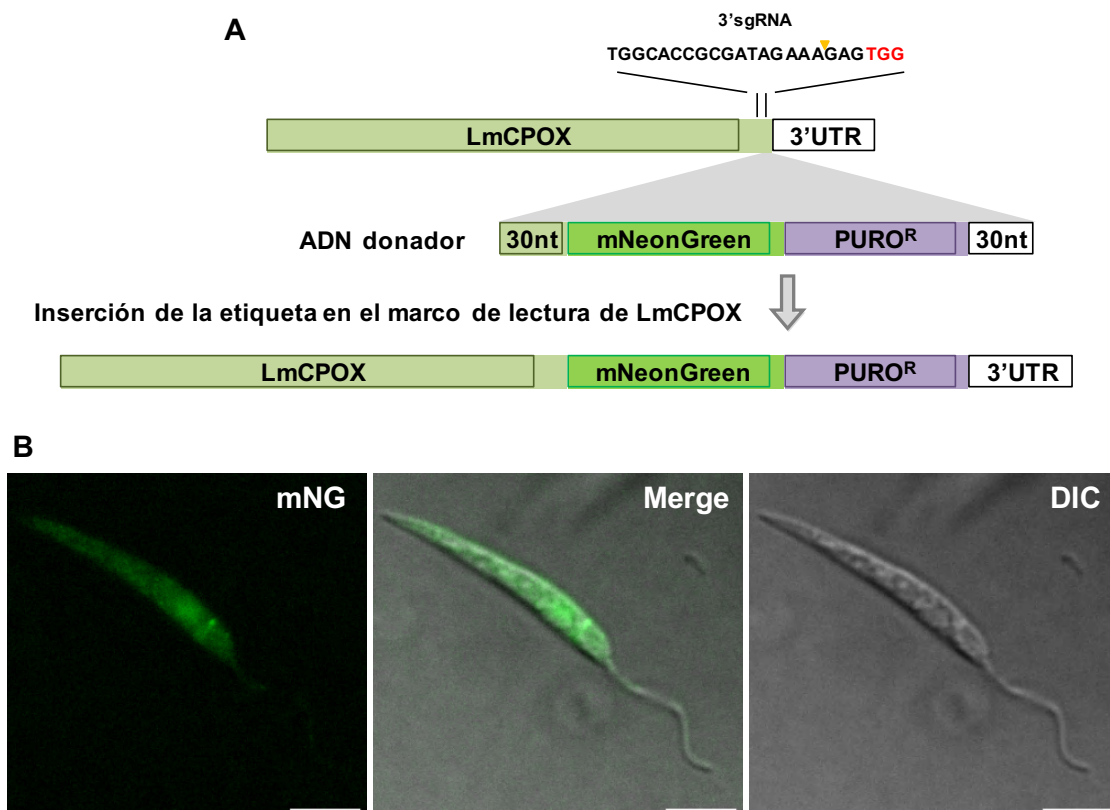


Figura 3.9. Localización celular de LmCPOX-mNeonGreen. A) Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 empleada para el marcaje *in situ* de la proteína LmCPOX en su extremo C-

terminal. El ARNg hibrida cerca del codón de parada de LmCPOX indicando el punto de ruptura de la doble cadena mediado por la proteína Cas9 (punta de flecha amarilla), tras lo cual el ADN es reparado por recombinación homóloga utilizando el ADN donador que contiene la proteína fluorescente. B) Los promastigotes de *L. major* expresando el gen *cpx* marcado endógenamente con mNeonGreen (mNG) fueron crecidos hasta fase logarítmica y fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia. La imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) se observa a la derecha. La figura muestra un parásito representativo de una población total con un patrón de fluorescencia similar. Barra de escala: 5 μ m.

La localización citosólica de LmCPOX no es una característica única de estos parásitos, puesto que las proteínas CPOX (Hem13) de la levadura *S. cerevisiae* y el parásito protozoo *P. falciparum* (PfCPO) también tienen una localización citosólica (153,294).

4. Generación de parásitos de *L. major* mutantes nulos para el gen *lmcpx*

Para la obtención de los parásitos doble mutantes nulos (KO) para la proteína LmCPOX se empleó la estrategia CRISPR-Cas9 descrita por primera vez en *Leishmania* en el año 2015 (284) e implementada en nuestro laboratorio (Anexo 2). Para ello se utilizó un solo ARNg dirigido a la secuencia codificante del gen *lmcpx* y un cassette de resistencia Puro^R en el que el gen *puro* se encuentra flanqueado por fragmentos de las regiones no codificantes (UTR) del gen *lmcpx* (Figura 3.10).

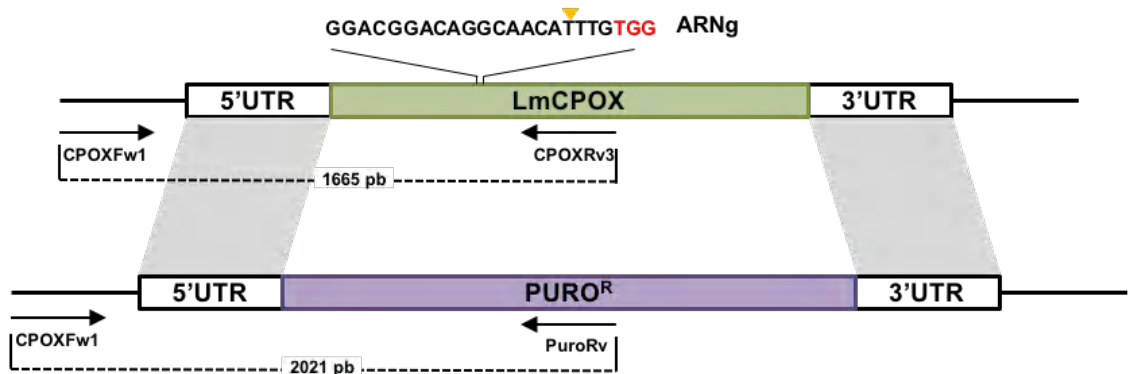


Figura 3.10. Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 utilizada para la generación de los parásitos LmCPOX^{-/-}. Se utilizó un solo ARNg dirigido a la secuencia codificante del gen *cpx* para generar la ruptura de la doble cadena de ADN (punta de flecha amarilla), la cual es reparada mediante recombinación homóloga utilizando como molde el plásmido pLS7-CPOX conteniendo el cassette de resistencia a puromicina flanqueado por regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *cpx*. Se indican en la figura los oligonucleótidos utilizados para la confirmación por PCR y los fragmentos esperados en cada caso.

En primer lugar, se generó el plásmido pLS7-CPOX (Figura 3.11) conteniendo la secuencia de ARNg específica para el gen *lmcpx* flanqueada por las secuencias promotora y terminadora de U6snRNA que promueve su transcripción, y un cassette resistencia a puromicina flanqueado por dos brazos de homología de 964 pb y 821 pb, correspondientes a regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *lmcpx*, respectivamente (Figura 3.11).

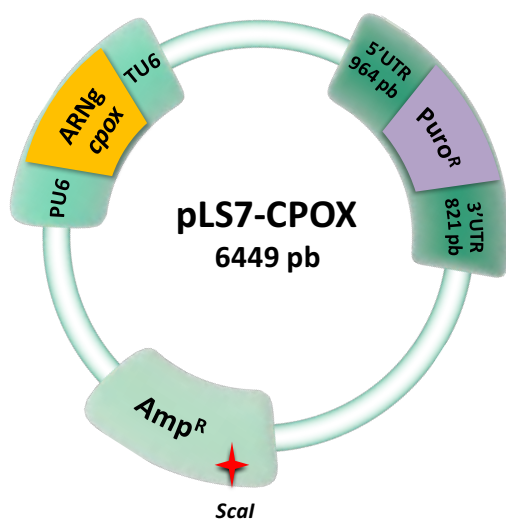


Figura 3.11. Plásmido pLS7-CPOX. El plásmido contiene el cassette de resistencia a puromicina (Puro^R) flanqueado por brazos de homología específicas de las regiones 5'UTR y 3'UTR gen *lmcpx*, el cassette de expresión para el ARNg (amarillo) bajo el control del promotor U6snRNA y un sitio de restricción *ScaI* (rojo) localizado en el gen de resistencia a ampicilina (Amp^R) para la linealización del plásmido.

Los promastigotes de *L. major* expresando la proteína Cas9 fueron transfectados con 10 µg plásmido pLS7-CPOX circular o linealizado mediante digestión con la enzima de restricción *ScaI*, y seleccionados con 30 µg/mL de puromicina durante 7 días. La población heterogénea resultante de la transfección fue clonada mediante dilución y siembra en placas de 96 pocillos conteniendo medio de cultivo suplementado con fármaco de selección. Una vez obtenidos los clones, se extrajo ADN genómico para evaluar la delección del gen *lmcpx* y la integración del cassette de resistencia a puromicina mediante PCR. Se utilizó un oligonucleótido sentido común CPOXfw1 que hibrida corriente arriba de la región 5'UTR incluida en el brazo de homología y los oligonucleótido antisentido CPOXRv3 y PuroRv que hibridan específicamente en la secuencia del gen *cpox* y cassette de resistencia a puromicina, respectivamente (Figura 3.10).

En total se evaluaron por PCR 90 clones de parásitos resistentes a puromicina, de los cuales 48 y 42 clones fueron obtenidos de la transfección con el plásmido circular y linealizado, respectivamente. En todos los clones se obtuvo amplificación tanto del fragmento de 1665 pb específico para gen utilizando el par de oligonucleótidos CPOXfw1-Rv3, como del fragmento de 2021 pb específico para el cassette de

puromicina utilizando el par de oligonucleótidos CPOXfw1-PuroRv, indicando la delección de sólo uno de los alelos del gen (Figura 3.10 y 3.12).

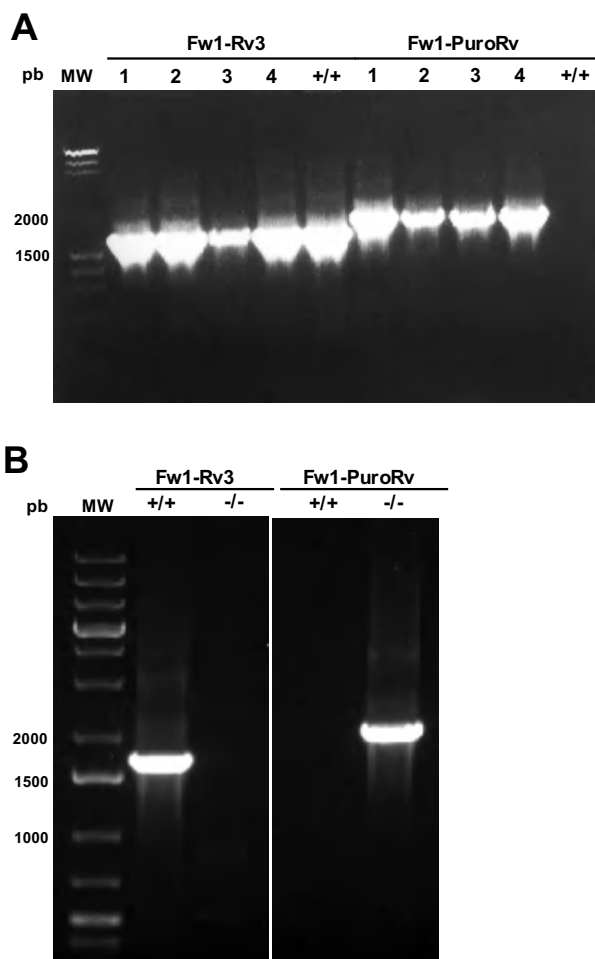


Figura 3.12. Generación de promastigotes de *L. major* mutantes nulos para el gen *cpx*. Análisis de genotipo mediante PCR del locus *lmcpx* usando los oligonucleótidos Fw1-Rv3 y Fw1-PuroRv específicos de gen y cassette de resistencia a puromicina, respectivamente. A) La amplificación de ambos fragmentos indica el reemplazamiento de un solo alelo por el cassette de resistencia; carriles 1-4, clones obtenidos tras la selección con puromicina y carril +/+ (control Cas9). B) Amplificación de fragmento de 1656 pb específico de gen en los parásitos control (+/+) y fragmento de 2021 pb específico de cassette puromicina en la línea LmCPOX^{-/-} (-/-) indicando la delección de ambos alelos del gen *cpx*.

Sin embargo, como se observa en la figura 3.12A, uno de los clones (carril 3) presentó una menor amplificación del producto de la PCR específico para el gen *cpx* utilizando los oligonucleótidos CPOXfw1-Rv3, sugiriendo que podría tratarse de una población heterogénea. Por lo tanto, se decidió subclonar esta población de parásitos en medio RPMI modificado sólido suplementado con 30 µg/mL de puromicina para la obtención de clones resistentes al medicamento. Se aislaron 19 clones, de los cuales 3 presentaron amplificación del producto de PCR con los oligonucleótidos específicos del cassette de resistencia a puromicina y no con los oligonucleótidos específicos del gen *cpx*, indicando que en estos clones ambos alelos del gen *cpx* habían sido delecionados (Figura 3.12B). Se seleccionó de manera aleatoria uno de los clones mutante nulo para *cpx*, el cual fue denominado LmCPOX^{-/-} y posteriormente empleado como línea base para la realización de los experimentos posteriores.

La inserción del cassette de puromicina en el locus del gen *cpox* fue confirmada mediante Southern blot. Para ello, se extrajo ADN genómico de los parásitos control (Cas9) y LmCPOX^{-/-} y se digirió con las enzimas de restricción *SmiI* y *XmnI*, las cuales cortan dentro de la secuencia del gen *cpox* pero no dentro del cassette de resistencia a puromicina (Figura 3.13A). Los fragmentos de ADN digeridos con ambas enzimas se hibridaron con sondas específicas para la región 5'UTR y la secuencia codificante del gen *cpox*. Como se observa en la figura 3.13B, la sonda específica para gen no reconoció ninguna banda en el ADN genómico de la línea mutante nula para LmCPOX (-/-), mientras que la sonda específica para la región 5'UTR reconoció una banda de 4.7 kb en el ADN genómico de estos mismos parásitos como resultado de la pérdida del sitio de restricción de la enzima por integración del cassette de resistencia a puromicina en ambos alelos del gen *cpox*.

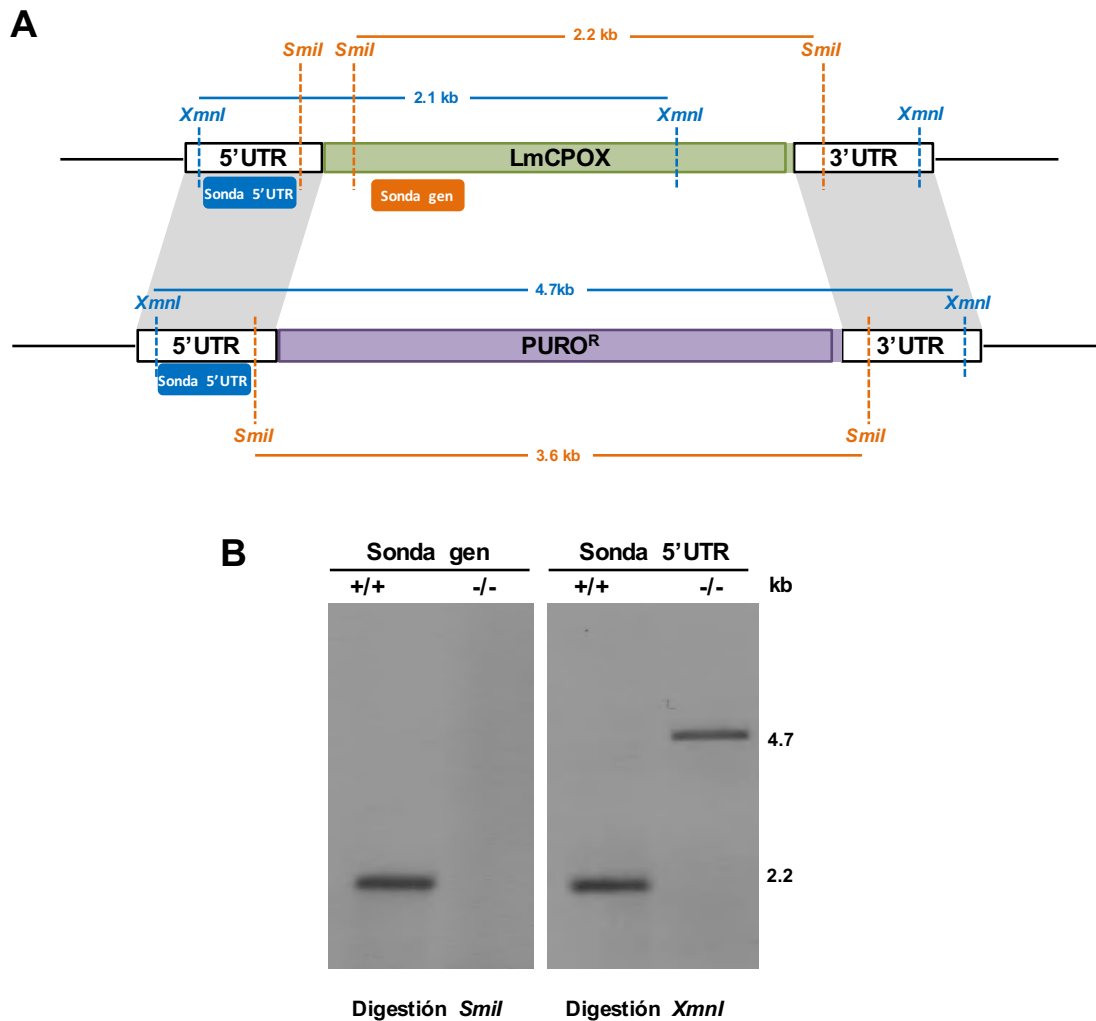


Figura 3.13. Confirmación de la delección de ambos alelos del gen *cpox* en los parásitos LmCPOX^{-/-} mediante Southern blot. A) Representación esquemática de los sitios de restricción para las enzimas *SmiI*

y *XmnI* en el locus *cpx* de los parásitos control (arriba) y mutantes LmCPOX^{-/-} (abajo), los sitios de hibridación de las sondas específicas para la región 5'UTR y la región codificante del gen *cpx* y los tamaños de las bandas esperados en cada caso. B) La detección de una banda de 2.2 kb con la sonda específica de gen solo en los parásitos control (+/+), y el reconocimiento de una banda de 4.7 kb con la sonda de la región 5'UTR en los parásitos doble KO (-/-), confirma la correcta sustitución de ambos alelos del gen *cpx* por cassette de resistencia a puromicina

Finalmente, se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) que mientras el gen *cpx* se expresa en los promastigotes de la línea control (Cas9), en los parásitos LmCPOX^{-/-} no se detectó ARNm para dicho gen (Figura 3.14).

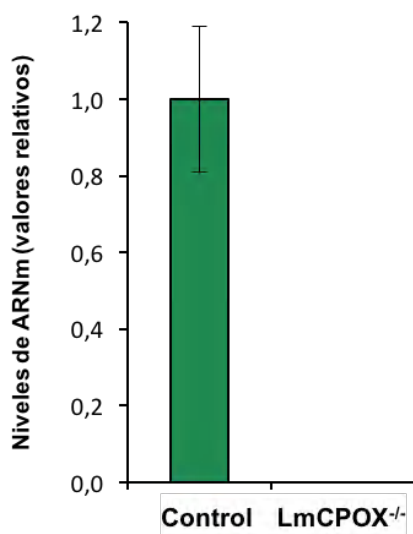


Figura 3.14. La línea LmCPOX^{-/-} no presenta niveles detectables de ARNm para la proteína LmCPOX. Análisis de la expresión del gen *cpx* en promastigotes de *L. major* control (Cas9) y doble KO (LmCPOX^{-/-}) mediante RT-qPCR utilizando ARNm total aislado de cada una de las líneas.

5. Actividad de la enzima LmCPOX en promastigotes de *L. major*

Para evaluar los efectos de la delección del gen *cpx* en el crecimiento y desarrollo de *L. major*, los parásitos LmCPOX^{-/-} obtenidos fueron complementados con una copia episomal del gen para rescatar el fenotipo silvestre, permitiendo confirmar que las alteraciones observadas en los parásitos mutantes son resultado de la ausencia de la proteína. Para ello, los parásitos LmCPOX^{-/-} fueron transfectados con el plásmido de expresión pXGNEO-CPOX tal como se describe en el apartado 3.7.5.1. de materiales y métodos. Para evitar el reconocimiento del ORF de la copia episomal del gen por la nucleasa Cas9, previamente se mutó la secuencia PAM (TGG) adyacente a la secuencia del ARNg utilizada en la generación de la línea LmCPOX^{-/-}, mediante mutagénesis dirigida del triplete de nucleótidos GTG por GTT que dió lugar a una mutación silenciosa. La línea resultante se denominó LmCPOX^{-/-} + CPOX.

Para verificar el fenotipo de las líneas generadas $LmCPOX^{-/-}$ y $LmCPOX^{-/-}$ + CPOX, se midió la actividad de la enzima CPOX en lisados de parásitos de ambas líneas, gracias a la colaboración con el grupo de investigación de los Drs. Dieter Jahn y Martina Jahn (Universidad de Brunswick, Alemania). Se realizó un análisis preliminar por HPLC usando una columna de fase reversa para la separación e identificación de CPIII y PPIX, registrando los espectros de fluorescencia a 409 nm. En presencia del sustrato CPIII, solo se detectó el intermediario metabólico PPIX en los parásitos $LmCPOX^{-/-}$ + CPOX, indicando que los parásitos $LmCPOX^{-/-}$ carecen de actividad CPOX, la cual es rescatada por la copia episomal del gen (Figura 3.15).

Estos resultados confirman la ausencia de actividad CPOX en la línea de *L. major* mutante nula $LmCPOX^{-/-}$ generada y la correcta complementación con el gen *lmcpx* episomal. Estas líneas fueron empleadas para determinar la importancia de esta proteína en los parásitos de *L. major*.

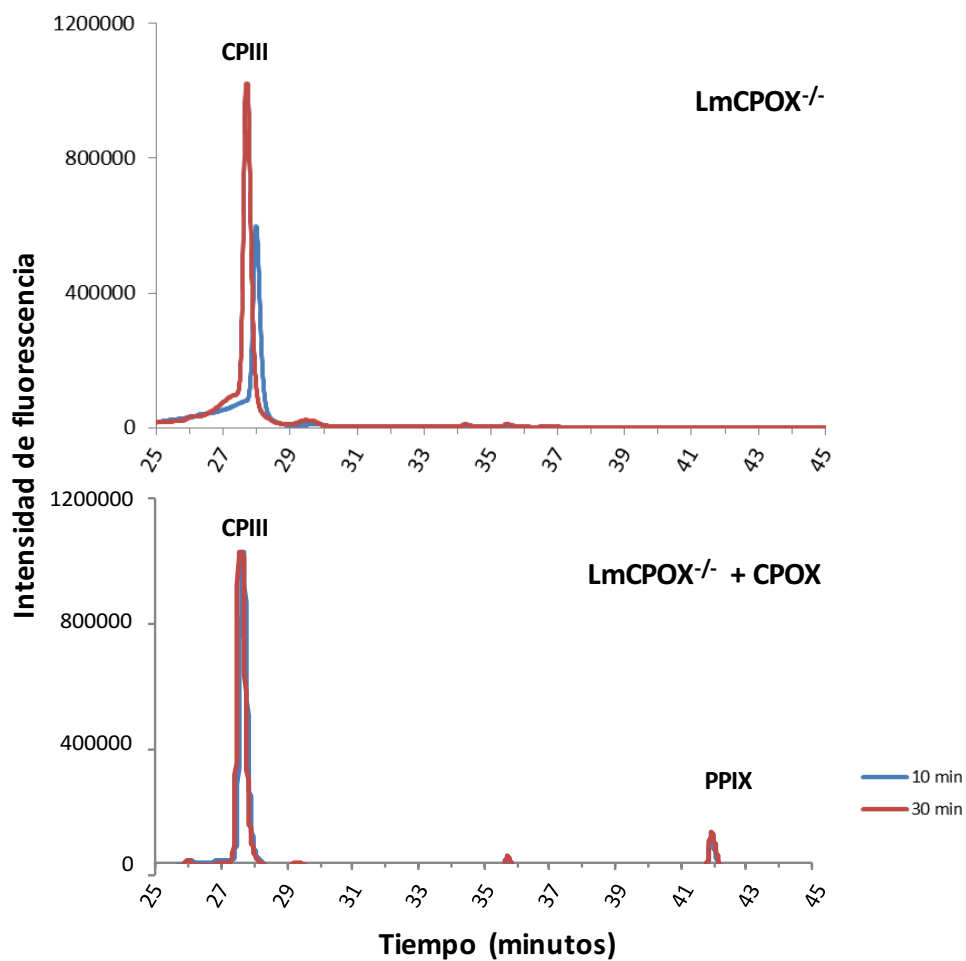


Figura 3.15. Espectro de HPLC de intermediarios del grupo hemo. En los parásitos $LmCPOX^{-/-}$ (arriba) no se observa la conversión del sustrato CPIII en el intermediario PPIX, a diferencia de los parásitos

complementados LmCPOX^{-/-} + CPOX (abajo) conteniendo una copia episomal del gen. Se muestran los perfiles obtenidos a los 10 min (azul) y 30 min (rojo) de reacción.

6. Efecto de los niveles de la enzima LmCPOX en el desarrollo de las formas promastigote y amastigote de *L. major*

La obtención de parásitos mutantes nulos para la proteína CPOX, indica que dicha proteína no es esencial para la supervivencia del estadio promastigote del parásito en cultivos *in vitro*, en donde crecen de manera extracelular en medio de cultivo suplementado con SFB que les proporciona una fuente de hemo exógeno. A pesar de ello, sólo el 3% de los clones evaluados presentaron la delección de ambos alelos del gen *lmcpx*, obtenidos mediante la estrategia CRISPR-Cas9 basada en plásmidos (Anexo 2).

Para determinar si la proteína CPOX era importante en el crecimiento de los promastigotes de *L. major*, se realizó una curva de crecimiento de las líneas control (Cas9), LmCPOX^{-/-} y LmCPOX^{-/-} + CPOX, observando que en todos los casos se obtuvo un perfil de crecimiento similar, en donde los promastigotes crecen de manera exponencial hasta el día 3 tras el cual comienzan una fase estacionaria (Figura 3.16).

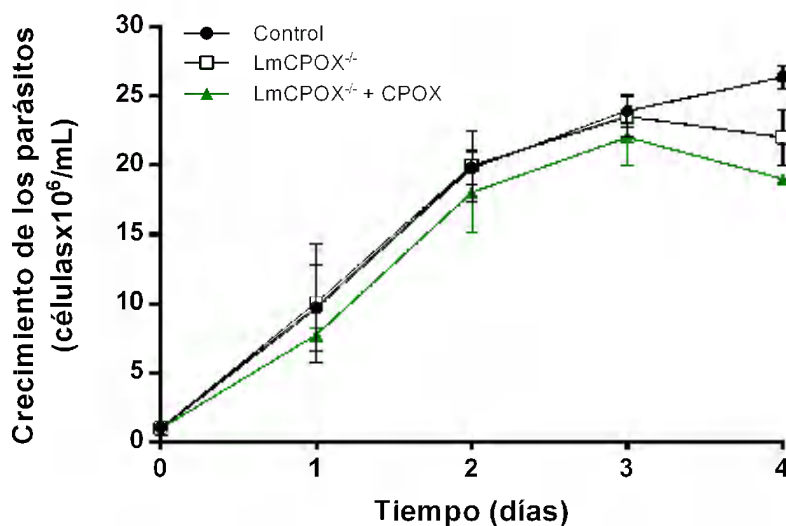


Figura 3.16. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de la proteína CPOX. Los promastigotes control (Cas9), doble KO (LmCPOX^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmCPOX^{-/-} + CPOX) fueron ajustados a una concentración inicial de 10⁶ parásitos/mL en medio de cultivo suplementado con 10% SFB, y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 4 días. Los experimentos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes

Para estudiar la importancia del gen *cpoX* en el desarrollo del estadio intracelular amastigote, se realizaron infecciones *in vitro* en células THP1 con las líneas de *L. major* control (Cas9), LmCPOX^{-/-} y LmCPOX^{-/-} + CPOX. Teniendo en cuenta que los parásitos pueden almacenar hemo que les permite replicarse dentro de los macrófagos independientemente de la presencia o ausencia de precursores de porfirinas (Figura 2.4), los parásitos fueron depletados de hemo durante 72 horas antes de la infección, con el fin de determinar el efecto de la ausencia de la enzima CPOX y por ende, la síntesis de PPGIX en los amastigotes intracelulares.

Mediante microscopia de fluorescencia de las células infectadas teñidas con DAPI, se determinó el número de amastigotes intracelulares por 100 macrófagos a las 24 y 120 horas tras la infección. No se observaron diferencias entre las 3 líneas de parásitos evaluadas tras 24 horas de infección, indicando que los niveles de expresión de la proteína CPOX no afecta la capacidad infectiva de los parásitos de *L. major*.

A diferencia de los parásitos control en los que se observa un aumento significativo en el número de amastigotes (69%, p=0.02) entre las 24 y 120 horas tras la infección, no se observó ninguna diferencia significativa en los parásitos LmCPOX^{-/-} entre ambos tiempos post-infección (Figura 3.17).

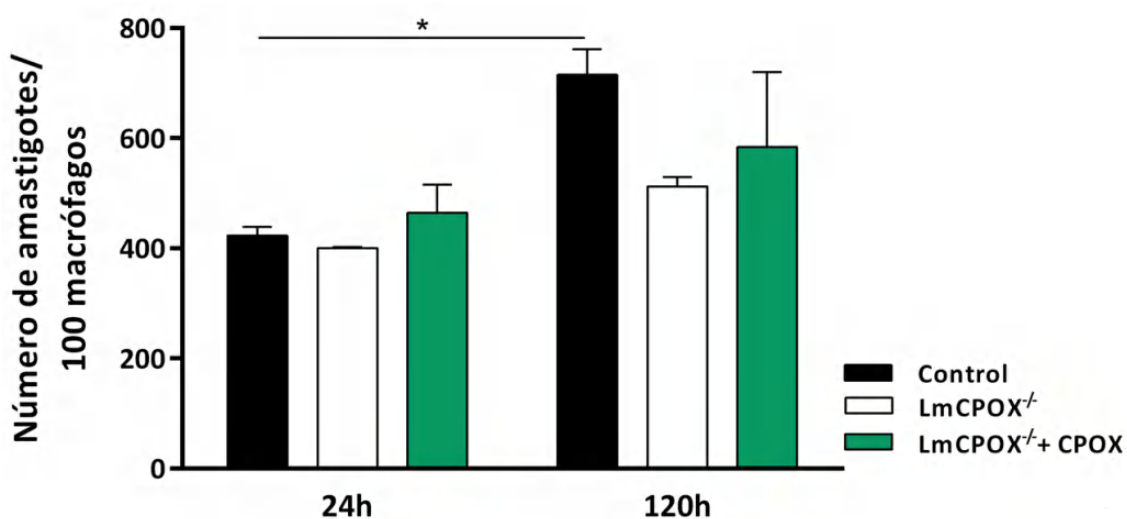


Figura 3.17. La ausencia de la proteína LmCPOX altera la replicación intracelular de los amastigotes de *L. major* en ensayos de infección *in vitro*. Los macrófagos THP1 fueron infectados durante 24 horas con promastigotes en fase estacionaria de las líneas control (Cas9), doble KO (LmCPOX^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmCPOX^{-/-} + CPOX), previamente depletados de hemo. Tras lavar los parásitos no internalizados, las células infectadas fueron fijadas y teñidas con DAPI para su visualización mediante microscopia de fluorescencia. Se representa el número de amastigotes intracelulares por cada 100 macrófagos, contados mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ. Los

experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. (*, $p < 0.05$).

Por el contrario, se observó una disminución del 28.3% en número de parásitos por macrófago en los parásitos LmCPOX^{-/-} tras 120 horas de infección en comparación con los parásitos del grupo control, hallándose un valor cercano a la significancia estadística ($p = 0.055$). Esta disminución es revertida cuando los parásitos son complementados con una copia episomal del gen (LmCPOX^{-/-} + CPOX) (Figura 3.17). Lo anterior sugiere que la proteína CPOX es funcional en los amastigotes de *L. major* y que en su ausencia los parásitos se replican de manera menos eficiente debido probablemente a la inhibición de la síntesis de su propio hemo.

7. La LmCPOX no afecta al proceso de metaciclogénesis *in vitro*

Para estudiar si la eliminación del gen *cpoX* afectaba el desarrollo *in vitro* de las formas infectivas del estadio promastigote, se purificaron promastigotes metacíclicos utilizando el método de selección negativa mediante aglutinina de cacahuete (PNA) descrito en el apartado 3.1.4 de materiales y métodos. Como se observa en la figura 3.18 no se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de promastigotes metacíclicos entre los parásitos control, LmCPOX^{-/-} y LmCPOX^{-/-} + CPOX, sugiriendo que la proteína CPOX no participa en el proceso de diferenciación hacia las formas infectivas en los promastigotes de *L. major*.

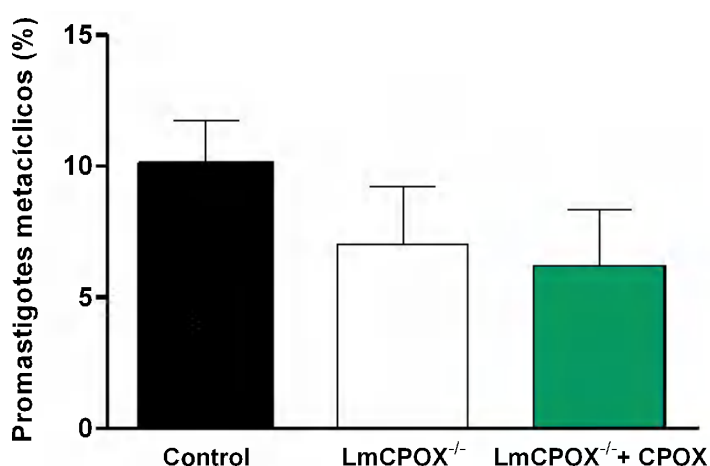


Figura 3.18. Porcentaje de promastigotes PNA negativos obtenidos de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (7 días) de las líneas control (Cas9), doble KO (LmCPOX^{-/-}) y complementados con una copia episomal del gen (LmCPOX^{-/-} + CPOX). Los experimentos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

8. Virulencia de los parásitos $LmCPOX^{-/-}$ en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.

Finalmente, se decidió evaluar si la ausencia de la proteína CPOX podría tener algún efecto en la capacidad de infección y virulencia de los parásitos de *L. major* en un modelo experimental de leishmaniasis cutánea. Para ello, se infectaron ratones Balb/c subcutáneamente en la almohadilla plantar con 10^4 promastigotes metacíclicos de las líneas control (Cas9), $LmCPOX^{-/-}$ y $LmCPOX^{-/-}$ + CPOX, y la inflamación de ambas patas (infectada y no infectada) fue medida semanalmente usando un calibre digital como indicador de la progresión de la enfermedad. Después de 8 semanas de infección los animales fueron sacrificados y se determinó la carga parasitaria de las patas infectadas y el nódulo linfático drenante (poplíteo) mediante el método de dilución limitante. La progresión de la enfermedad fue similar en los 3 grupos de ratones infectados evaluados, caracterizada por una reacción inflamatoria progresiva y lesiones no cicatrizantes en la almohadilla plantar de las patas infectadas (Figura 3.19A).

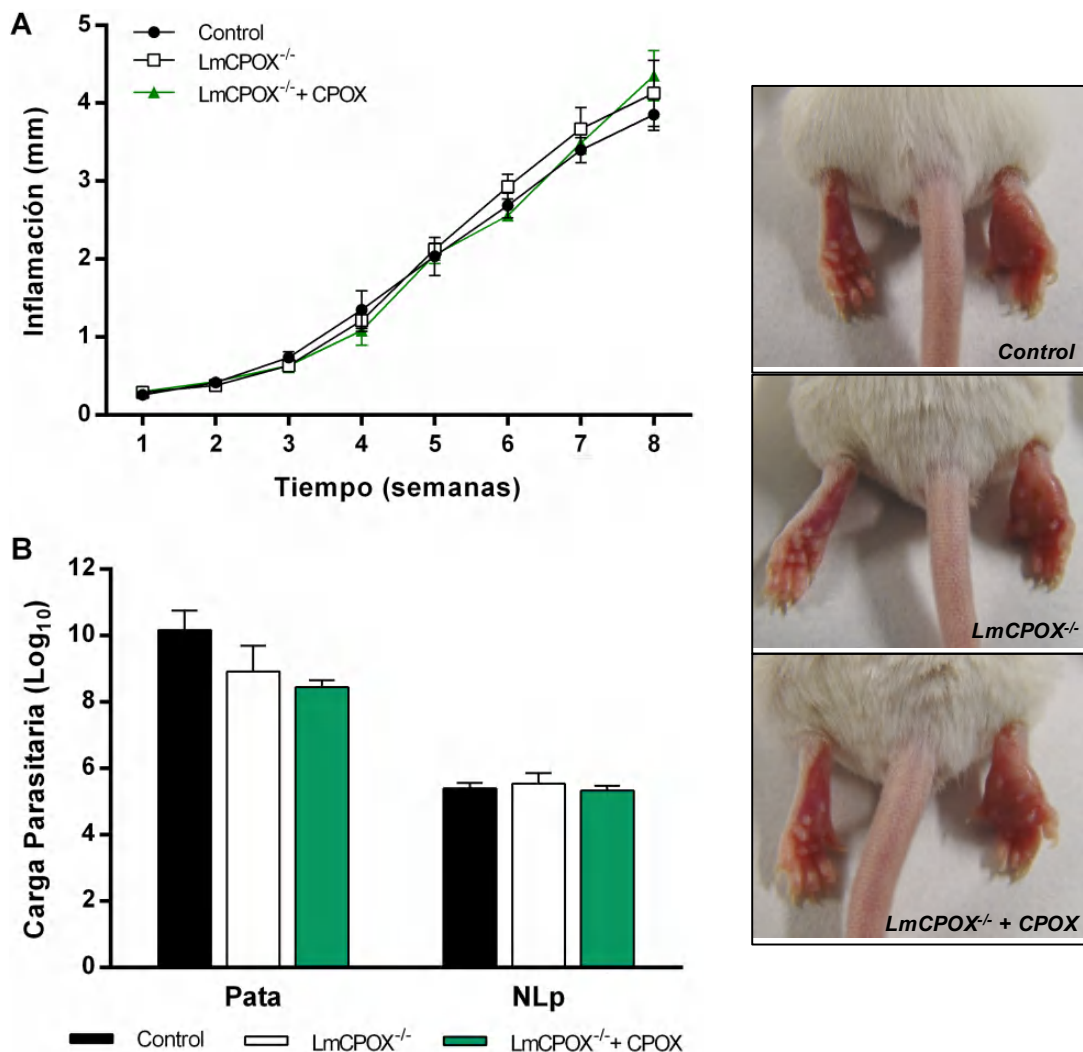


Figura 3.19. Infectividad de los promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de LmCPOX. Los ratones Balb/c fueron infectados en la almohadilla plantar con promastigotes metacíclicos (10^4) de las líneas control (Cas9), doble KO (LmCPOX^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmCPOX^{-/-} + CPOX). A) Progresión de la inflamación determinada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada). B) Cargas parasitarias de las patas infectadas y nódulos linfáticos poplíteos (NLp) tras 8 semanas de infección, determinadas mediante el método de dilución limitante. Los valores representan las medias \pm SEM de 7 ratones. Se muestran imágenes representativas de la inflamación en la almohadilla plantar de los ratones tras 6 semanas de infección (izquierda).

Tampoco se observaron diferencias significativas en las cargas parasitarias de las patas infectadas o los nódulos linfáticos drenantes (Figura 3.19B), sugiriendo que la proteína CPOX de *L. major* no es requerida para el establecimiento de la enfermedad en un modelo murino.

CAPITULO III: Caracterización de la enzima protoporfirinógeno oxidasa de *L. major*

La enzima PPOX es la encargada de catalizar la penúltima reacción de la ruta de síntesis de hemo, que consiste en la oxidación de la PPGIX para dar lugar a la PPIX (Figura 1.11). En el transcurso de este trabajo, el laboratorio de Dieter y Martina Jahn de Universidad de Brunswick (Alemania) proporcionaron por primera vez evidencia directa acerca de la funcionalidad de una de las proteínas de la ruta de síntesis de hemo en *Leishmania* spp, la enzima PPOX de *L. major*. Dicha enzima es una PPOX tipo HemG que utiliza mononucleótido de flavina (FMN) como cofactor y ubiquinona como aceptor final de electrones, siendo la primera enzima eucariótica con características procarióticas descrita hasta la fecha. Por lo tanto, se ha sugerido que la enzima PPOX es una diana terapéutica atractiva que podría ser explotada en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis (265).

En el presente capítulo analizamos la importancia de la enzima PPOX de *L. major* en el desarrollo de los estadios promastigote y amastigotes de *L. major*, y su posible esencialidad para la viabilidad celular y establecimiento de la enfermedad.

1. *L. major* presenta una enzima PPOX tipo HemG

El genoma de *L. major* contiene un gen de 696 nucleótidos que codifica para la proteína protoporfirinógeno oxidasa de 231 aminoácidos con un peso molecular teórico de 25.4 kDa. El gen *ppox* es un gen de copia única que se localiza en el cromosoma 6 (LmjF.06.1280) corriente abajo del gen que codifica para LmCPOX, presentando igualmente una elevada sintenia con respecto a los genes ortólogos de otras especies de *Leishmania*.

Las PPOX tipo HemG se encuentran principalmente distribuidas en γ -proteobacterias y son frecuentemente encontradas en otros genomas bacterianos como resultado de la transferencia horizontal de genes (295). El análisis filogenético de secuencias de proteínas PPOX de diversos organismos señala que los genes de *Leishmania* spp. se agrupan con sus homólogos de γ -proteobacterias, mientras que se encuentran distantemente relacionados con otras proteínas de origen eucariótico (Figura 4.1).

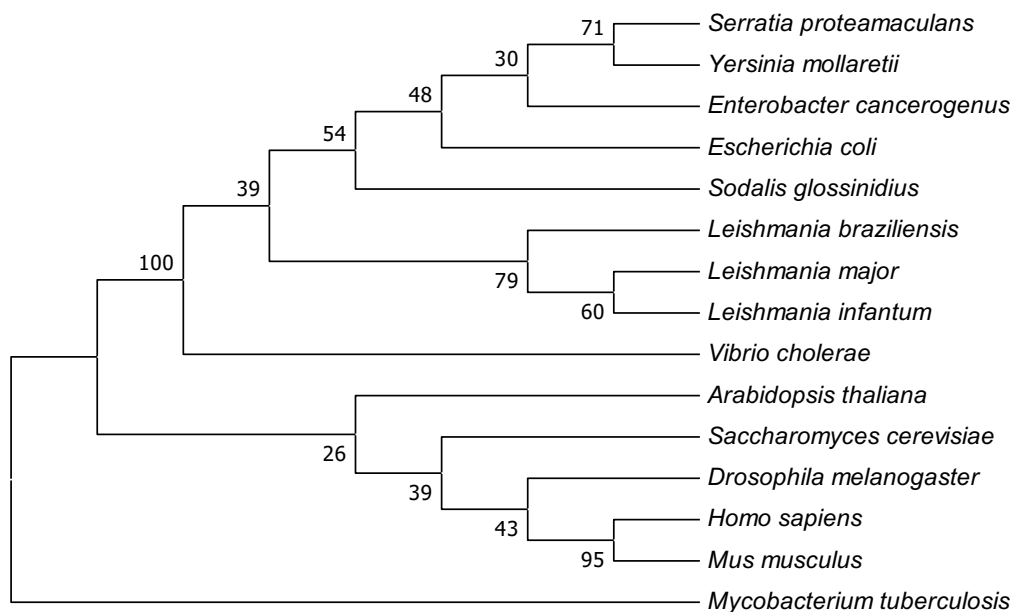


Figura 4.1. Análisis filogenético de proteínas PPOX de diversos organismos. El árbol filogenético fue generado por máxima verosimilitud con un *bootstrapping* de 1000 iteraciones utilizando el software MEGA 6.0. Los números en cada uno de los clados indican el porcentaje de veces que ese clado se repitió tras el análisis de *bootstrap*, tomando como significativos aquellos superiores al 50% de las veces. Números de acceso a UniProt: *Arabidopsis thaliana* (PPOX2) Q8S9JI, *Drosophila melanogaster* Q9VC52, *Enterobacter cancerogenus* A0A0A3YUQ2, *Escherichia coli* (EcHemG) P0ACB4, *Homo sapiens* P50336, *L. braziliensis* A4H4U0, *L. infantum* A4HT19, *L. major* Q4QIU7, *Mus musculus* P51175, *Mycobacterium tuberculosis* P9WMP1, *Saccharomyces cerevisiae* (ScHem14) P40012, *Serratia proteamaculans* A8G8D6, *Sodalis glossinidius* Q2NWS9, *Vibrio cholerae* A0A0H6D4D1, *Yersinia mollaretii* (YmHemG) A0A0U1I7J6.

El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de las proteínas PPOX de diversas especies de *Leishmania* y sus homólogos en otros organismos eucariotas y procariotas, permitió observar existe una alta identidad de secuencia entre la LmPPOX y las proteínas PPOX de especies de *Leishmania* del mismo subgénero (>85%) mientras que es un poco menor en comparación con las especies del subgénero *Viannia* (<79%) (Figura 4.2). En comparación con las proteínas de levadura y humano, la LmPPOX presenta un bajo grado de identidad ($\leq 10\%$) y similitud ($\leq 22\%$) de secuencia, similar al observado para la bacteria *B. subtilis* que contiene una enzima PPOX tipo HemY. La proteína PPOX tipo HemG de *E. coli* es la que presenta los mayores valores de identidad (>35%) y similitud (>50%) con la proteína LmPPOX y sus homólogos en otras especies de *Leishmania* (Figura 4.2).

	EcPPOX	LbrPPOX	LpaPPOX	LmxPPOX	LmjPPOX	LinPPOX	LdPPOX	ScPPOX	BsPPOX	HsPPOX
EcPPOX		44.75	44.20	47.51	46.96	46.96	47.51	13.94	12.96	12.50
LbrPPOX	44.75		98.27	80.09	77.92	77.06	77.49	19.16	17.24	14.56
LpaPPOX	44.20	98.27		80.52	78.35	77.49	77.92	19.16	17.73	14.56
LmxPPOX	47.51	80.09	80.52		88.74	87.01	87.45	16.82	18.72	13.11
LmjPPOX	46.96	77.92	78.35	88.74		90.91	91.34	16.36	18.23	12.62
LinPPOX	46.96	77.06	77.49	87.01	90.91		99.57	17.29	16.75	14.56
LdPPOX	47.51	77.49	77.92	87.45	91.34	99.57		17.29	16.75	14.56
ScPPOX	13.94	19.16	19.16	16.82	16.36	17.29	17.29		21.49	24.20
BsPPOX	12.96	17.24	17.73	18.72	18.23	16.75	16.75	21.49		27.05
HsPPOX	12.50	14.56	14.56	13.11	12.62	14.56	14.56	24.20	27.05	

Figura 4.2. Matriz de identidad y similitud entre diferentes proteínas PPOX. Los alineamientos de las secuencias fueron realizados utilizando el software Clustal Omega. Los porcentajes de identidad se muestran en azul y los porcentajes de similitud en blanco. Números de acceso a UniProt: *Escherichia coli* (EcHemG) P0ACB4, *Bacillus subtilis* (BsPPOX) P32397, *Saccharomyces cerevisiae* (ScPPOX) P40012, *Homo sapiens* (HsPPOX) P50336, *L. braziliensis* (LbrPPOX) A4H4U0, *L. panamensis* (LpaPPOX) A0A088S2L4, *L. mexicana* (LmxPPOX) E9AL08, *L. major* (LmPPOX) Q4QIU7, *L. infantum* (LinPPOX) A4HT19, *L. donovani* (LdPPOX) A0A3S5H5V3.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos utilizando el software Clustal Omega permitió observar que existe un bajo grado de similitud global (inferior al 5%) entre las secuencias de las proteínas PPOX de diversos organismos eucariotas y procariotas, y que la proteína LmPPOX presenta los aminoácidos catalíticamente importantes y altamente conservados en las proteínas tipo HemG de bacterias: Tyr134, Tyr137 y Arg142 (numerados de acuerdo a la secuencia de *L. major*), con las cuales presenta una similitud cercana al 48.5% (Figura 4.3).

LmPPOX	-----MASQSPKCLMLYSTTDGHTKTI----	22
EcPPOX	-----MKTLLIFSTRDGTREI----	17
YmPPOX	-----MNVLLIFSSRDGTQAI----	17
ScPPOX	MLLPLTKLKPRAKVAVVGGVSGLCFTYFLSKLR ----PDVEITLFESQNRGTGGWIYSCN	56
BsPPOX	-----MSDGKKHVVIIGGGITGLAAAFYMEKEIKEKNLPLELTLVEASPRVGGKIQTVK	54
HsPPOX	----- MGRTVVVLGGGISGLA ASYHLSRAP----CPPKVVLVESSERLGGWIRSVR	47
DmPPOX	----- MTTAVLGGGLSGLSAGYLLRRF ----GKP-LTIYEASPRVGGWVRSEN	44
	: : : :	
LmPPOX	-----MDTIARQLADETKVRCDVVDIKDG-----NSYVLADY	54
EcPPOX	-----ASYLASELK-ELGIQADVAVNHRI-----EEPQWENY	48
YmPPOX	-----ASYIAKQLS-AMAT-CDIQDLSQV-----GQIDLSQY	47
ScPPOX	TRDMSGNPIMLEKGPRTLGRVSDGTVLIMDTLKDGLKEAVIQSIDKGCIAADKFFLLDPSD	116
BsPPOX	--K---DGYIIERGPDSFLERKK---SAPQLVKDLGLEHLLVN-----NATGQSYVLVNR	101
HsPPOX	G-P---NGAIFELGPRGIRPAGALGARTLLLSELGLDSEVLPVRGDHPAAQNRFLYVGG	103
DmPPOX	RKD---RNFIFESGPRITIRVPEGPANTLELVEDLKL--EVTPIRRSHVAARNRMLYAKG	99
	:	

LmPPOX	EKVLLGASI--RYGHFSAAFI--NYVKQHSELSAMPSA---FFSVNLTARKLDKNTATTN	108
EcPPOX	DRVVIGASI--RYGHYHSAFQ--EFVKKHATRLNSMPSA---FYSVNLVARKPEKRTPTQTN	102
YmPPOX	QQVMIGASV--RYGHFSPVLS--QFVSKHVEQLNQMPSA---FFAVNLTARKEKRSPTQTN	101
ScPPOX	KLIVQVNSISTTVKFLNPLGKGLITGMMGE-----WFRK--KSPHPGQDESVES	164
BsPPOX	TLHPMPKGA---VMG-IPTKIAPFVSTGLFSLSGKARAAMDFILP---ASKTKDDQSLGE	154
HsPPOX	ALHALPTGLRGLLRP-SPPFSKPLFWAGLRE-----LTKP----RGKEPDET VHS	148
DmPPOX	QLCMLPNSPKGLFGV-LPPFTKPLYKAVLRD-----LFTA--SKKAKLEDESIYS	146
	: .	.
LmPPOX	VYTRKF----LNQSSWSPQLVGVFAGALWYPRYRNFDRVLI-----QFIMKVTGGE	155
EcPPOX	SYARKF----LMNSQWRPDRCAVIAGALRYPRYRWDRFMI-----KLIMKMSGGE	149
YmPPOX	AYVRKF----LLSTPWQPTLCAVAGALRYPRYRWDVMI-----QLIMRMTGGE	148
ScPPOX	ICDRRFGNNYISNNMISALLRGIYGDVLSLAKRTFKKIYYNELKHSNTQAMIDNMRG	224
BsPPOX	FFRRRVGDEVV--ENLIEPLLSGIYAGDIDKLSLMSTFPQFYQTEQKHRSLILGMKKTRPQ	213
HsPPOX	FAQRRLGPEVA--SLAMDSLRCRVFAGNSRELSIRSCFPPSLFQAEQTHRSILGLLLGAGR	207
DmPPOX	FAERRFGKEIA--DYAISPICGICAGDAREISVRFLMEGLFEKEQKYGGVLKGTLSRFE	205
	*: . . : . . :	:
LmPPOX	TDSTKEIVYTDWAAVRR-----FASDFAALPL-----AVPPRPKANTVE	194
EcPPOX	TDTRKEVVYTDWEQVAN-----FAREIAHLTD-----KPTLK-----	181
YmPPOX	TDTSKEIEYTDWQQVSS-----FTQDFSALQY-----EK-----	177
ScPPOX	KSRSKTENLH--QSLTGCLNDYSNAFGKDRSKLLDLNLTLLKYPMLGLAGGLETFPKIVR	283
BsPPOX	GSG-----QQL-----TAKKQG-----QFQTLSTGLQTLVEEIE	242
HsPPOX	-----TPQPDS--ALIRQALAEERWSQWSLRGGLEMLPQALE	241
DmPPOX	KNKTK---DTK-DGL-----FAERQP-KLYAQAVKEKWAMYGLKGGLENLPKTMR	250
LmPPOX	KPDGI-----LRSGGAHCLLAIVGMSSAAVIVGIRIIAAK-----	229
EcPPOX	-----	181
YmPPOX	-----	177
ScPPOX	NALNEF-----KNVKIVTGNPVTQIMKR PANETTIGLKAKSGDQYETFDHLRLTITPPK	337
BsPPOX	KQLKLTKVYKGTQVTKLSHSGSCYSLELDN-----GV-----TLDADSVIVTAPHKA	289
HsPPOX	THL-----TSRGSVLRGQPVCGLSLQA----EGRWKVSLRDSLEADHVISAIPASV	290
DmPPOX	KYL-----GERDVNVQLSNECRNLTFSS----SGVRMNIKDAEVPVEHVSSLPAYK	298
LmPPOX	-----RG-----	231
EcPPOX	-----	181
YmPPOX	-----	177
ScPPOX	IAKLLPKDQNSLSKLLDEIQSNTIILVNYL PNKDVIDADLQGFYLVPKSNKNPGKLLG	397
BsPPOX	AAGMLSE--LPAISHLKNMHSTSVANVALGFP EGS--VQMEHEGTGFVISRNSDFA--ITA	344
HsPPOX	LSELLPAEAAPLARALSATAVSVAVVNLQYQGAH---LPVQGFHGLVPSSEDPG--VLG	345
DmPPOX	LAPLVKQQHPSPLSAQLLSI PYVDVLVVMNQFP GKL---LKQDGFLLVPPVEKLP--LLG	353
LmPPOX	-----	231
EcPPOX	-----	181
YmPPOX	-----	177
ScPPOX	VIFDSVIERNFKPLFDKLS TNPNALNKYTKVTAMIGGCMLE--HGVPVVP SREVTINAVK	456
BsPPOX	CTWTNKKWP-----HAA--PE--GKTL LRAYVGKAG----DESIVDLSDNDIINIVL	388
HsPPOX	IVYDSVAFP-----EQDGSPP---GLRVT--VMLGGSWLQ TLEASGCVLSQELFQQRAQ	394
DmPPOX	VIFDSCCFD-----MGEN-----TVLT--VMMGGHWF DQWFGDRPSPKQ--ILDLAT	396
LmPPOX	-----	231
EcPPOX	-----	181
YmPPOX	-----	177
ScPPOX	DALNNHLGISNKDLEAGQWEFTIADRCLPRFHVGYDAWQERAERKLQESYGQTVSVGGMG	516
BsPPOX	EDLKKVMNINGE---PEMTCVTRWHESMPQYHVGHKQRIKELR--EALASAYPGVYMTGAS	444
HsPPOX	EAAATQLGLKEM---PSHCLVHLHKNCIPQYTLGHWQKLESAR--QFLTAHRLPLTLGAS	450
DmPPOX	SHVQKMLQIREE---PKFSRVHTLHKCIPQYTVGHKRRVEAIR--NYIKTYKLP LSVCGAA	452
LmPPOX	-----	231
EcPPOX	-----	181
YmPPOX	-----	177
ScPPOX	FSRSPGVDPDIVDGFNDALQLSK-----	539
BsPPOX	FE--GVGIPDCIDQKAAVSDALTYLFS--	470
HsPPOX	YE--GVAVNDCIESGRQAAVSVLGT EPN S	477
DmPPOX	YD--GVGINDVILSARRQVEAIPLS----	475

Figura 4.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas PPOX de organismos procariotas y eucariotas. El péptido señal de direccionamiento a mitocondria presente en la región N-terminal de las enzimas eucarióticas se indica en negrita. Los aminoácidos conservados en el centro activo de las enzimas PPOX tipo HemG se colorean en rojo (Tyr134), verde (Tyr137) y azul (Arg142). También se indican los aminoácidos idénticos (*), aminoácidos con propiedades muy similares (:) y aminoácidos con propiedades poco similares (.). El alineamiento fue realizado mediante el software Clustal Omega.

La LmPPOX es una proteína monomérica (Figura 4.4) que presenta similitud estructural con la proteína HemG de *E. coli*, cuyo sitio activo se encuentra entre los aminoácidos 124 y 149 (similar a la numeración de la PPOX de *L. major*). La delección del *loop* formado por dichos residuos, coloreado en cian en la estructura de la LmPPOX (Figura 4.4), causan la inactivación de la enzima (295). Este *loop* representa en sitio activo de la proteína, en donde se encuentran 3 aminoácidos altamente conservados en las proteínas PPOX tipo HemG, y que han sido previamente estudiados en la proteína de *L. major* (265). La mutación del residuo Arg142 en la LmPPOX no inactiva la proteína pero reduce en un 50% su actividad enzimática, sugiriendo un posible papel de este aminoácido en la unión al sustrato. Por el contrario, la mutación de los residuos Tyr134 y Tyr137 llevan a una inactivación completa de la enzima, evidenciado por una reducción significativa en la formación de hemo y la acumulación de las porfirinas precursoras, lo cual confirma la esencialidad de estos residuos en la actividad enzimática de la LmPPOX (265).

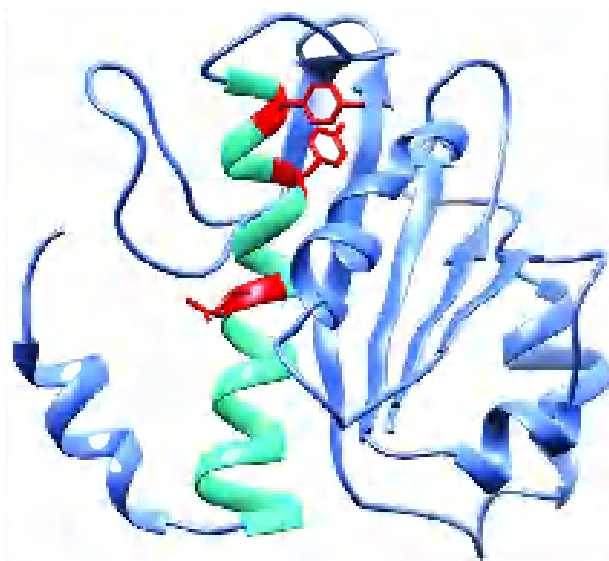


Figura 4.4. Modelo estructural de la proteína PPOX de *L. major*. El sitio activo se colorea en cian y la localización de los aminoácidos conservados catalíticamente importantes se indican el rojo. Figura tomada de (265).

2. La proteína LmPPOX de *L. major* es una enzima funcional

Con el fin de evaluar si el gen LmjF.06.1280 codifica una proteína con actividad propoporfirinógeno IX oxidasa, se realizó un ensayo de complementación funcional empleando bacterias de *E. coli* auxótrofas para hemo SASX38, las cuales carecen del gen que codifica para la PPOX (HemG) y por lo tanto deben ser crecidas en medio de cultivo suplementado con una fuente exógena de hemo. Para la expresión heteróloga de la proteína LmPPOX en la cepa SASX38, primero fue necesario la introducción del lisógeno λ DE3 en el cromosoma de las bacterias para permitir la expresión de los genes clonados en el vector pET21b. La correcta lisogenización de la cepa SASX38 se confirmó por Western blot para detectar la expresión de la proteína T7 ARN polimerasa (Figura 4.5A) y mediante la transformación y posterior inducción de una proteína control de ~30 kDa evaluada previamente en la cepa *E. coli* BL21(DE3) (Figura 4.5B).

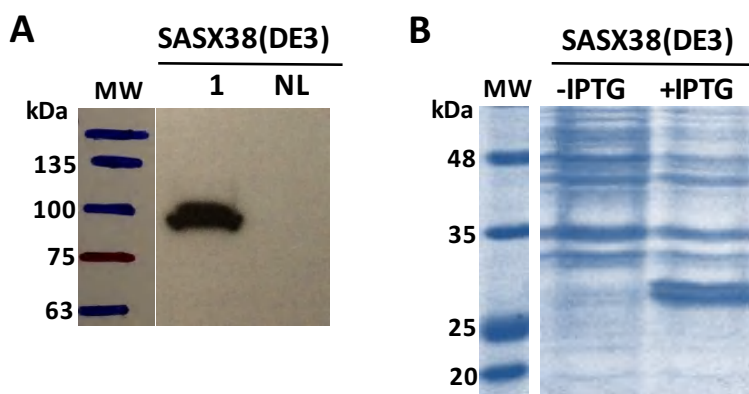


Figura 4.5. Confirmación de la lisogenización de las bacterias de *E. coli* auxótrofas para hemo SASX38. A) Las bacterias SASX38 lisogénicas en fase logarítmica fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con 20 μ g/mL de hemina y 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37 $^{\circ}$ C para inducir la expresión de T7 ARN polimerasa, la cual fue detectada mediante Western blot tal como se describe en el apartado 3.2.3 de materiales y métodos. NL: control de bacterias SASX38 no lisogénicas para el fago λ DE3. B) Las bacterias SASX38 (DE3) transformadas con un plásmido pET21b conteniendo un gen que codifica para una proteína de aproximadamente 30 kDa, fueron inducidas o no con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37 $^{\circ}$ C y la expresión de la proteína fue determinada mediante SDS-PAGE.

Las bacterias SASX38(DE3) fueron transformadas con el vector pET21b vacío como control y con el vector pET21b-PPOX conteniendo el gen *ppox* de *L. major*. Como se observa en la figura 4.6, las bacterias SASX38(DE3) transformadas con el plásmido vacío no crecen en el medio LB sin hemina debido a que su auxotrofia no es complementada y por lo tanto requieren una fuente exógena de hemo para su crecimiento.

Por el contrario, cuando son transformadas con el plásmido conteniendo el gen *ppox* de *L. major*, las bacterias son capaces de crecer en ausencia de hemo indicando que la expresión heteróloga de LmPPOX complementa la ausencia de la proteína HemG en la cepa de *E. coli* auxótrofa SASX38(DE3). Este resultado coincide con el publicado recientemente por Zwerschke *et al.* (265).

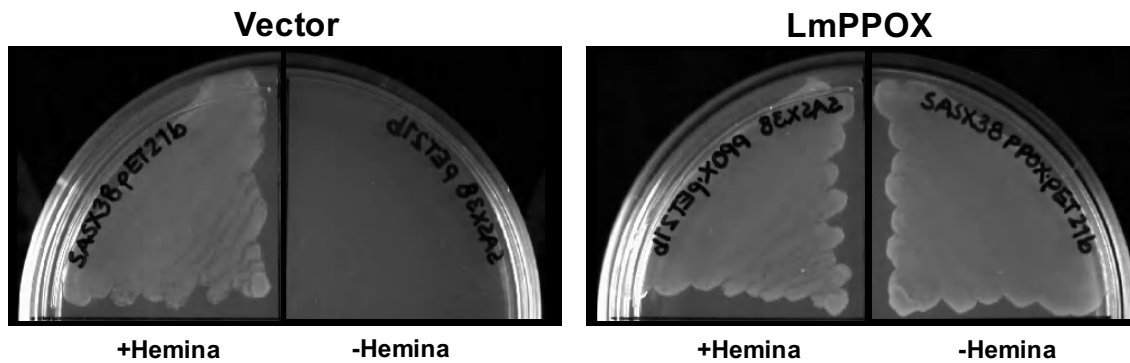


Figura 4.6. La LmPPOX es una enzima funcional. Las imágenes muestran el crecimiento de las bacterias SASX38(DE3) transformadas con el vector vacío como control (izquierda) o con el vector conteniendo el gen *lmpox* (derecha) en placas de medio LB sólido suplementadas (+) o no (-) con 20 µg/mL de hemo.

3. LmPPOX no es inhibida por los herbicidas lactofen y acifluorfen

Dado que los tripanosomátidos son los único eucariotas que poseen una PPOX tipo HemG, la proteína LmPPOX de *L. major* representa una diana terapéutica perfecta ya que podría ser inhibida específicamente sin generar los efectos citotóxicos de los tratamientos actuales (265). Para confirmar la diferencia estructural de la proteína PPOX HemG de *L. major* de origen bacteriano con la proteína PPOX tipo HemY humana, en primer lugar se realizaron análisis bioinformáticos. Utilizando los servidores de modelado estructural Phyre 2.0 y DALI, se obtuvo la superposición estructural 3D de las proteínas PPOX humana co-cristalizada con el inhibidor acifluorfen (PDB #3NKS) y el modelo teórico de la enzima LmPPOX. Como se observa en la figura 4.7, el sitio de unión del inhibidor acifluorfen presente en la PPOX humana teóricamente no está presente en la LmPPOX.

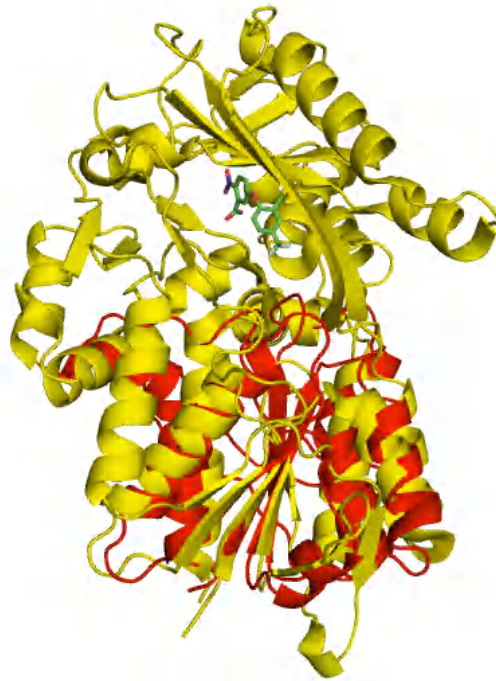


Figura 4.6. La LmPPOX no contiene el sitio de unión para el acifluorfen presente en la PPOX humana. presenta diferencias estructurales con la PPOX humana. El modelado computacional de LmPPOX (rojo) muestra que aunque la secuencia primaria es muy diferente a la proteína humana (amarilla), la LmPPOX tiene una región estructuralmente conservada con la PPOX eucariótica, que no contiene el sitio de unión del inhibidor acifluorfen (verde).

Para comprobar los análisis teóricos se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de las bacterias SASX38(DE3) expresando la proteína PPOX de *L. major*, utilizando los inhibidores acifluorfen y lactofen. Dichos inhibidores son herbicidas del grupo de los difeniléteres, los cuales actúan sobre las PPOX tipo HemY de las plantas inhibiendo su actividad enzimática.

Como se observa en la figura 4.7, el crecimiento de las bacterias SASX38(DE3) expresando la proteína LmPPOX no fue inhibido ni con 10 μM de acifluorfen ni con 500 nM de lactofen, concentraciones 10 y 5 veces mayores a las empleadas para la completa inhibición de la PPOX de plantas, respectivamente.

Lo anterior indica que estos inhibidores de enzimas PPOX eucarióticas no afectan la actividad enzimática de la LmPPOX, sugiriendo que la proteína PPOX tipo hemY del macrófago y la PPOX tipo HemG de *L. major* podrían ser inhibidas de manera específica.

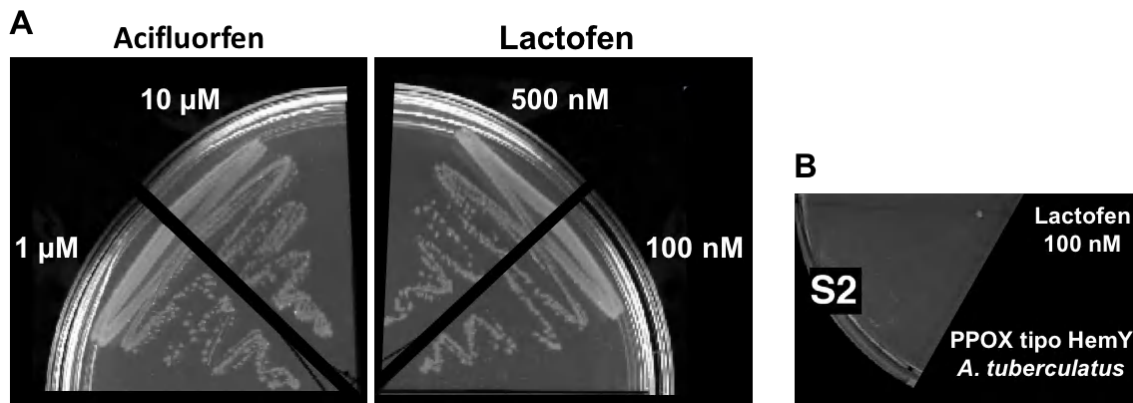


Figura 4.7. La enzima LmPPOX no es inhibida por los herbicidas lactofen y acifluorfen. A) Las bacterias SASX38(DE3) expresando la proteína LmPPOX fueron capaces de crecer en presencia de 1 μM y 10 μM de acifluorfen (izquierda) o y 100 nM y 500 mM de lactofen (derecha). B) El crecimiento de las bacterias SASX38 expresando la PPOX tipo HemY de la planta *Amaranthus tuberculatus* es inhibido en presencia de 100 nM del inhibidor lactofen (165).

4. La enzima PPOX se localiza en una estructura subcelular cerca a la mitocondria del parásito

Mientras en los organismos procariotas la PPOX está localizada en el citosol, en los organismos eucariotas la PPOX es una enzima mitocondrial. De acuerdo a los análisis teóricos realizado con los softwares TargetP y MitoProII, la LmPPOX carece de péptido señal y la probabilidad de localización mitocondrial es casi nula (0.01%).

Para determinar la localización experimental de la proteína LmPPOX, se creó una quimera de la proteína fusionada a la proteína mCherry en el extremo C-terminal utilizando el plásmido de expresión para *Leishmania* pLEXSY-hyg2. Los promastigotes de *L. major* fueron transfectados con este constructo y seleccionados con higromicina hasta obtener una línea con expresión estable de la proteína fluorescente. Posteriormente se realizaron experimentos de microscopía confocal para evaluar la localización subcelular de la proteína LmPPOX-mCherry, comparando con el marcador mitocondrial MitoTracker Green, y se calculó el coeficiente de co-localización de Pearson tras la deconvolución de las imágenes obtenidas.

Como se observa en la figura 4.8, la proteína LmPPOX marcada con la proteína mCherry no se localizó en la mitocondria de los parásitos (índice de Pearson 0.25 ± 0.026).

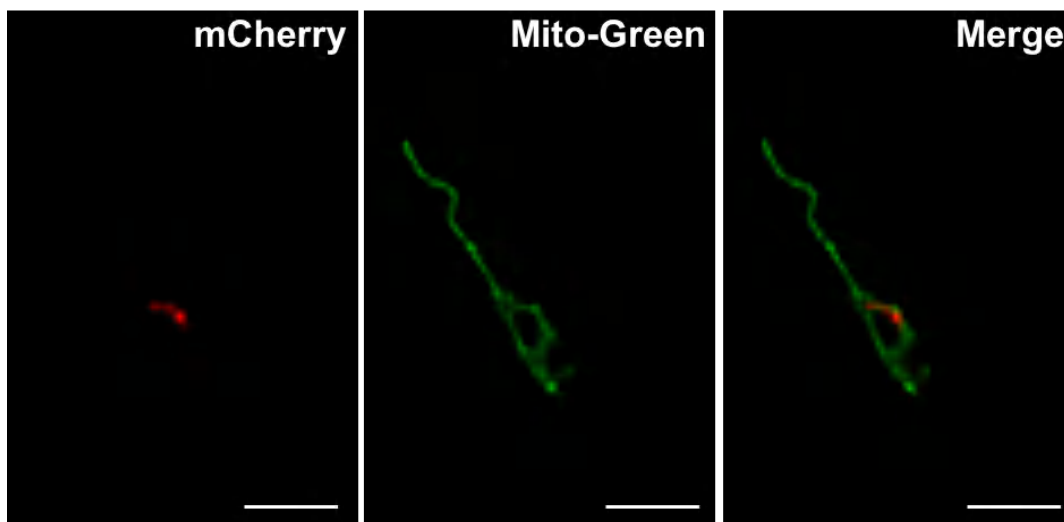


Figura 4.8. Localización subcelular de LmPPOX-mCherry. Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron incubados con 50 nM del marcador mitocondrial MitoTracker Green (Mit-Green) durante 30 minutos a 28 °C, y posteriormente fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia para determinar la co-localización de ambos marcajes (Merge). Barra de escala: 5 μ m. Imágenes representativas de promastigotes de *L. major* que expresan la proteína fluorescente LmPPOX-mCherry.

Para estudiar si el anterior resultado era debido a problemas en la expresión de la copia episomal del gen, se evaluó la localización de la proteína LmPPOX mediante marcaje endógeno con la proteína fluorescente mNeonGreen en el extremo C-terminal, utilizando la metodología CRISPR-Cas9 descrita en el Anexo 2. Para ello, se utilizó un ADN donador conteniendo la proteína mNeonGreen y el cassette de resistencia a puromicina flanqueado por brazos de homología de 30 nucleótidos específicos de del *lmpox*, y un ADN molde para la transcripción *in vivo* del ARNg dirigido a la secuencia adyacente al codón de parada de la proteína LmPPOX (Figura 4.9A). Los promastigotes de la línea de *L. major* Cas9/T7 fueron co-transfectados con ambos ADN y seleccionados con 30 μ g/mL de puromicina durante una semana, luego de lo cual fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizó el microscopio confocal de super resolución Leica TCS SP8, que nos permitió obtener imágenes tridimensionales de los parásitos expresando la proteína LmPPOX fluorescente.

De manera similar a lo observado con los parásitos expresando la proteína episomal LmPPOX-mCherry, la proteína LmPPOX-mNeonGreen no co-localiza con el marcador mitocondrial MitoTracker Red (Figura 4.9B).

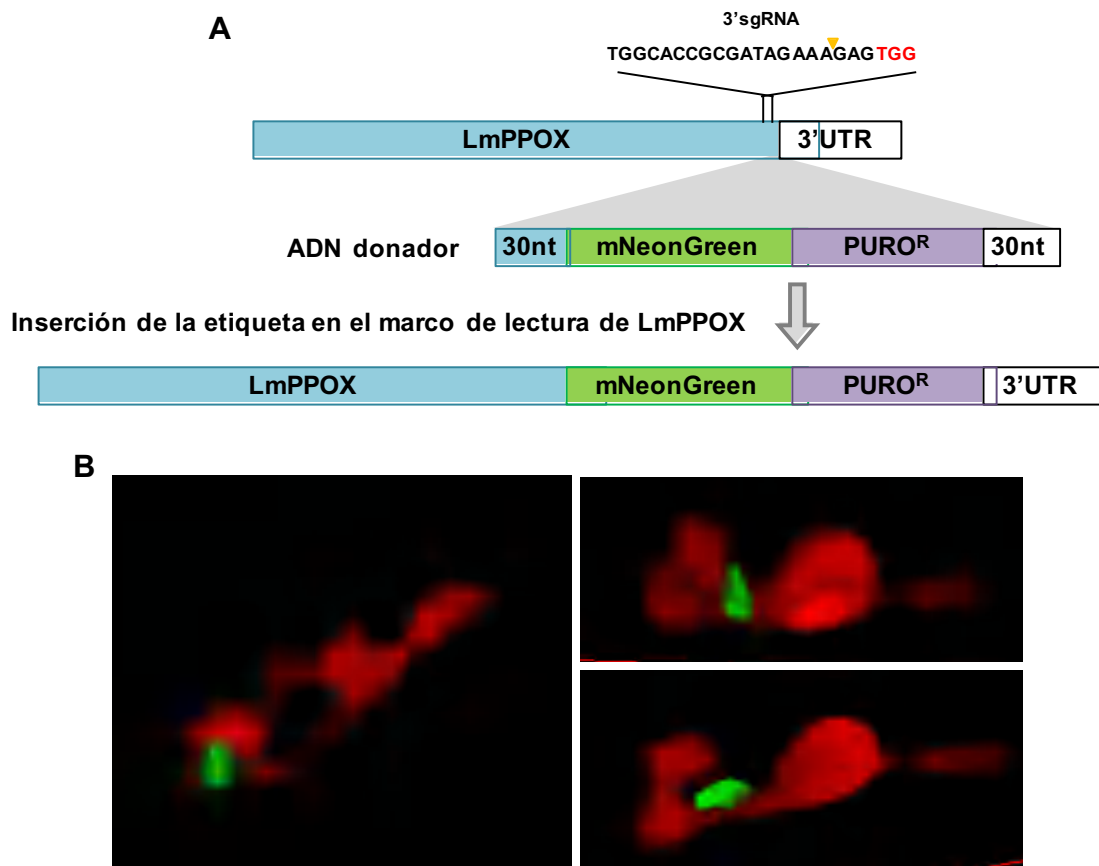


Figura 4.9. Localización subcelular de LmPPOX-mNeonGreen. A) Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 empleada para el marcaje *in situ* de la proteína LmPPOX en su extremo C-terminal. El ARNg hibrida cerca del codón de parada de la LmPPOX indicando el punto de ruptura de la doble cadena mediado por la proteína Cas9 (punta de flecha amarilla), tras lo cual el ADN es reparado por recombinación homóloga utilizando el ADN donador que contiene la proteína fluorescente. B) Los promastigotes de *L. major* expresando el gen *ppox* marcado endógenamente con mNeonGreen (mNG) fueron crecidos hasta fase logarítmica e incubados con 50 nM del marcador mitocondrial MitoTracker Deep Red (Mit-Red) a 28 °C durante 30 minutos. Los parásitos fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia de súper resolución para determinar la co-localización de ambos marcajes. Las figuras muestran un parásito representativo de una población total con un patrón de fluorescencia similar, observado desde diferentes ángulos a partir de la reconstrucción tridimensional de la imagen.

Estos resultados son inesperados, puesto que las enzimas PPOX descritas hasta la fecha están localizadas en mitocondria y plastidios en mamíferos y plantas, o en el citosol de bacterias, y por lo tanto no existen precedentes en la bibliografía de otra localización subcelular de esta enzima. Es posible que similar al modelo “*kiss and run*” sugerido en la transferencia del hierro a la mitocondria (184), la LmPPOX esté localizada en estructuras celulares, aun no identificadas, que se unan de manera transitoria con la mitocondria del parásito durante la síntesis de hemo.

5. Obtención de parásitos de *L. major* mutantes nulos para el gen *ppox*

En primer lugar, se intentó deletar ambos alelos del gen mediante la estrategia clásica de recombinación homóloga. Para ello, los promastigotes de *L. major* se transflectaron con un ADN lineal conteniendo el gen de resistencia a higromicina flanqueado por secuencias de 938 pb y 1057 pb de las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *lmppox*, respectivamente. En todos los eventos de transfección se obtuvieron parásitos heterocigotos en los que solo una copia del gen era deletada y reemplazada por el cassette de resistencia a higromicina (Figura 4.10), inclusive después de un segundo evento de transfección utilizando un cassette de resistencia a otro medicamento.

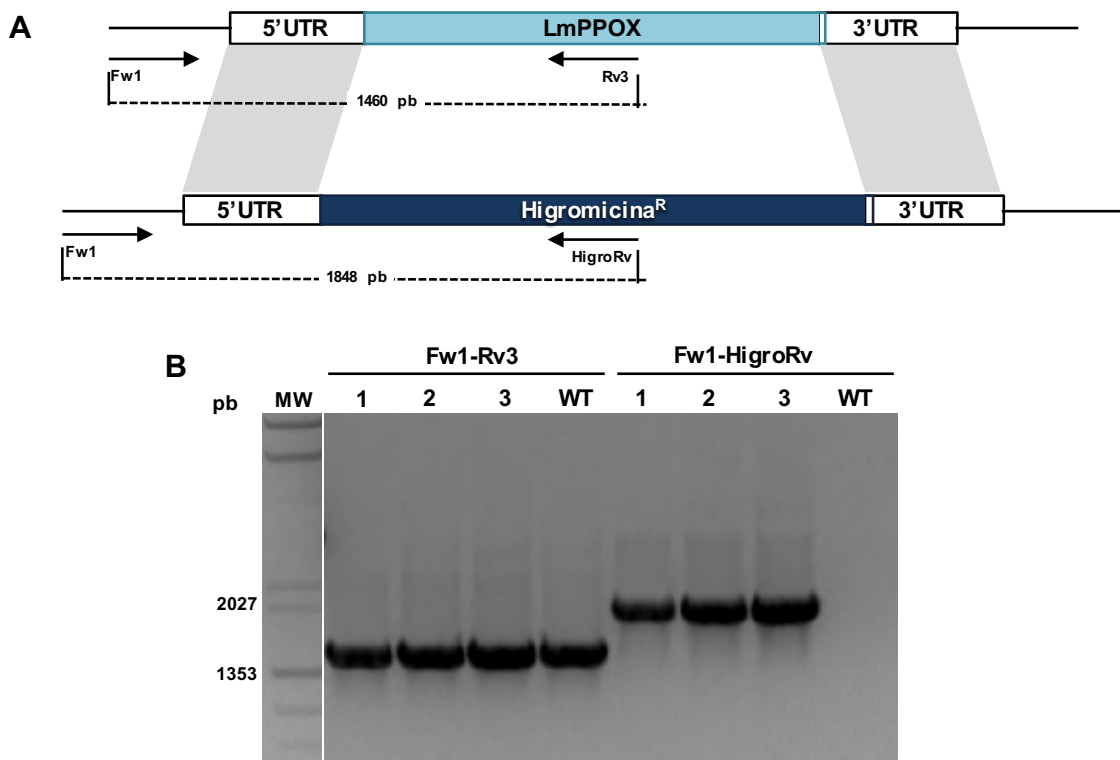


Figura 4.10. Representación esquemática de la estrategia clásica de recombinación homóloga utilizada para la generación de los parásitos *LmPPOX^{-/-}*. El gen *lmppox* es reemplazado por el cassette de resistencia a higromicina mediante recombinación homóloga espontánea utilizando los brazos de homología de aproximadamente 1 kb correspondientes a las regiones 5'UTR y 3'UTR del locus. Se indican los oligonucleótidos utilizados para verificar el correcto reemplazamiento génico y los tamaños esperados de los productos amplificados por PCR.

El hecho de no poder obtener mutantes nulos para *LmPPOX* no indicaba una posible esencialidad del gen, ya que el medio de cultivo era suplementado con una fuente

exógena de hemo, sino que por el contrario nos sugerían una baja eficiencia de la técnica empleada para la manipulación genética de los parásitos de *Leishmania spp.*

Por lo tanto, para la obtención de los parásitos doble mutantes nulos para la proteína LmPPOX se utilizó la estrategia CRISPR-Cas9 recientemente descrita en el año 2017 por el laboratorio de Eva Gluenz (285) e implementada en nuestro laboratorio (Anexo 2). Para ello, la línea de *L. major* Cas9/T7 fue transfectada con 3 productos de PCR correspondientes a: i) dos ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los dos ARNg dirigidos a las regiones 5'UTR y 3'UTR cercanas al codón de inicio y de parada de la traducción del gen *lmppox*, respectivamente, y ii) un ADN donador conteniendo el cassette de resistencia a geneticina flanqueado por regiones de homología de 30 nucleótidos específicos de las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *lmppox*, adyacentes al sitio de hibridación de los ARNg (Figura 4.11).

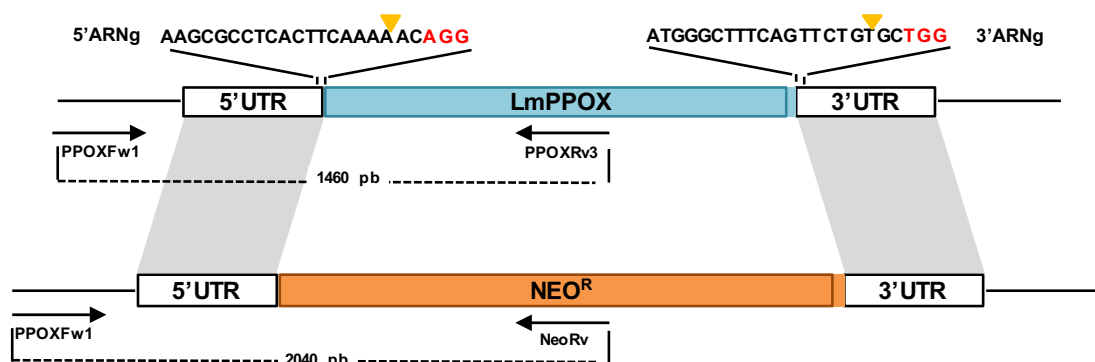


Figura 4.11. Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 utilizada para la generación de los parásitos LmPPOX^{-/-}. Se utilizaron dos ARNg dirigidos a las secuencias adyacentes a los codones de inicio y de parada del gen *ppox* para generar la ruptura de la doble cadena de ADN (puntas de flecha amarillas), la cual es reparada mediante recombinación homóloga utilizando como molde el ADN donador conteniendo el cassette de resistencia a geneticina flanqueado por brazos de homología de 30 nucleótidos de las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *ppox*. Se indican en la figura los oligonucleótidos utilizados para la confirmación por PCR y los fragmentos esperados en cada caso.

Los parásitos transfectados fueron seleccionados en medio líquido con 40 µg/mL de geneticina durante 7 días y posteriormente se cultivaron en medio sólido suplementado con la misma concentración de medicamento para la obtención de clones.

Se seleccionaron al azar 10 clones de parásitos resistentes a geneticina para evaluar mediante la PCR la delección del gen *ppox* y la integración del cassette de resistencia al medicamento en el locus indicado. En ninguno de los clones se observó

amplificación del producto de PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen *ppox* y por el contrario se observó la amplificación del fragmento de ADN específico para el gen de resistencia a geneticina, indicando que en todos los clones ambos alelos del gen habían sido deletados y reemplazados por el cassette de resistencia (Figura 4.12).

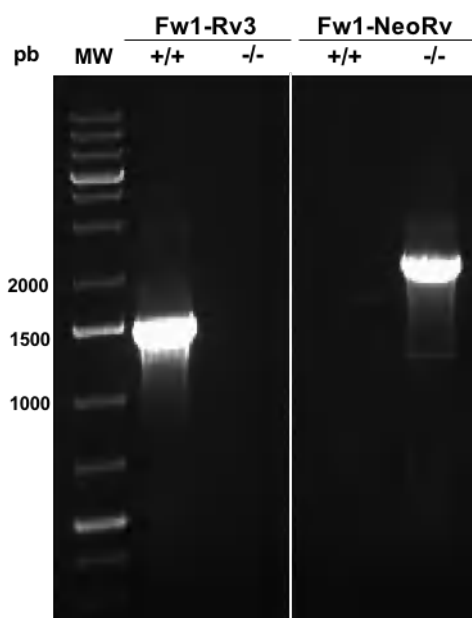


Figura 4.12. Generación de promastigotes de *L. major* mutantes nulos para el gen *ppox*. Análisis de genotipo mediante PCR del locus *ppox* usando los oligonucleótidos Fw1-Rv3 y Fw1-NeoRv específicos de gen y cassette de resistencia a geneticina, respectivamente. La amplificación de fragmento de 1460 pb específico de gen solo en los parásitos control (+/+) y el fragmento de 2040 pb específico de cassette geneticina en la línea LmPPOX^{-/-} (-/-) indica la delección de ambos alelos del gen *ppox*.

De manera aleatoria se seleccionó uno de los clones mutantes nulos para el gen *ppox* que fue denominado LmPPOX^{-/-}, para el cual se confirmó la delección de ambos alelos del gen mediante Southern blot. Para ello, los ADN genómicos de los parásitos control (Cas9/T7) y LmPPOX^{-/-} se digirieron con las enzimas de restricción *AlwNI* y *AvaI*, y los fragmentos resultantes se hibridaron con sondas específicas para la región 5'UTR y la secuencia codificante del gen *ppox*, respectivamente. Como se observa en la figura 4.13, no se observó ninguna banda en el ADN genómico de los parásitos LmPPOX^{-/-} hibridado con la sonda específica para el gen. Por otra parte, la sonda para la región 5'UTR reconoció solo una banda 5.3 kb en el ADN de los los parásitos LmPPOX^{-/-} indicando la pérdida del sitio de restricción para la enzima *AlwNI* presente en el gen *ppox* como resultado de su sustitución por el cassette de resistencia a geneticina en ambos alelos (Figura 4.13).

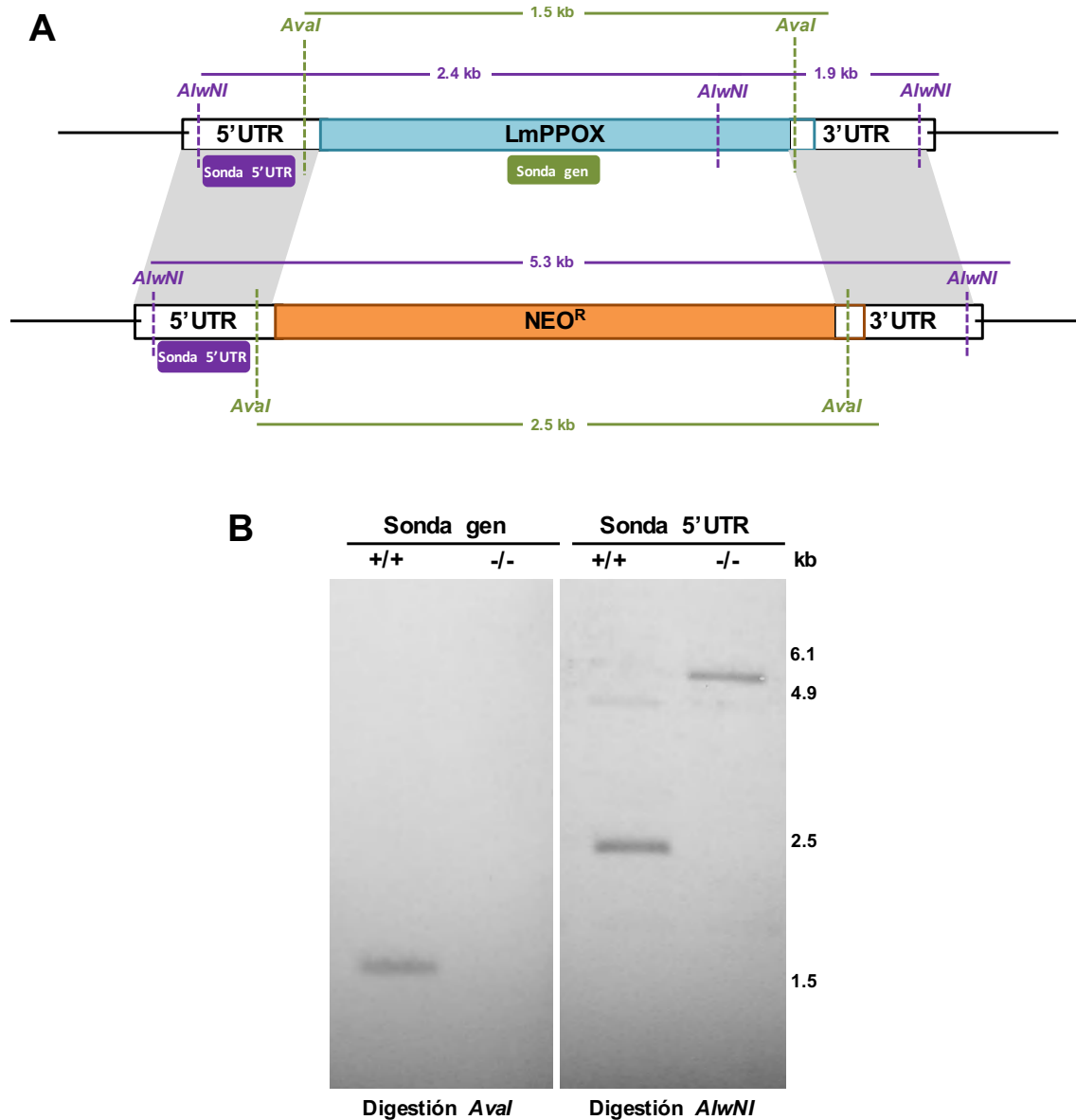


Figura 4.13. Confirmación de la delección de ambos alelos del gen *pox* en los parásitos *LmPPOX*^{-/-} mediante Southern blot. A) Representación esquemática de los sitios de restricción para las enzimas *AvaI* y *AlwNI* en el locus *pox* de los parásitos control (arriba) y mutantes *LmPPOX*^{-/-} (abajo), los sitios de hibridación de las sondas específicas para la región 5'UTR y la región codificante del gen *pox* y los tamaños de las bandas esperados en cada caso. B) La detección de una banda de 1.5 kb con la sonda específica de gen solo en los parásitos control (+/+) y el reconocimiento de una banda de 5.3 kb con la sonda de la región 5'UTR en los parásitos doble KO (-/-), confirma la correcta sustitución de ambos alelos del gen *pox* por cassette de resistencia a geneticina.

Finalmente se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) que el gen *pox* se expresa en los promastigotes de la línea control (*Cas9/T7*), mientras que

el ARNm de este gen no es detectable en los parásitos mutantes nulos $LmPPOX^{-/-}$ (Figura 4.14).

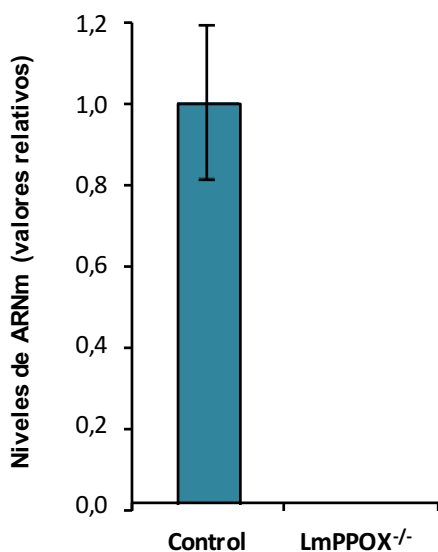


Figura 4.14. La línea $LmPPOX^{-/-}$ no presenta niveles detectables de ARNm para la proteína **LmPPOX**. Análisis de la expresión del gen *ppox* en promastigotes de *L. major* control (Cas9/T7) y doble KO ($LmPPOX^{-/-}$) mediante RT-qPCR utilizando ARNm total aislado de cada una de las líneas.

En conjunto, estos resultados confirman la delección de ambos alelos del gen *ppox* en los parásitos $LmPPOX^{-/-}$.

6. El nivel de expresión de la proteína PPOX no afecta al desarrollo de las formas promastigote y amastigote de *L. major*.

La obtención de parásitos doble KO para el gen *ppox* en una sola ronda de transfección utilizando la nueva metodología CRISPR-Cas9 (285), indica no solo la alta eficiencia de esta metodología para la manipulación genética en los parásitos de *Leishmania* spp, sino también que la proteína LmPPOX no es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los promastigotes de *L. major* los cuales son cultivados en presencia de SFB que les proporciona hemo exógeno.

Para revertir al fenotipo salvaje, los parásitos $LmPPOX^{-/-}$ fueron transfectados con una copia episomal del gen contenida en el plásmido de expresión para *Leishmania* pXGPuro. En este caso no fue necesario realizar mutaciones en las secuencia PAM utilizadas en la generación de los parásitos doble KO, puesto que los ARNg utilizados son dirigidos a las regiones 5'UTR y 3'UTR fuera del ORF de la proteína LmPPOX. Los parásitos transfectados fueron seleccionados con 30 μ g/mL de puromicina hasta obtener una línea estable, la cual fue denominada $LmPPOX^{-/-}$ + PPOX.

Como se observa en la figura 4.15, los promastigotes de las líneas control (Cas9/T7), LmPPOX^{-/-} y LmPPOX^{-/-} + PPOX, presentan un crecimiento logarítmico similar después del cual alcanzan la fase estacionaria al cuarto día de crecimiento. Lo anterior indica que la ausencia de la proteína LmPPOX no afecta el crecimiento *in vitro* de los promastigotes de *L. major*.

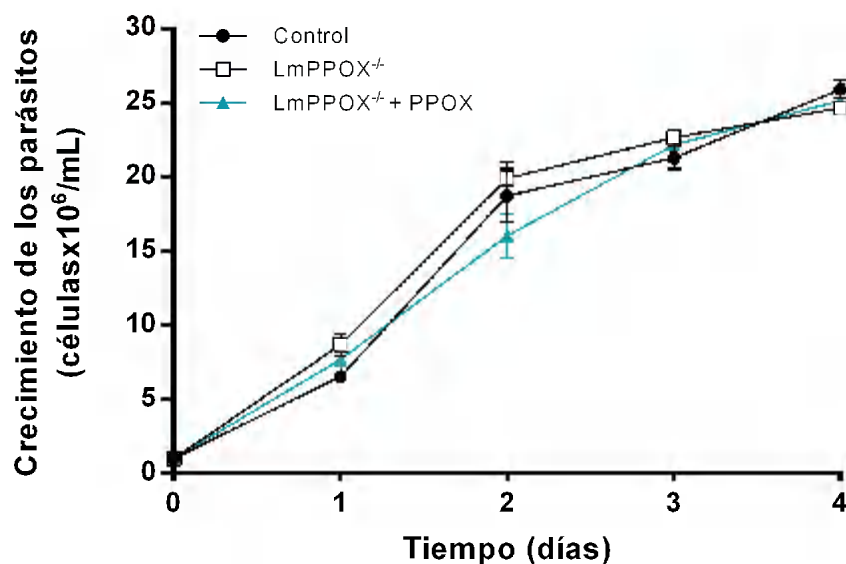


Figura 4.15. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de la proteína LmPPOX. Los promastigotes control (Cas9/T7), doble KO (LmPPOX^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmPPOX^{-/-} + PPOX) fueron ajustados a una concentración inicial de 10⁶ parásitos/mL en medio de cultivo suplementado con 10% SFB, y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 4 días. Los experimentos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

También evaluamos si la delección del gen *ppox* podría tener algún efecto en la generación de los promastigotes metacíclicos *in vitro*, los cuales fueron purificados mediante el método de selección negativa mediante aglutinina de cacahuete (PNA). No observamos diferencias en el porcentaje de promastigotes metacíclicos recuperados de los parásitos en fase estacionaria de las líneas control (Cas9/T7), mutantes nulos (LmPPOX^{-/-}) y mutantes nulos complementados (LmPPOX^{-/-} + PPOX), indicando que el desarrollo de los parásitos infectivos en *L. major* no es alterado en ausencia del gen *lmppox* (Figura 4.16).

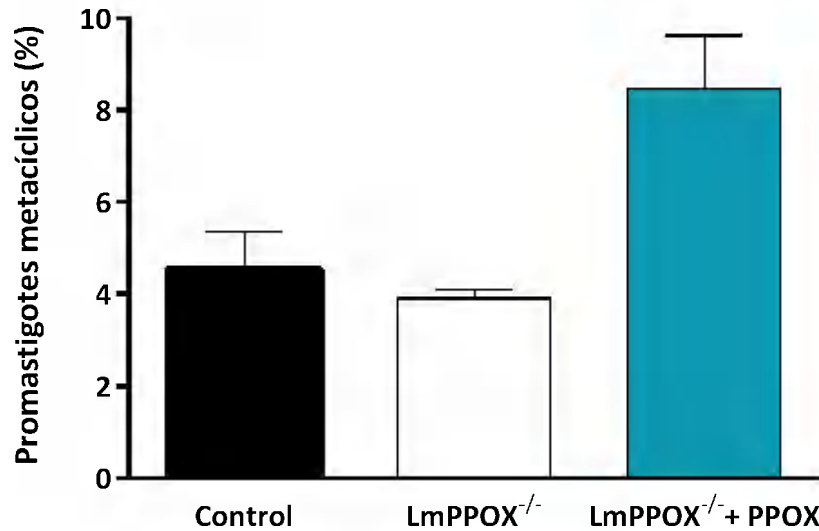


Figura 4.16. Porcentaje de promastigotes PNA negativos obtenidos de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (7 días) de las líneas control (Cas9/T7), doble KO (LmPPOX^{-/-}) y complementados con una copia episomal del gen (LmPPOX^{-/-} + PPOX). Los experimentos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Los anteriores resultados indican que el gen *pfox* no afecta el crecimiento de los promastigotes ni su diferenciación a las formas metacíclicas en cultivos *in vitro*. Para analizar la importancia de la proteína LmPPOX en la replicación de los amastigotes intracelulares, se realizaron experimentos de infección *in vitro* en células THP1. Se emplearon las líneas control (Cas9/T7), LmPPOX^{-/-} y LmPPOX^{-/-} + PPOX bioluminiscentes, generadas tal como se describe en el apartado 3.8 de materiales y métodos, las cuales fueron depletadas de hemo durante 72 horas previas a la infección. Esta depleción garantiza que el hemo intracelular almacenado por los promastigotes (Figura 2.4) haya sido agotado antes de la infección y por lo tanto los amastigotes intracelulares deban adquirir hemo o porfirinas preformadas desde el macrófago. Como se observa en la figura 4.17, la actividad luciferasa de los macrófagos infectados con la línea LmPPOX^{-/-} fue inferior a la obtenida en los macrófagos infectados con la línea control a las 120 horas tras la infección, indicando que los amastigotes mutantes nulos para la proteína LmPPOX se replican de manera menos eficiente. Cuando se revierte la ausencia del gen *pfox* mediante la expresión episomal del gen *lmpfox* en la línea LmPPOX^{-/-} + PPOX, la actividad luciferasa de los macrófagos infectados incrementa.

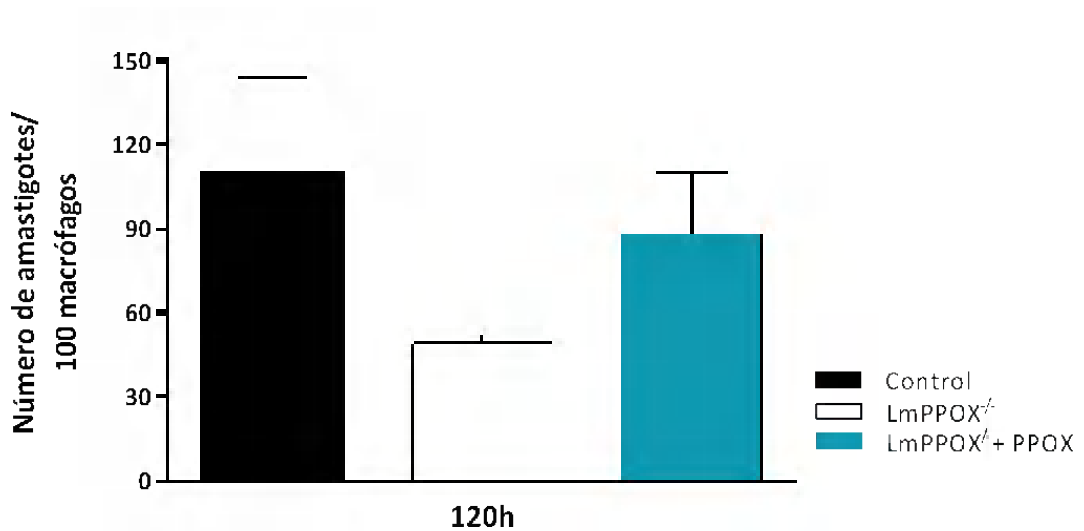


Figura 4.17. La ausencia de la proteína LmPPOX altera la replicación intracelular de los amastigotes de *L. major* en ensayos de infección *in vitro*. Los macrófagos THP1 fueron infectados durante 24 horas con promastigotes en fase estacionaria de las líneas control (Cas9), doble KO (LmPPOX^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmPPOX^{-/-} + PPOX), previamente depletados de hemo. Tras lavar los parásitos no internalizados, las células infectadas fueron fijadas y teñidas con DAPI para su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Se representa el número de amastigotes intracelulares por cada 100 macrófagos, contados mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ. Los experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por triplicado.

7. Virulencia de los parásitos LmPPOX^{-/-} en un modelo murino de leishmaniosis cutánea

Luego de evaluar la importancia de la proteína LmPPOX mediante infecciones intracelulares *in vitro* utilizando células THP1, decidimos estudiar si la ausencia de dicha proteína también podría tener un efecto en la capacidad de infección y la virulencia de *L. major* en un modelo experimental de leishmaniosis cutánea. Se emplearon ratones de la cepa Balb/c, los cuales fueron infectados subcutáneamente en la almohadilla plantar con 10^4 promastigotes metacíclicos de las líneas bioluminiscentes control (Cas9/T7), LmPPOX^{-/-} y LmPPOX^{-/-} + PPOX, generadas tal como se describe en el apartado 3.8 de materiales y métodos. El espesor de las patas infectada y no infectada fue medido semanalmente usando un calibre digital, y la diferencia entre ambos valores fue considerado como indicador de la progresión de la enfermedad. Después de 8 semanas de infección los animales fueron sacrificados y se determinó la carga parasitaria de las patas infectadas y el nódulo linfático drenante (poplíteo) mediante actividad luciferasa

utilizando el kit ONE-Glo™ Luciferasa Assay System (Promega) tal como se describe en el apartado 3.10.1.2 de materiales y métodos.

La progresión de la enfermedad fue similar en los 3 grupos de ratones evaluados, la cual se caracterizó por una reacción inflamatoria progresiva en la almohadilla plantar de las patas infectadas que en algunos casos se acompañó de lesiones no cicatrizantes. Contrario a lo esperado, se observó un aumento en la inflamación de las patas infectadas con los parásitos mutantes nulos para la proteína PPOX en comparación con los grupos infectados con las líneas de parásitos expresando la proteína LmPPOX, aunque dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 4.18).

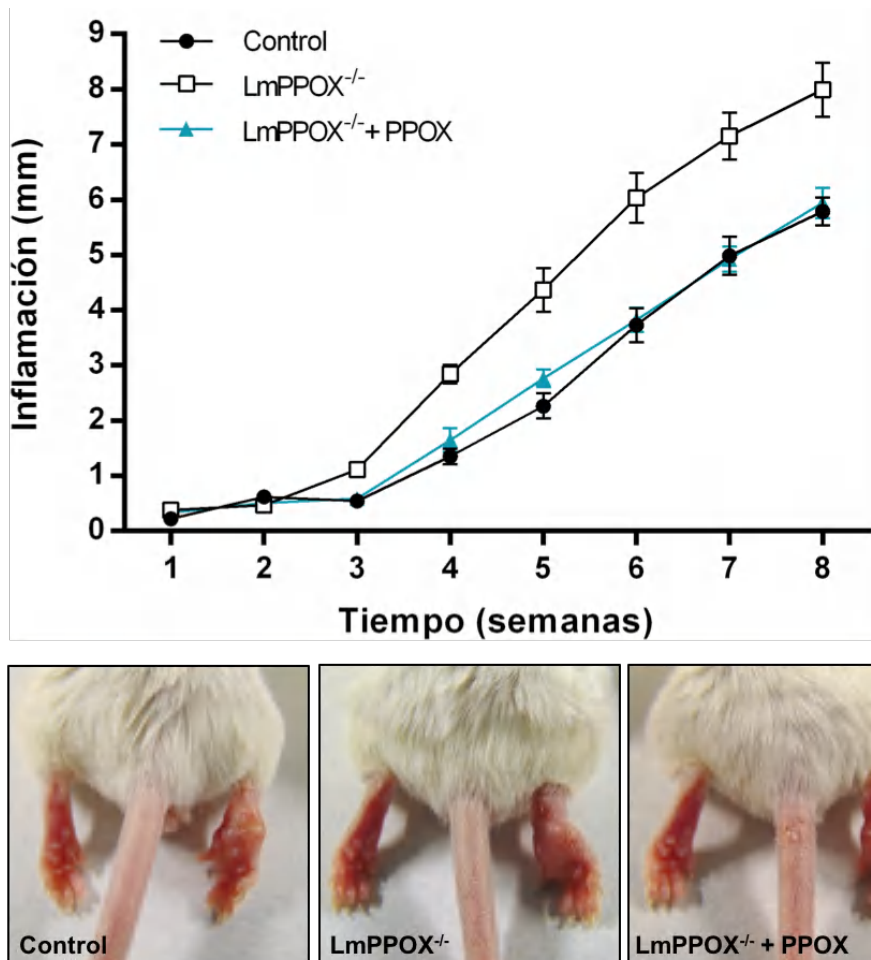


Figura 4.18. Infectividad de los promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de LmPPOX en un modelo murino de ratones Balb/c. Los ratones Balb/c fueron infectados en la almohadilla plantar con promastigotes metacíclicos (10^4) de las líneas control (Cas9/T7), doble KO (LmPPOX^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmPPOX^{-/-} + PPOX). La progresión de la inflamación registrada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada). Los valores representan las medias \pm SEM de 7 ratones. Se

muestran imágenes representativas de la inflamación en la almohadilla plantar de los ratones tras 6 semanas de infección.

De manera sorprendente, se observó una disminución significativa (63.3%, $p < 0.02$) en la carga parasitaria de las patas infectadas con los parásitos LmPPOX^{-/-} en comparación con los ratones infectados con la línea control (Cas9/T7), mientras que las cargas parasitarias de los animales infectados con la línea LmPPOX^{-/-} + PPOX aumentó significativamente (43.9%, $p < 0.05$) en comparación con los animales infectados con la línea mutante nula para LmPPOX (Figura 19A). Estos resultados indican que la complementación de la línea LmPPOX^{-/-} con una copia episomal del gen *ppox* rescata el fenotipo silvestre de los parásitos y que la disminución en la carga parasitaria es consecuencia de la ausencia de la proteína LmPPOX en los parásitos de *L. major*.

Para confirmar los resultados obtenidos, se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Granada muestras de las patas infectadas de todos los animales para evaluar mediante microscopia el número de macrófagos infectados por mm² de tejido y el número medio de amastigotes por macrófago infectado. En los cortes histológicos se observó un aumento significativo (64.4%, $p < 0.05$) en el número de macrófagos infectados por área de tejido en los ratones infectados con la línea LmPPOX^{-/-} + PPOX en comparación con la línea LmPPOX^{-/-} (Figura 19B izquierda). Sin embargo no se observaron diferencias en el número medio de amastigotes por macrófago en las patas de los animales infectadas con las diferentes líneas de parásitos (Figura 19B derecha). Estos resultados sugieren que la proteína LmPPOX posiblemente les confiere una ventaja a los parásitos su replicación como amastigotes intracelulares.

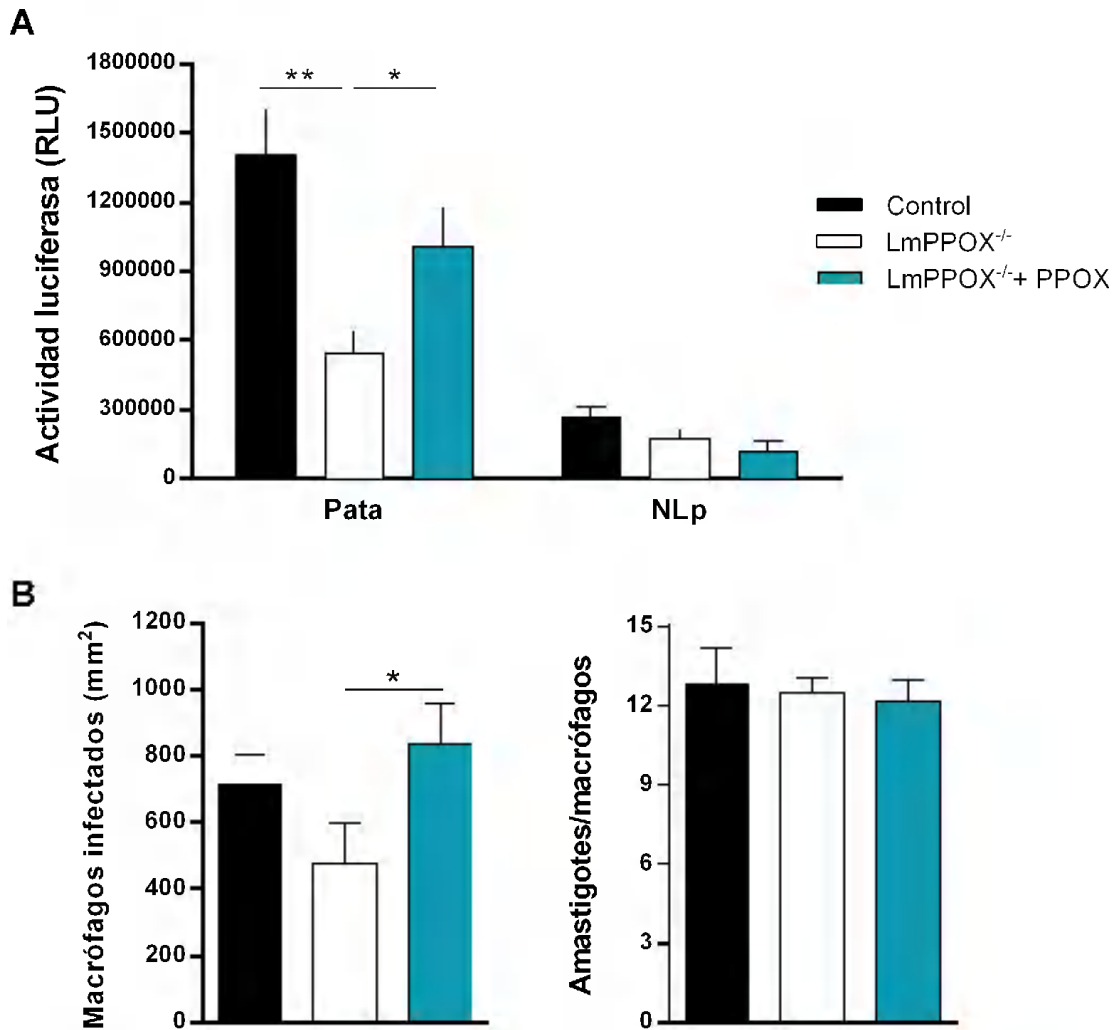


Figura 4.19. Cargas parasitarias de ratones Balb/c infectados con líneas de *L. major* expresando diferentes niveles de la proteína LmPPOX. A) Cargas parasitarias de las patas infectadas y nódulos linfáticos poplíteos (NLp) tras 8 semanas de infección, determinadas mediante actividad luciferasa de los tejidos infectados. Los valores representan las medias \pm SEM de 7 ratones. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.02$). B) Determinación de número de macrófagos infectados por mm^2 de tejido (izquierda) y el número medio de amastigotes por macrófago infectado (derecha) en muestras de tejido de las patas infectadas de los ratones Balb/c.

CAPITULO IV: Caracterización de la enzima ferroquelatasa de *L. major*

Previamente se había descrito la habilidad de los promastigotes de *Leishmania* spp. de crecer en medio suplementado con el precursor PPIX en lugar de hemina (228,264), de manera similar a lo observado en nuestros experimentos previos (Figura 2.2). El crecimiento de los parásitos auxótrofos para hemo en presencia de dicho precursor indica de manera indirecta que *L. major* presenta una actividad ferroquelatasa que cataliza la inserción de hierro en el anillo de PPIX para la formación de hemo. La ferroquelatasa (FeCH) es una enzima esencial en los parásitos *B. malayi* (270,271) y *P. falciparum* (273,274), y en otros microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (296) y hongos patógenos de los géneros *Candida*, *Fusarium* y *Aspergillus* (297). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ningún estudio que demuestre de manera directa la funcionalidad o la esencialidad de esta enzima en los parásitos de *Leishmania* spp. En el presente capítulo se describe la caracterización de la enzima ferroquelatasa de *L. major* (LmFeCH) y el estudio de su importancia en el ciclo de vida de este parásito.

1. El genoma de *L. major* contiene un gen tipo ferroquelatasa con características procariotas

El genoma de *L. major* contiene un gen putativo ferroquelatasa de copia única localizado en el cromosoma 17 (LmjF.17.1460) que codifica una proteína de 385 aminoácidos con un peso molecular teórico de 42.2 kDa. Este gen también presenta una elevada sintenia con respecto a los genes ortólogos de otras especies de *Leishmania*, y de manera interesante, es el único de los 3 genes que localiza fuera del cromosoma 6 y que parece haber evolucionado de forma independiente en este grupo de parásitos.

El análisis filogenético de secuencias de ferroquelatasas de diversos organismos muestra que la FeCH de *L. major* (LmFeCH) está distantemente relacionada con sus ortólogos de plantas, levaduras y mamíferos, y fuertemente asociada con el filum de proteobacterias. Este resultado coincide con el origen bacteriano del gen *fech* en *Leishmania* spp. propuesto por los análisis evolutivos (226,230,232) (Figura 5.1).

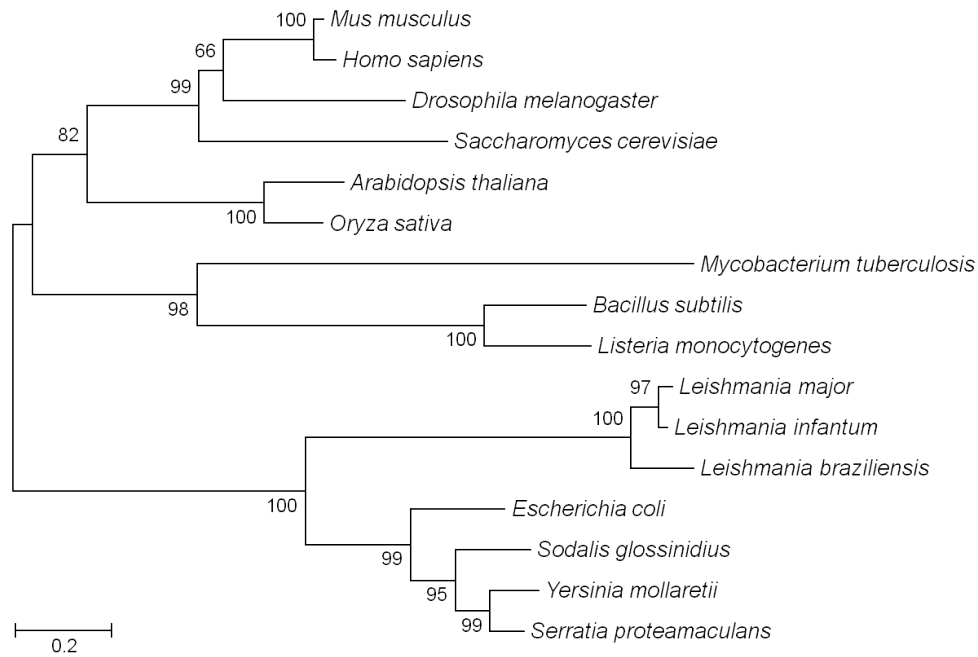


Figura 5.1. Análisis filogenético de FeCHs de diversos organismos. El árbol filogenético fue generado por máxima verosimilitud con un *bootstrapping* de 1000 iteraciones utilizando el software MEGA 6.0. Los números en cada uno de los clados indican el porcentaje de veces que ese clado se repitió tras el análisis de *bootstrap*, tomando como significativos aquellos superiores al 50% de las veces. Números de acceso a GenBank: *Arabidopsis thaliana* CAA51819.1, *Bacillus subtilis* (BsFeCH) AKI91450.1, *Drosophila melanogaster* (DmFeCH) AAC26225.1, *Escherichia coli* (EcFeCH) P23871.3, *Homo sapiens* (HsFeCH) CAB65962.1, *L. braziliensis* XP_001563927.1, *L. infantum* SUZ40923.1, *L. major* (LmFeCH) XP_001682405.1, *Listeria monocytogenes* WP_061107112.1, *Mus musculus* AAA80530.1, *Mycobacterium tuberculosis* AMC77213.1, *Oryza sativa* A2Y3Q5.2, *Saccharomyces cerevisiae* (ScFeCH) NP_014819.3, *Serratia proteamaculans* WP_012005582.1, *Sodalis glossinidius* WP_011410557.1, *Yersinia mollaretii* (YmFeCH) CNI16365.1.

Utilizando el software Clustal Omega (292), se realizó un análisis comparativo entre las secuencias de aminoácidos de las FeCHs de diferentes especies de *Leishmania*, incluyendo *L. major*, y diversas proteínas homólogas de origen eucariota y procariota. Este análisis mostró que la secuencia de aminoácidos de la LmFeCH presenta una identidad bastante alta con las FeCHs de otras especies de *Leishmania* del subgénero *Leishmania* (>90%) mientras que dicha identidad es levemente menor en las especies del subgénero *Viannia* (<80%). Por otra parte, la LmFeCH muestra aproximadamente un 22% y 37% de identidad con la FeCH humana y la HemH de *E. coli*, respectivamente (Figura 5.2).

	EcFeCH	LbrFeCH	LpaFeCH	LmxFeCH	LmjFeCH	LinFeCH	LdFeCH	BsFeCH	ScFeCH	HsFeCH
EcFeCH		37.1	37.7	36.2	37.4	36.8	36.8	25.1	26.3	26.5
LbrFeCH	37.1		97.7	76.1	77.9	77.1	77.1	18.2	21.1	21.9
LpaFeCH	37.7	97.7		75.8	78.4	77.7	77.7	17.9	21.1	21.6
LmxFeCH	36.2	76.1	75.8		89.9	89.4	89.4	17.6	21.7	21.6
LmjFeCH	37.4	77.9	78.4	89.9		94.8	94.8	17.2	21.4	21.9
LinFeCH	36.8	77.1	77.7	89.4	94.8		99.7	17.9	21.4	21.6
LdFeCH	36.8	77.1	77.7	89.4	94.8	99.7		17.9	21.4	21.6
BsFeCH	25.1	18.2	17.9	17.6	17.2	17.9	17.9		23.4	26.3
ScFeCH	26.3	21.1	21.1	21.7	21.4	21.4	21.4	23.4		45.8
HsFeCH	26.5	21.9	21.6	21.6	21.9	21.6	21.6	26.3	45.8	

Figura 5.2. Matriz de identidad y similitud entre diferentes proteínas FeCH. Los alineamientos de las secuencias fueron realizados utilizando el software Clustal Omega. Números de acceso a Genbank: *Escherichia coli* (EcHemH) P23871.3, *Bacillus subtilis* (BsHemH) AKI91450.1, *Saccharomyces cerevisiae* (ScHem15) NP_014819.3, *Homo sapiens* (HsFeCH) CAB65962.1, *L. braziliensis* (LbrFeCH) XP_001563927.1, *L. panamensis* (LpaFeCH) XP_010697834.1, *L. mexicana* (LmxFeCH) XP_003874013.1, *L. major* (LmFeCH) XP_001682405.1, *L. infantum* (LinFeCH) SUZ40923.1, *L. donovani* (LdFeCH) XP_003860013.1.

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las FeCHs permitió determinar que, a diferencia de las enzimas de origen eucariótico, la LmFeCH carece de la región N-terminal que contiene el péptido señal para la localización en mitocondria y tampoco presenta la región C-terminal involucrada en la formación de los clúster [2Fe-2S] y la estabilización de las proteínas dímeras (Figura 5.3). Sin embargo, la LmFeCH contiene los aminoácidos catalíticamente importantes conservados en las ferroquelatasas de diversos organismos: His235 (azul), Phe336 (naranja) y Glu342 (rojo), numerados de acuerdo a la secuencia de *L. major*, los cuales están implicados en incorporación del ión ferroso, la extracción de protones y las interacciones con el macrociclo de porfirina (Figuras 5.3 y 5.4) (298).

LmFeCH	-----	0
EcFeCH	-----	0
YmFeCH	-----	0
BsFeCH	-----	0
ScFeCH	----- MLSRITIRTQGSFLRRSQLTITRSFS ----- VT-FN	29
DmFeCH	----- MF ----- LHNTKFC ----- RLASGLAGGV	19
HsFeCH	MRSGLANMAAALRAAGVLLRDLPLASSSWRVCQPWRWKSAAAAAVTTETAQHAQGAK-PQ	59
LmFeCH	-MSCAPGPTKAILLVNLGTTTAPTAPAVRRFLREFLSDRRVIDVPRFLWYSALYGFILPF	59
EcFeCH	---MRQTKTGILLANLGTDPAPTPEAVKRYLKQFLSDRRVVDTSRLLWVPLLRGVILPL	56
YmFeCH	---MMQTKLGLVMVNLGTPDAPTSQAVKRYLAEFLSDRRVVDTSPLLWVPLLRGVILPI	56
BsFeCH	---MSRKKMGLLVMAYGTPYK--EEDIERYTHIRGRKPE--P-----E	38
ScFeCH	MQNAQKRSP TGIVLMNMGGPSK--VEETYDFLYQLFADNDLIPISAK-YQKTIKAYIAKF	86
DmFeCH	RNLSGQKPKTA ILMLNMGGPHT--TDQVHDYLLRIMTDRDMIQLP---VQSRLGPWIAQR	74
HsFeCH	VQPQKRKPKTG ILMLNMGGPET--LGDVHDFLLRFLDQDLMTLP---IQNKLAPPIAKR	114
LmFeCH	RPRRITPLYKGIWIKSDSGVINGKTEGSPLTLYSESLVAKVQASVEKTSGGAVVA--RH	117
EcFeCH	RSPRVAKLYASVWMEEGS-----PLMVYSRQQQALAQRL----PEMPV--AL	98
YmFeCH	RSPRVAKLYQSVWMEEGS-----PLLVSRRQQKALAARM----PDIPV--EL	98
BsFeCH	MLQDLKDRYEAI--GG-----ISPLAKITEEQAHNLEQHLNEIQDE-ITFKAYI	84
ScFeCH	RTPKIEKQYREI--GG-----GSPIRKWEYQATEVCKILDKTCPETAPHKPYV	133
DmFeCH	RTPEVQKKYKEI--GG-----GSPILKWTLEQQQLMCEQLDRISPETAPHKHYV	121
HsFeCH	RTPKIQEQYRRI--GG-----GSPIKIWTSKQEGEMVKLLDELSPNTAPHKYVI	161
LmFeCH	AMRYGVNPISTLKAHDEFATLRELVLPLFPQYTTSTTSASIYDEVFKFYTDTRRSIP	177
EcFeCH	GMSYGPSLESVDELAE--HVDHIVLVPLYPQFSCSTVGAWDELARILA--RKRISIP	154
YmFeCH	GMSYGPSNLPDAIDKLLAQ--GVTKLVVPLYPQYSCSTSAAVWDAVARILK--GYRRLP	154
BsFeCH	GLKHIEPFIEDAVAEMHKD--GITEAVSIVLAPHFSTFSVQSYNKR---KEEAEKLGGL	139
ScFeCH	AFRYAKPLTAETYKQMLKD--GVKKAVAFSQYPHFSYSTTSSINELWRQIKALDSERSI	191
DmFeCH	GFRYVNLPTENTLAEIEKD--KPERVVLFVLSQYQYSCATSGSSFNIFTHYRSNNLPSDI	179
HsFeCH	GFRYVHPLTEEAIEEMERD--GLERAIAFTQYQYSCSTTSSSLNAIYRYNQVGRKPTM	219
LmFeCH	SLRTIRDYAEHPVYVEALGSSLLSSIKAHVTAKAGAARDKWSALADQLPEIGIITYHSI	237
EcFeCH	GISFIRDYADNHDYINALANSVRASFAKHG-----EPDLLLSYHGI	196
YmFeCH	SVSFIRDYAEHPTYISALKQSVERSFAQHG-----KPDRLVMSHGI	196
BsFeCH	TITSVESWYDEPKFVTYWVDRVKETYASMP-----DERENAMLIIVSAHSL	185
ScFeCH	SWSVIDRWPTNEGLIKAFSENIKKLQEFQ-----PVRDKVVLVLSAHSL	237
DmFeCH	KWSIIDRWGTHPLLIKTFQAQIRDELAKFVE-----TKRNDVVILFTAHSI	225
HsFeCH	KWSTIDRWPTHLLIQCFADHILKELDHFP-----EKRSEVVILVLSAHSL	265
LmFeCH	PVRYVEEHDYDYPQCEATTAIKAYIEAESGISLSDCLVHVYQSQF-GNQPWLGPPLNAA	296
EcFeCH	PQRYADEGDDYPQRCRTTRELASALGMA----PEKVMMTFQSRF-GREPWLMPYTDDET	250
YmFeCH	PKRYAQLGDDYPICRETSRALQAEITLP----PEQIMMITYQSRF-GREPWLTPYTDDET	250
BsFeCH	PEKIKFEGDYPDQLHESAKLIAEGAG-V----SEYAVGWQSEGNTDPPWLGPVQDDL	238
ScFeCH	PMDVVNTGDAPAEVAATVYNIMQKLKFK-----NPYRLVWQSQV-GPKPWLGAQTAE	289
DmFeCH	PLKAVNRGDAYPSEIGASVHMVMQELGQT-----NPYSLAWQSKV-GPLAWLAPATDDA	278
HsFeCH	PMSVVNRGDYPQEVSATVQKVMERLEYC-----NPYRLVWQSKV-GPMPWLGPQTDDES	318
LmFeCH	ATAFPLPPHDARKQAFSDAHRNKALLTKQATICFAMAP F AVDC V ETLSEIEREAGEVFK	356
EcFeCH	LKMLG-----EKGVGHIQVMCPG F AADCI E TLLEEIAEQNREVFL	289
YmFeCH	LKNLP-----AQGVEHIQLICPG F SADCI E TLLEEIKEQNRIFL	289
BsFeCH	TRDLFE-----QKGYQAFVYVPG F VADHI E VLVDNDYCEK-VVT	277
ScFeCH	IAEFL-----GPKVDGLMFIP I A F SDHI E TLHEIDLGVIGE--	326
DmFeCH	IKGYV-----KQGLKNFILV P I A FVNEHI E TLHELDIEYCDELA	317
HsFeCH	IKGLC-----ERGRKNILLV P I A FSDHI E TLYELDIEYSQVLA	357
LmFeCH	-QSGGKHLIYVPCLNDSPTHVKVLTSSVGA-----	385
EcFeCH	-GAGGKKYEYIPALNATPEHIEMMANLVAAYR-----	320
YmFeCH	-HAGGKKFEYIPALNDDVGHIDLLEQLVREYM-----	320
BsFeCH	DDIG-ASYRPEMPNAKPEFIDALATVVVLKGLG-----	310
ScFeCH	-SEYKDKFKRCESLNGNQTFIEGMADLVKSHL QSNQLYSNQLPLDFALGKSNDPVKDL SL	385
DmFeCH	KEVGVEEIRRAATPNHPLFIDALTNVVADHL KSQQAVNPKFLMRCPMCSNPK -RESKS	376
HsFeCH	KECGVENIRRAESLNGNPLFSKALADLVHSHI QSNELCSKQLTLSCPLCVNPV -RET K S	416
LmFeCH	-----	385
EcFeCH	-----	320
YmFeCH	-----	320
BsFeCH	-----	310
ScFeCH	VFGNHEST	393
DmFeCH	WYRQLCSN	384
HsFeCH	FFTSQQL-	423

Figura 5.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas FeCH de organismos procariotas y eucariotas. El péptido señal de direccionamiento a mitocondria presente en la región N-terminal y la secuencia involucrada en el dimerización y la formación de los clúster [2Fe-2S] presente en

la región C-terminal de las enzimas de origen eucariota se indican en negrita, resaltando en verde los cuatro residuos de cisteína conservados involucrados en la unión del clúster [2Fe-2S]. Los aminoácidos conservados en el centro activo de todas las enzimas FeCH se colorean en azul (His), naranja (Phe) y rojo (Glu). También se indican los aminoácidos idénticos (*), aminoácidos con propiedades muy similares (:) y aminoácidos con propiedades poco similares (.). El alineamiento fue realizado mediante el software Clustal Omega.

Para analizar si los residuos conservados podrían tener una función similar a las descritas previamente en otros organismos, se obtuvo la estructura 3D de la proteína LmFeCH mediante un modelado por homología a partir del cristal de la proteína homóloga de *B. subtilis*, utilizando el servidor SWISS-MODEL. Observamos que los 3 aminoácidos conservados se encuentran aparentemente posicionados en la hendidura de unión al anillo de porfirina (Figura 5.4), de manera similar a lo reportado para las enzimas humana y de *B. subtilis* (168,299), sugiriendo que los residuos His235 (azul), Phe336 (naranja) y Glu342 (rojo) en LmFeCH podrían facilitar la inserción del ión ferroso en el precursor PPIX y por lo tanto, ser críticos para la actividad enzimática.

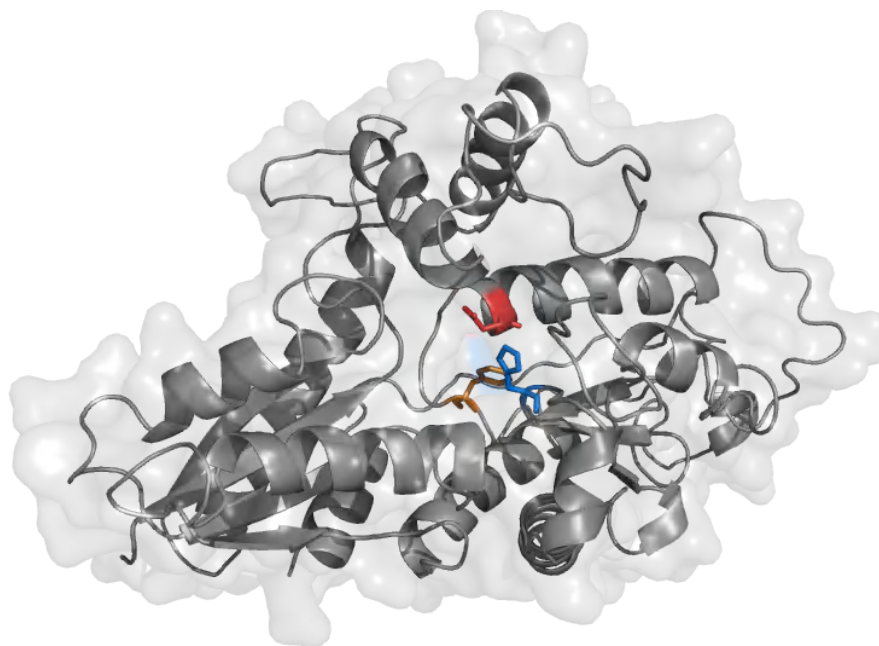


Figura 5.4. Modelo estructural de la proteína LmFeCH. Se utilizó el servidor SWISS-MODEL para generar el modelo de la proteína LmFeCH con base en la estructura cristalográfica de la proteína de *B. subtilis* descrita en PDB (1AK1). Se observan los residuos conservados de histidina (azul), fenilalanina (naranja) y ácido glutámico (rojo), posiblemente localizados en el sitio activo de la proteína..

2. El gen *lmfech* codifica una proteína ferroquelatasa funcional

Para evaluar la actividad enzimática de la LmFeCH se realizó un ensayo de complementación funcional utilizando las bacterias de *E. coli* auxótrofas para hemo VS200, que carecen del gen que codifica para la FeCH (*HemH*) (282). En primer lugar, las bacterias VS200 se transformaron en bacterias lisogénicas para el fago λ DE3, el cual expresa el gen de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lac UV5 permitiendo la expresión de los genes clonados en el vector pET21b. La lisogenización de las bacterias se confirmó mediante Western blot para la determinar la expresión de la T7 ARN polimerasa (Figura 5.5A) y mediante la infección con un fago comprobador T7, que conduce a la generación de halos lisogénicos en medio de cultivo LB suplementado con el inductor IPTG (Figura 5.5B). Adicionalmente, las bacterias lisogénicas para el fago λ DE3 fueron transformadas con un plásmido control conteniendo un gen que codifica para una proteína de ~30 kDa (Figura 5.5C).

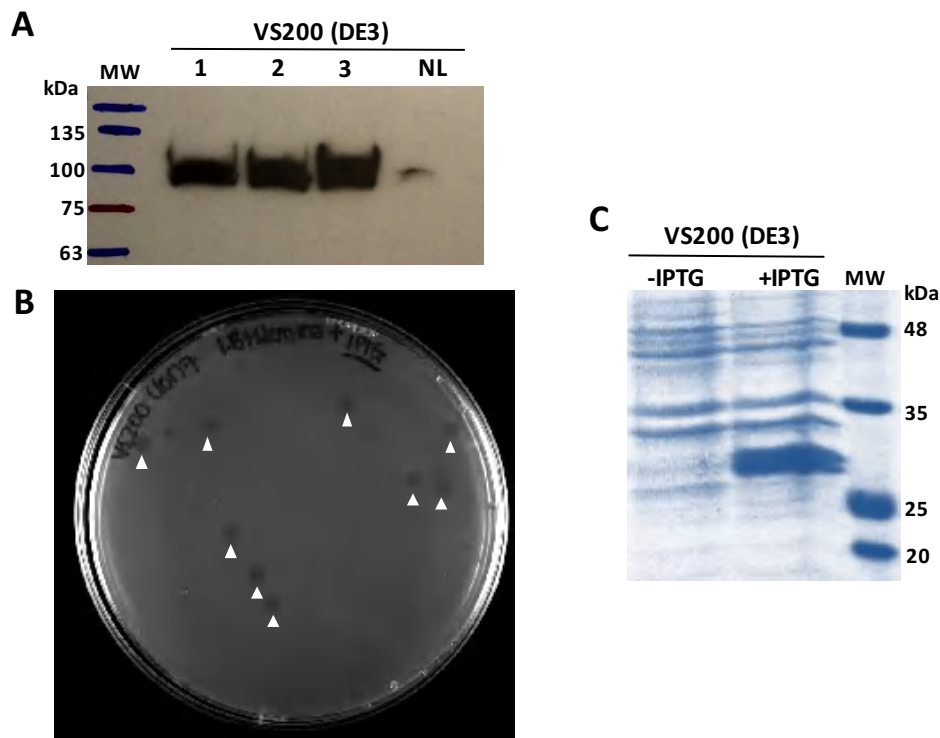


Figura 5.5. Confirmación de la lisogenización de las bacterias de *E. coli* auxótrofas para hemo VS200.

A) Tres clones de bacterias VS200 lisogénicas en fase logarítmica fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con 20 μ g/mL de hemina y 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37 $^{\circ}$ C para inducir la expresión de T7 ARN polimerasa, la cual fue detectada mediante Western blot tal como se describe en el apartado 3.2.3 de materiales y métodos. NL: control de bacterias VS200 no lisogénicas. B) Las bacterias lisogénicas VS200 (DE3) fueron cultivadas en medio LB sólido conteniendo 20 μ g/mL de hemina y 0.4 mM de IPTG a temperatura ambiente durante 16 horas para determinar la formación de halos lisogénicos. C) Las

bacterias lisogénicas VS200 (DE3) transformadas con el plásmido control conteniendo un gen que codifica para una proteína de ~30 kDa, fueron inducidas o no con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C y la expresión de la proteína fue determinada mediante SDS-PAGE.

Las bacterias VS200 (DE3) fueron transformadas con el vector vacío pET21b o con el vector pET21b-LmFeCH conteniendo el gen *fech* de *L. major*. Tal como esperábamos, las bacterias VS200 (DE3) transformadas con el plásmido vacío no son capaces de crecer en medio LB a menos de que sea suplementado con una fuente de hemo (Figura 5.6A izquierda). Sin embargo, este defecto en el crecimiento fue recuperado mediante la expresión heteróloga del gen *lmfech*, indicando que la proteína LmFeCH de *L. major* complementa la ausencia del gen *HemH* en la cepa VS200(DE3) de *E. coli* (Figura 5.6A derecha).

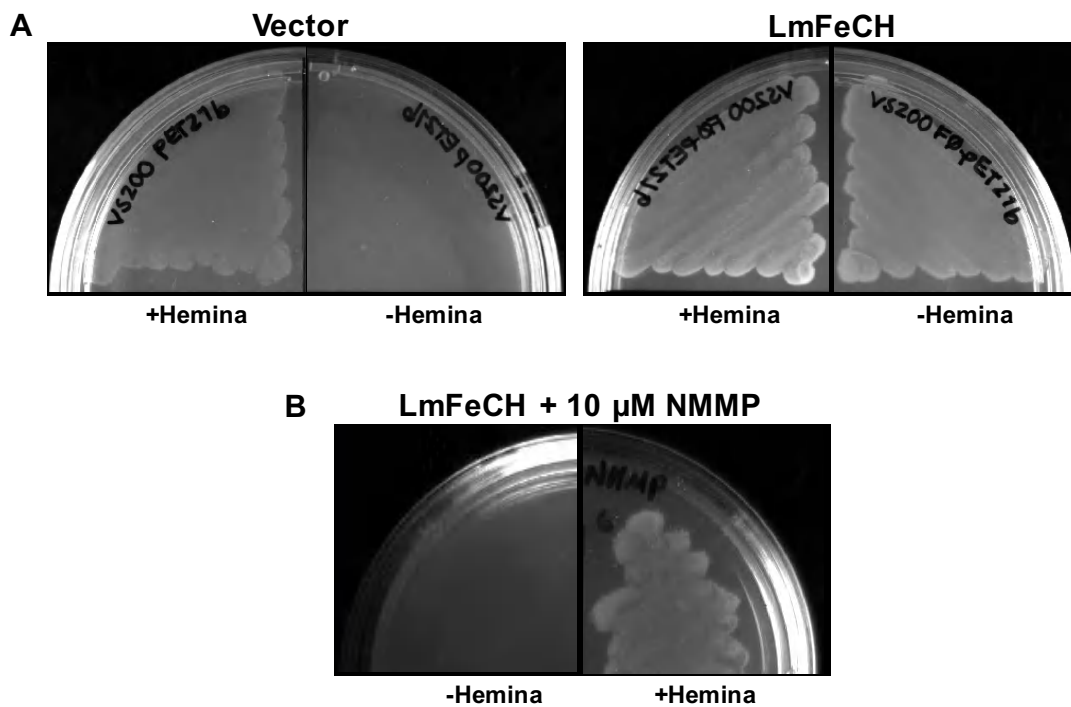


Figura 5.6. La LmFeCH es una enzima funcional. Las imágenes muestran el crecimiento de las bacterias $\Delta hemH$ transformadas con el vector vacío como control (izquierda) o con el vector conteniendo el gen *lmfech* (centro y derecha) en placas de medio LB sólido suplementadas (+) o no (-) con 20 $\mu\text{g/mL}$ de hemo. También se evaluó el crecimiento de las bacterias en placas suplementadas con 10 μM del inhibidor NMMP (derecha).

Adicionalmente, el crecimiento de las bacterias VS200 (DE3) complementadas con el gen *lmfech* fue inhibida con 10 μ M de N-metil-mesoporfirina (NMMP), un análogo de transición que inhibe potencialmente todas las enzimas FeCH. La toxicidad de la NMMP fue revertida tras la adición de hemina al medio de cultivo, indicando que el efecto inhibitorio de dicho compuesto es específico para la enzima LmFeCH (Figura 5.6B).

Estos resultados indican que el gen *lmfech* de *L. major* codifica una enzima FeCH funcionalmente activa, capaz de revertir la auxotrofia para hemo en las bacterias mutantes VS200 (DE3).

3. La enzima FeCH de *L. major* está localizada en la mitocondria del parásito

En los organismos eucariotas la FeCH es una enzima mitocondrial. Sin embargo, como se indicó anteriormente, la LmFeCH carece de un péptido de localización mitocondrial y tampoco contiene en su región N-terminal el motivo (M/L)RR seguido de una región hidrofóbica rica en Ala, Leu y Val, que se ha propuesto necesaria para el reconocimiento y la importación mitocondrial de proteínas en parásitos tripanosomátidos (300). El análisis teórico realizado con el software MitoProII (301) igualmente sugiere la no localización mitocondrial de la proteína LmFeCH.

Para determinar la localización celular de la proteína, se creó una quimera de la proteína fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo C-terminal, utilizando el plásmido de expresión pXG-GFP+. Mediante microscopia confocal se observó que la LmFeCH co-localiza completamente con el marcador mitocondrial MitoTracker Red, mostrando un índice de Pearson de 0.82 ± 0.02 (Figura 5.7).

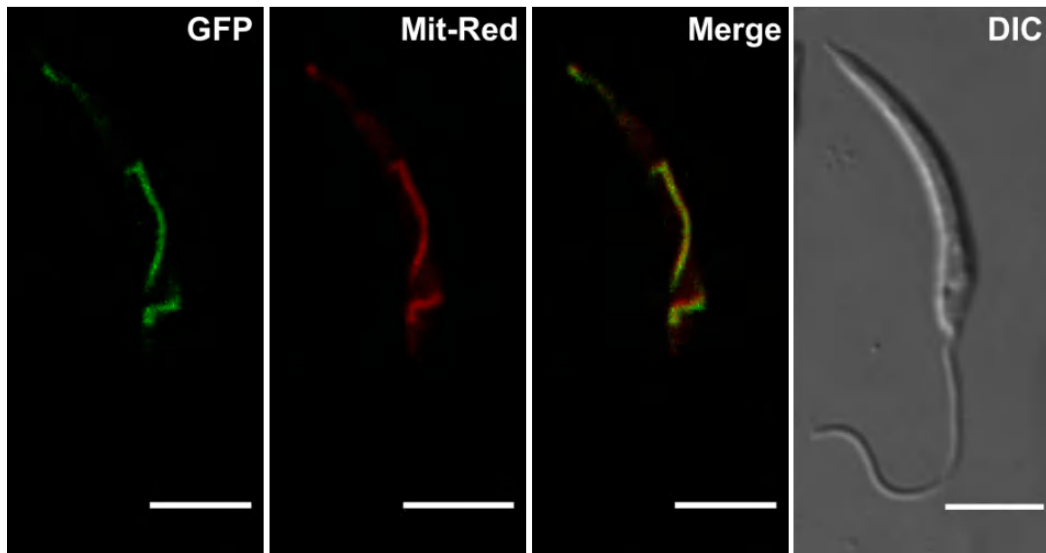


Figura 5.7. Localización subcelular de LmFeCH-GFP. Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron incubados con 50 nM del marcador mitocondrial MitoTracker Deep Red (Mit-Red) a 28 °C durante 30 minutos, y posteriormente fueron visualizados mediante microscopia de fluorescencia para determinar la co-localización de ambos marcajes (Merge). La imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) se observa a la derecha. Barra de escala: 5 μ m. Imagen representativa de promastigotes de *L. major* que expresan la proteína fluorescente LmFeCH-GFP.

Para confirmar que este resultado no era producto de la sobre-expresión de la proteína, se evaluó la localización de la LmFeCH mediante marcaje endógeno con la proteína fluorescente mNeonGreen en el extremo C-terminal, utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 descrita en el Anexo 2. Para ello, la línea de *L. major* Cas9/T7 fue co-transfectada con un ADN donador conteniendo la proteína mNeonGreen y el cassette de resistencia a puromicina flanqueado por regiones de homología de 30 nucleótidos específicas del gen *lmfech*, y un molde de ADN para la transcripción *in vivo* del ARNg dirigido a la secuencia inmediatamente corriente abajo del codón de parada de la proteína LmFeCH (Figura 5.8A). Los parásitos transfectados fueron seleccionados con 30 μ g/mL de puromicina durante una semana y posteriormente fueron observados mediante microscopia de fluorescencia. De manera similar a lo observado previamente con la quimera LmFeCH-GFP, la proteína LmFeCH-mNeonGreen co-localiza con el marcador mitocondrial MitoTracker Red, con un índice de Pearson de 0.89 ± 0.002 (Figura 5.8B).

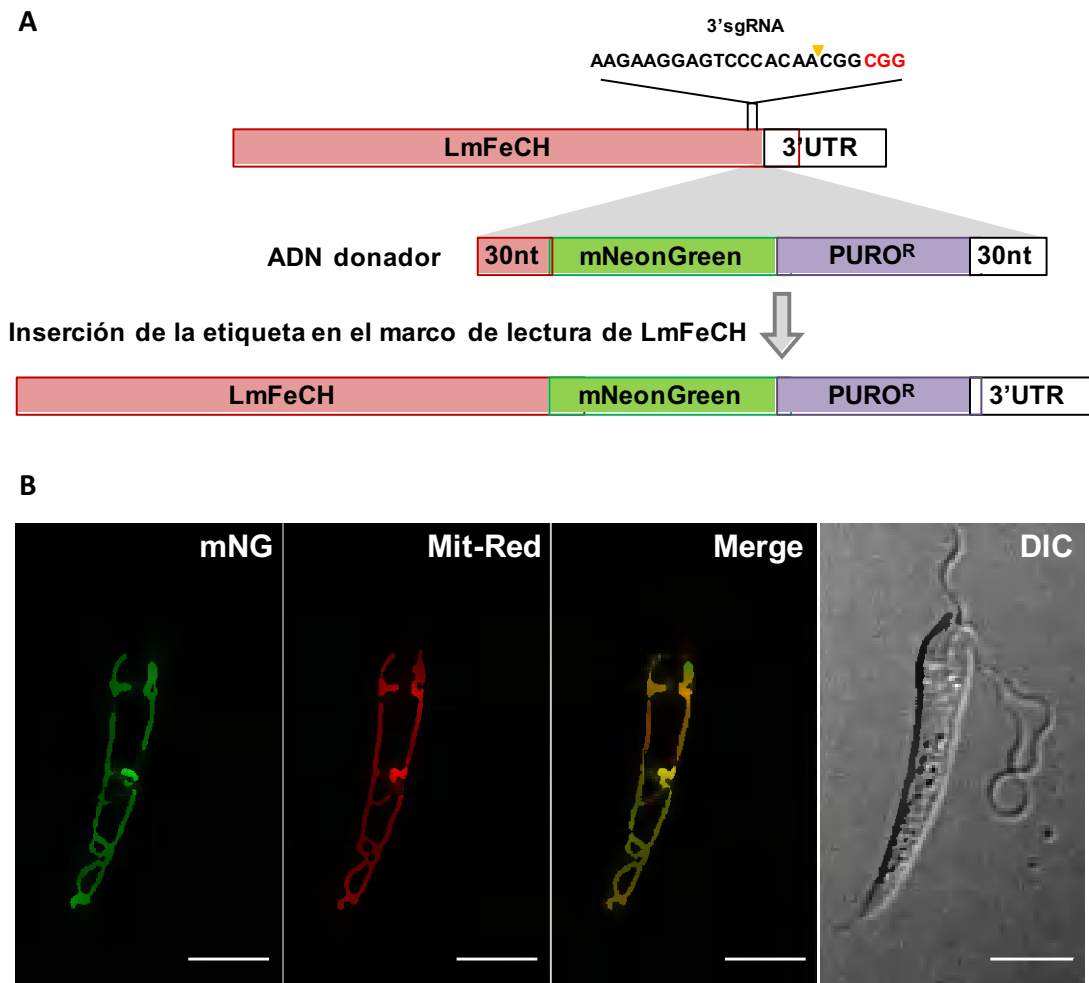


Figura 5.8. Localización subcelular de LmFeCH-mNeonGreen. A) Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 empleada para el marcaje *in situ* de la proteína LmFeCH en su extremo C-terminal. El ARNg hibrida cerca del codón de parada de la LmFeCH indicando el punto de ruptura de la doble cadena mediado por la proteína Cas9 (punta de flecha amarilla), tras lo cual el ADN es reparado por recombinación homóloga utilizando el ADN donador que contiene la proteína fluorescente. B) Los promastigotes de *L. major* expresando el gen *fech* marcado endógenamente con mNeonGreen (mNG) fueron crecidos hasta fase logarítmica e incubados con 50 nM del marcador mitocondrial MitoTracker Deep Red (Mit-Red) a 28 °C durante 30 minutos. Los parásitos fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia para determinar la co-localización de ambos marcajes (Merge). La imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) se observa a la derecha. La figura muestra un parásito representativo de una población total con un patrón de fluorescencia similar. Barra de escala: 5 μ m.

En conjunto, estos resultados indican que la enzima FeCH de *L. major* se localiza en la mitocondria del parásito, de manera similar a sus contrapartes eucariotas a pesar de no tener un péptido señal mitocondrial. Esto sugiere que el último paso de la biosíntesis de hemo en los parásitos es llevado a cabo en la mitocondria.

4. Generación de parásitos de *L. major* mutantes nulos para el gen *lmfech*

Inicialmente se utilizó la estrategia clásica de recombinación homóloga para la obtención de los parásitos mutantes nulos, mediante la transfección de promastigotes de *L. major* con un ADN lineal conteniendo el gen de resistencia a higromicina flanqueado por secuencias de 931 pb y 901 pb de las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *lmfech*, respectivamente (Figura 5.9A). Tras múltiples intentos solo fue posible obtener poblaciones de parásitos heterocigotos en los que solo un alelo del gen era reemplazado por el cassette de resistencia al fármaco (Figura 5.9B), inclusive después de un segundo evento de transfección utilizando un cassette de resistencia a otro medicamento. Dado que los parásitos eran crecidos en medio de cultivo suplementado con SFB como fuente de hemo, era improbable que el gen *lmfech* fuera esencial para los parásitos, o al menos, en el estadio de promastigote.

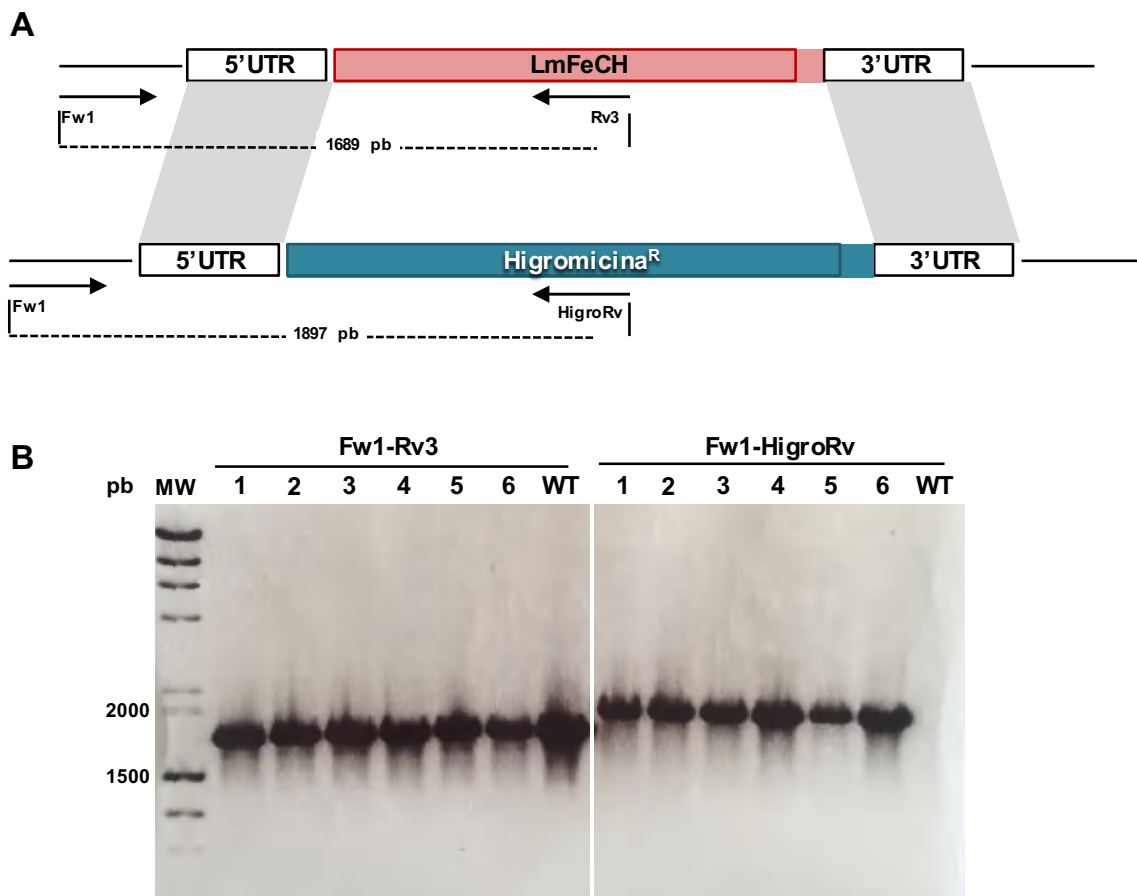


Figura 5.9. Representación esquemática de la estrategia clásica de recombinación homóloga utilizada para la generación de los parásitos *LmFeCH*^{-/-}. El gen *lmfech* es reemplazado por el cassette de resistencia a higromicina mediante recombinación homóloga espontánea utilizando los brazos de homología de aproximadamente 1 kb correspondientes a las regiones 5'UTR y 3'UTR del locus. Se indican

los oligonucleótidos utilizados para verificar el correcto reemplazamiento génico y los tamaños esperados de los productos amplificados por PCR.

Por lo tanto, para la obtención de parásitos doble KO para la proteína LmFeCH se decidió utilizar la estrategia CRISPR-Cas9, descrita por primera vez en *Leishmania* en el año 2015 por el laboratorio de Yvon Sterkers durante el transcurso del trabajo de esta tesis (284), y la cual fue implementada en nuestro laboratorio (Anexo 2). Para ello se utilizó un solo ARNg dirigido a la secuencia codificante del gen *lmfech* y un cassette de resistencia Puro^R en el que el gen *puro* se encuentra flanqueado por fragmentos de las regiones no codificantes (UTR) del gen *lmfech* (Figura 5.10).

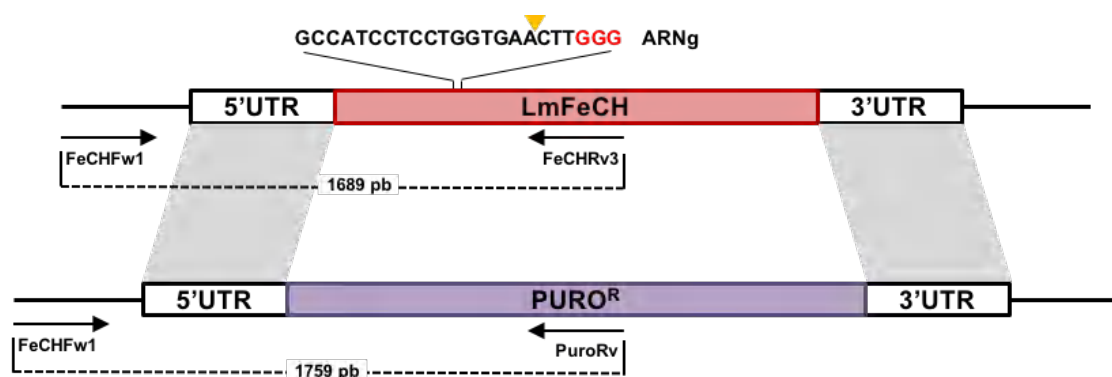


Figura 5.10. Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 utilizada para la generación de los parásitos *LmFeCH*^{-/-}. Se utilizó un solo ARNg dirigido a la secuencia codificante del gen *fech* para generar la ruptura de la doble cadena de ADN (punta de flecha amarilla), la cual es reparada mediante recombinación homóloga utilizando como molde el plásmido pLS7-FeCH conteniendo el cassette de resistencia a puromicina flanqueado por regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *fech*. Se indican en la figura los oligonucleótidos utilizados para la confirmación por PCR y los fragmentos esperados en cada caso.

En primer lugar, como se muestra en la figura 5.11, se generó el plásmido pLS7-FeCH conteniendo la secuencia del ARNg específica del gen *lmfech* para su transcripción *in vivo*, y un cassette de resistencia a puromicina flanqueado por dos brazos de homología de 874 pb y 706 pb, correspondientes a las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *lmfech*, respectivamente.

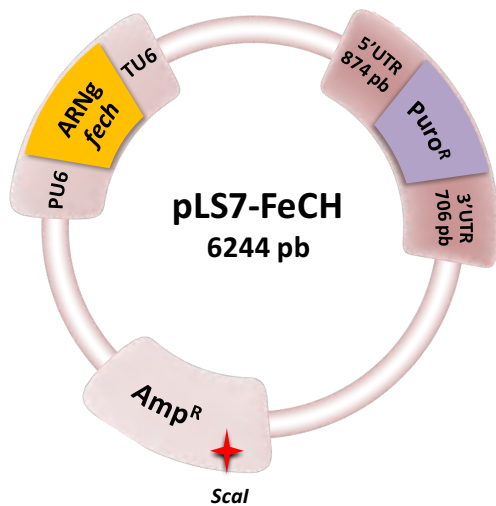


Figura 5.11. Plásmido pLS7-FeCH. El plásmido contiene el cassette de resistencia a puromicina (Puro^R) flanqueado por brazos de homología específicas de las regiones 5'UTR y 3'UTR gen *lmfech*, el cassette de expresión para el ARNg (amarillo) bajo el control del promotor U6snRNA y un sitio de restricción *ScaI* (rojo) localizado en el gen de resistencia a ampicilina (Amp^R) para la linealización del plásmido.

Los promastigotes de *L. major* expresando la proteína Cas9 fueron transfectados con 10 µg plásmido pLS7-FeCH circular, teniendo en cuenta la baja eficiencia obtenida con el plásmido linealizado en la generación de los parásitos LmCPOX^{-/-}. Los transfectantes fueron seleccionados con 30 µg/mL de puromicina durante 7 días, y posteriormente fueron diluidos en placas de 96 pocillos conteniendo medio de cultivo líquido suplementado con fármaco de selección para la generación de líneas clonales. Una vez obtenidos clones independientes, se extrajo ADN genómico para evaluar la correcta delección del gen *fech* y la integración del cassette de resistencia a puromicina mediante PCR. Para ello se utilizó el oligonucleótido sentido común FeCHFw1 que hibrida corriente arriba de la región 5'UTR incluida en el brazo de homología y los oligonucleótidos antisentido FeCHRv3 y PuroRv que hibridan específicamente en la secuencia del gen *fech* y el cassette de resistencia a puromicina, respectivamente (Figura 5.10).

Se evaluaron por PCR un total de 62 clones resistentes a puromicina, los cuales amplificaron los fragmentos de 1689 pb y 1759 pb específicos para el gen *fech* y el cassette de resistencia a puromicina, respectivamente, indicando que sólo uno de los alelos había sido delecionado y reemplazado por el cassette de resistencia (Figura 5.12A). Sin embargo, en uno de los clones (carril 2) se observó una menor amplificación del producto de la PCR específico del gen *fech*, sugiriendo que podría tratarse de una población heterogénea y por lo tanto se decidió subclonar esta población de parásitos en medio RPMI modificado sólido en presencia del fármaco de selección (Figura 5.12A). Tras 7-10 días de incubación se observó la aparición de colonias, de las cuales 19 fueron

transferidas a medio líquido para extracción de ADN genómico y evaluación por PCR. Doce de los 19 clones mostraron amplificación solo con el par de oligonucleótidos específicos para puromicina, indicando la delección de ambos alelos del gen *fech* en estos parásitos. Se seleccionó aleatoriamente uno de estos clones para continuar con los experimentos, el cual fue denominado LmFeCH^{-/-} (Figura 5.12B).

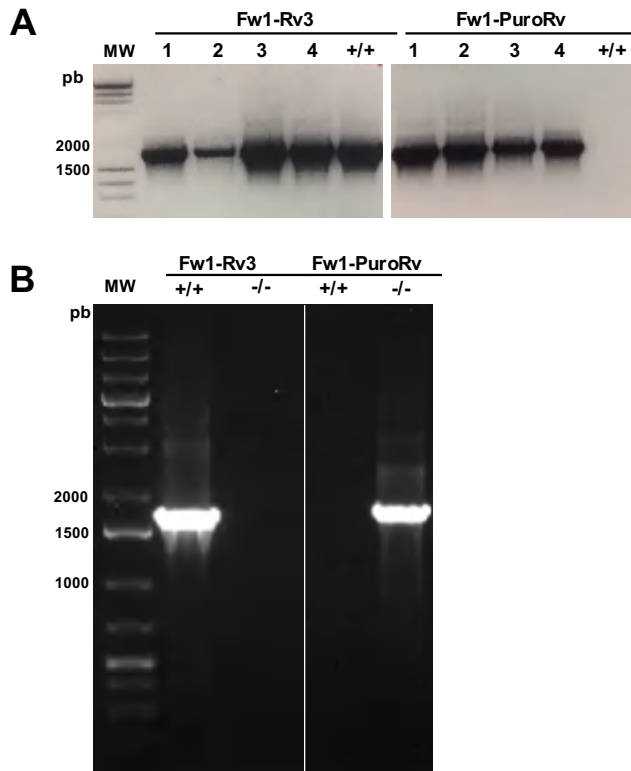


Figura 5.12. Generación de promastigotes de *L. major* mutantes nulos para el gen *fech*. Análisis de genotipo mediante PCR del locus *lmfech* usando los oligonucleótidos Fw1-Rv3 y Fw1-PuroRv específicos de gen y cassette de resistencia a puromicina, respectivamente. A) La amplificación de ambos fragmentos indica el reemplazamiento de un solo alelo por el cassette de resistencia; carriles 1-4, clones obtenidos tras la selección con puromicina y carril +/+ (control Cas9). B) Amplificación de fragmento de 1689 pb específico de gen en los parásitos control (+/+) y fragmento de 1759 pb específico de cassette puromicina en la línea LmFeCH^{-/-} (-/-) indicando la delección de ambos alelos del gen *fech*.

Posteriormente, se confirmó la delección del locus *lmfech* mediante Southern blot y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en el clon LmFeCH^{-/-} seleccionado. Para el análisis por Southern blot, el ADN genómico de los parásitos control (Cas9) y LmFeCH^{-/-} fue digerido con las enzimas de restricción *SnaBI* y *Sall*, las cuales cortan específicamente dentro de la secuencia del gen *fech* y puromicina respectivamente (Figura 5.13A). Los fragmentos del ADN genómico digeridos fueron hibridados con sondas específicas para la región 5'UTR y la secuencia codificante del gen *fech*. Como se observa en la figura 5.13B, la sonda específica para gen reconoció una banda de 2.4 kb en el ADN genómico digerido con *SnaBI* solo en los parásitos controles (Cas9), mientras que una banda de 2.5 kb del ADN genómico digerido con *Sall* fue reconocida por la sonda

de la región 5'UTR en los parásitos LmFeCH^{-/-} como resultado de la integración del cassette de puromicina en el locus correcto.

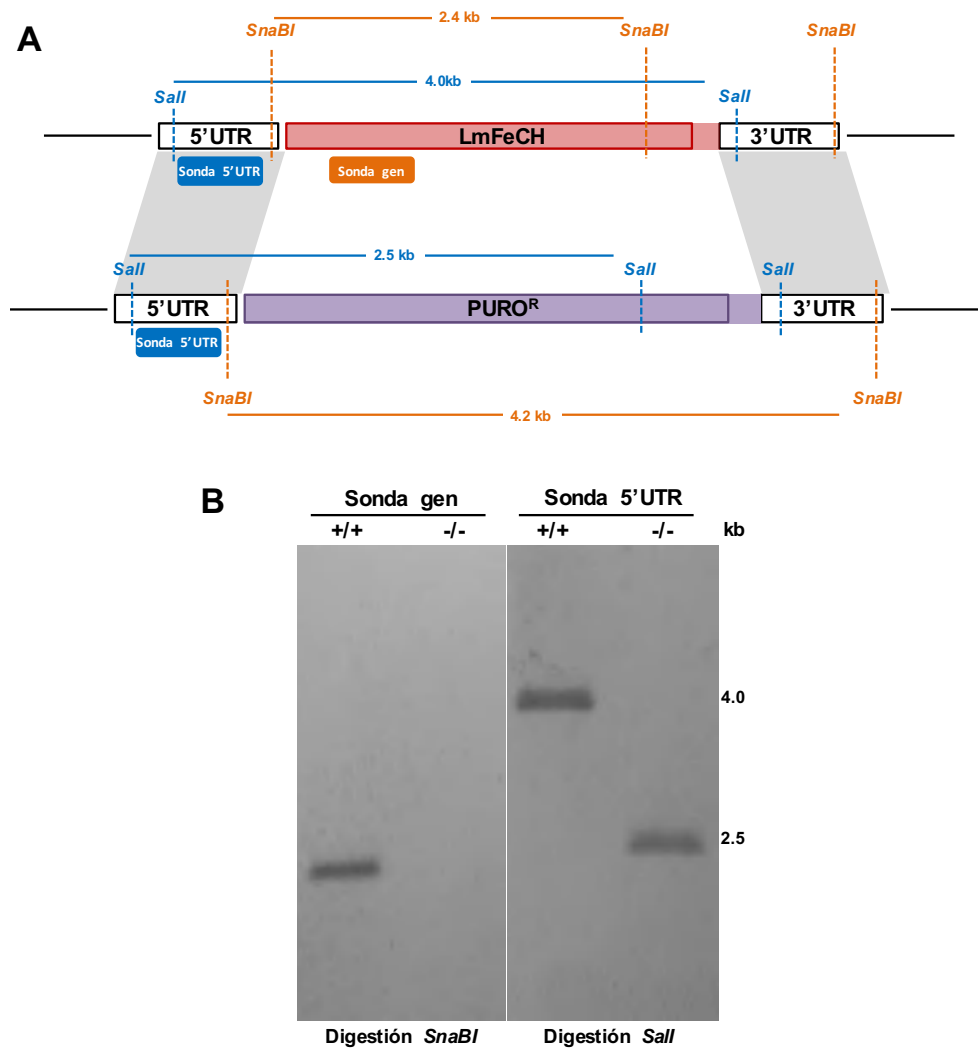


Figura 5.13. Confirmación de la delección de ambos alelos del gen *fech* en los parásitos LmFeCH^{-/-} mediante Southern blot. A) Representación esquemática de los sitios de restricción para las enzimas *SnaBI* y *Sall* en el locus *fech* de los parásitos control (arriba) y mutantes LmFeCH^{-/-} (abajo), los sitios de hibridación de las sondas específicas para la región 5'UTR y la región codificante del gen *fech* y los tamaños de las bandas esperados en cada caso. B) La detección de una banda de 2.4 kb con la sonda específica de gen solo en los parásitos control (+/+) y el reconocimiento de una banda de 2.5 kb con la sonda de la región 5'UTR en los parásitos doble KO (-/-), confirma la correcta sustitución de ambos alelos del gen *fech* por cassette de resistencia a puromicina.

Finalmente, el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) mostró que el gen *fech* es expresado en el estadio de promastigotes y que el ARNm de este gen

no es detectable en los parásitos LmFeCH^{-/-} (Figura 5.14). Este resultado confirma la delección de ambos alelos del gen *fech* en los parásitos LmFeCH^{-/-}.

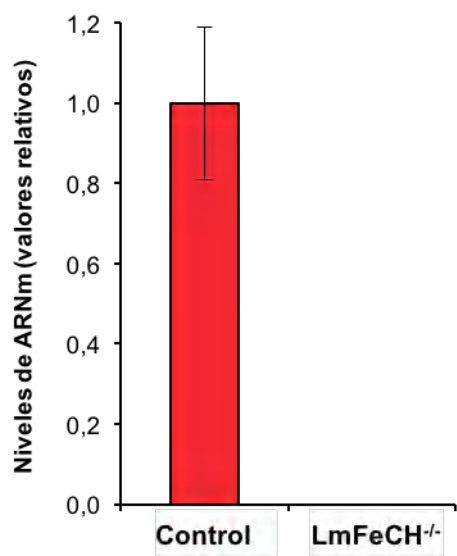


Figura 5.14. La línea LmFeCH^{-/-} no presenta niveles detectables de ARNm para la proteína LmFeCH. Análisis de la expresión del gen *fech* en promastigotes de *L. major* control (Cas9) y doble KO (LmFeCH^{-/-}) mediante RT-qPCR utilizando ARNm total aislado de cada una de las líneas.

5. Efecto de los niveles de LmFeCH en el crecimiento de las formas promastigote y amastigote de *L. major*

La generación de parásitos doble KO para el gen *fech* en una sola ronda de transfección utilizando la estrategia CRISPR-Cas9 indica que proteína LmFeCH no es esencial para la supervivencia del parásito en el estadio de promastigote, al menos *in vitro*, donde el medio de cultivo suplementado con SFB les proporciona una fuente de hemo exógeno.

Para evaluar el efecto de la delección del gen *fech* en *L. major* y confirmar que los cambios en el crecimiento y/o desarrollo de los parásitos es debido a la ausencia de la proteína FeCH, los parásitos LmFeCH^{-/-} fueron transfectados con una copia episomal del gen contenida en el plásmido de expresión para *Leishmania* pXGNEO. El plásmido pXGNEO-FeCH, cuya construcción se detalla en el apartado 3.7.5.1 de materiales y métodos, fue mutado en el motivo PAM (GGG) adyacente a la secuencia del ARNg utilizada en la generación de la línea LmFeCH^{-/-}, con el fin de evitar el reconocimiento del plásmido conteniendo la copia episomal del gen por la nucleasa Cas9. Para ello, mediante mutagénesis dirigida, el triplete de nucleótidos GGC (Gly) fue reemplazado por el triplete GCT (Ala). La línea resultante de la transfección con dicho plásmido mutado se denominó LmFeCH^{-/-} + FeCH.

Como se observa en la figura 5.15, los parásitos $LmFeCH^{-/-}$ y $LmFeCH^{-/-} + FeCH$ crecen de manera similar a los parásitos control (Cas9), alcanzando la fase estacionaria en el mismo tiempo y con una densidad parasitaria similar. Esto indica que los niveles de expresión de la proteína FeCH no alteran el crecimiento de los promastigotes de *L. major* en cultivos *in vitro*.

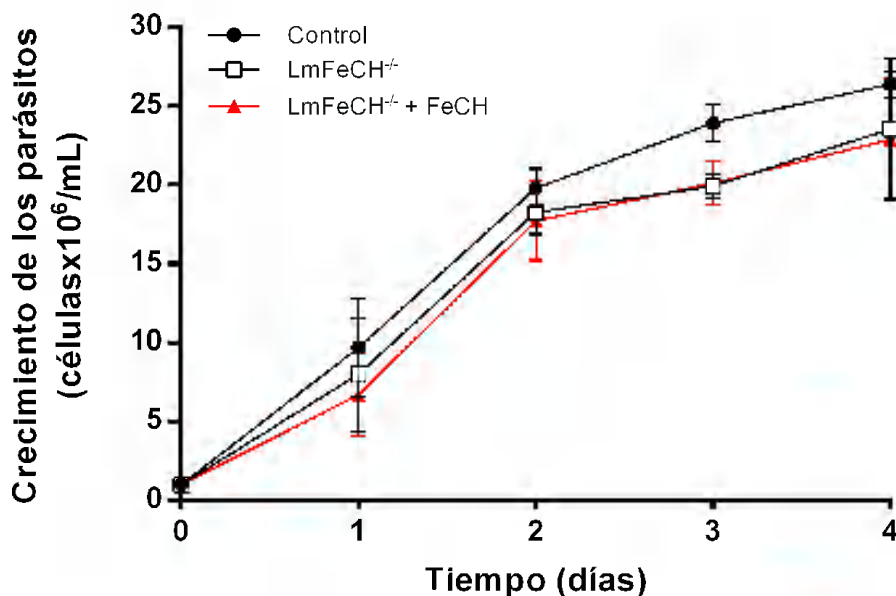


Figura 5.15. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de la proteína FeCH. Los promastigotes control (Cas9), doble KO ($LmFeCH^{-/-}$) y doble KO complementados con una copia episomal del gen ($LmFeCH^{-/-} + FeCH$) fueron ajustados a una concentración inicial de 10^6 parásitos/mL en medio de cultivo suplementado con 10% SFB, y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 4 días. Los experimentos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Sin embargo, la $LmFeCH$ es esencial para el crecimiento de los parásitos cuando el SFB es reemplazado por el precursor PPIX. Como se observa en la figura 5.16A, los parásitos control ($LmFeCH^{+/+}$) depletados de hemo crecen normalmente en un medio de cultivo suplementado con 20% de SFBf y 10 μ M de PPIX. En contraste, los parásitos de la línea $LmFeCH^{-/-}$ son incapaces de crecer en presencia del precursor PPIX, a menos de que los parásitos sean complementados con una copia episomal del gen *fech* (Figura 5.16A). Como control del experimento, los parásitos depletados de hemo fueron crecidos en medio de cultivo suplementado con 20% de SFBf y 10 μ M de hemina, observando un crecimiento similar en todas las líneas evaluadas (Figura 5.16B). Estos resultados indican

que la proteína FeCH se expresa de manera funcional en los promastigotes de *L. major*, y que utiliza el precursor PPIX para la formación de hemo.

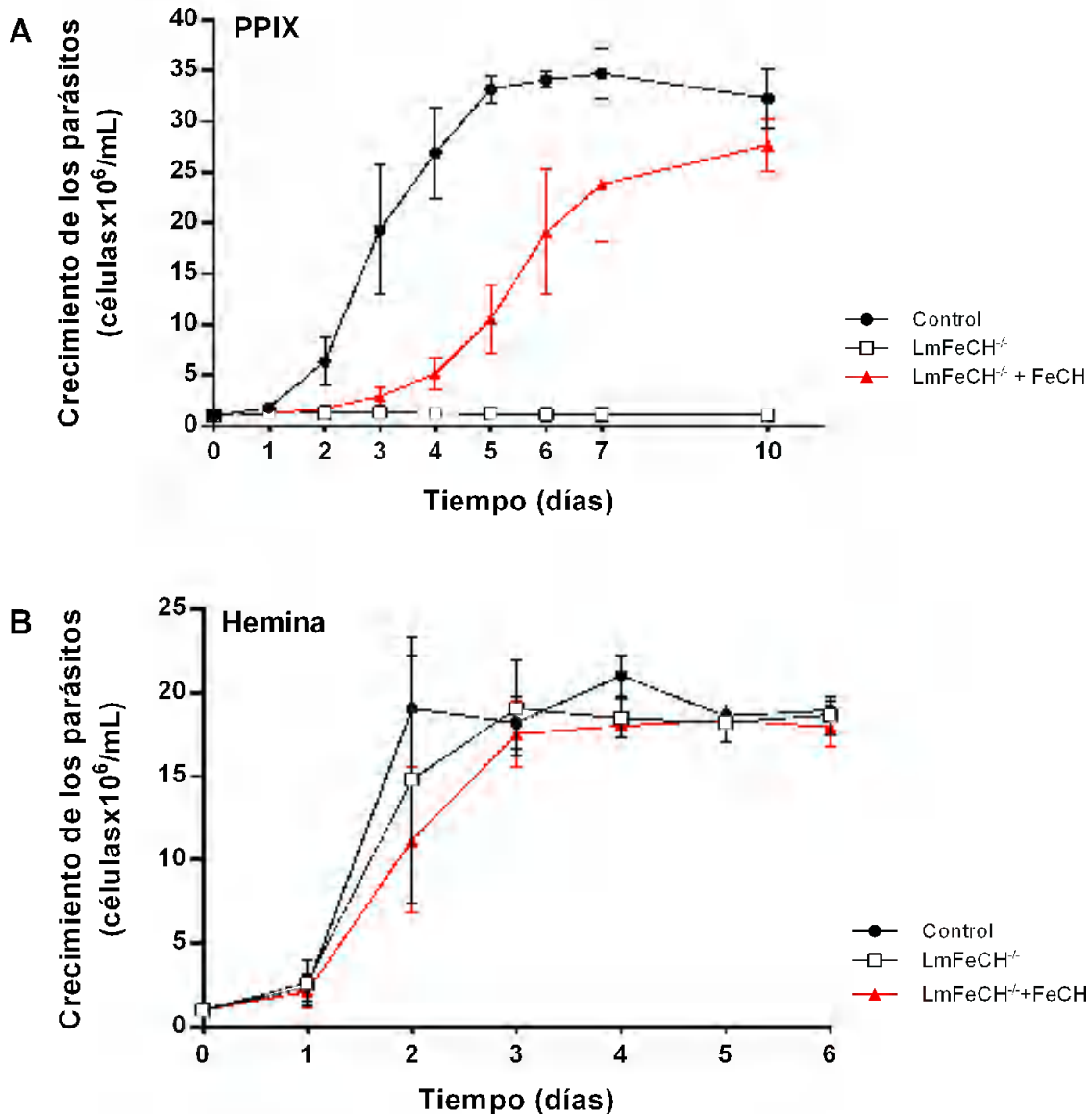


Figura 5.16. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* depletados de hemo en presencia de PPIX (A) o hemina (B). Los promastigotes control (Cas9), doble KO (LmFeCH^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmFeCH^{-/-} + FeCH) fueron depletados de hemo durante 48 horas y crecidos en medio de cultivo suplementado con 20% SFBf y PPIX o hemina como fuente de porfirinas. Los promastigotes fueron ajustados a una concentración inicial de 10⁶ parásitos/mL y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante el tiempo indicado. Los experimentos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Para determinar la importancia del gen *fech* en el estadio de amastigote, se evaluó la habilidad de los parásitos LmFeCH^{-/-} de infectar y replicarse intracelularmente en los macrófagos. Para ello, los macrófagos THP1 fueron infectados con promastigotes en fase estacionaria de las líneas control (Cas9), LmFeCH^{-/-} y LmFeCH^{-/-} + FeCH, depletados de hemo durante 72 horas antes de la infección, ya que como se observó previamente en la figura 2.4 los amastigotes son capaces de replicarse en ausencia de precursores de porfirinas del macrófago, debido a que almacenan hemo intracelular que les permite sobrevivir durante los 5 días de infección.

Mediante microscopia de fluorescencia de las células infectadas teñidas con DAPI, se determinó el número de amastigotes intracelulares por 100 macrófagos a las 24 y 120 horas tras la infección. No se observaron diferencias entre las diferentes líneas evaluadas después de 24 horas de infección (Figura 5.17), lo que indica que los niveles de expresión de LmFeCH no afectan la capacidad de infección de los promastigotes de *L. major*. Por el contrario, el número de amastigotes por macrófagos aumento un 69% (p<0.05) en la línea control (Cas9) tras 120 horas de infección, mientras que este valor fue invariable en los macrófagos infectados con los parásitos LmFeCH^{-/-}, lo que sugiere que la proteína LmFeCH juega un papel importante en la replicación intracelular de los amastigotes (Figura 5.17).

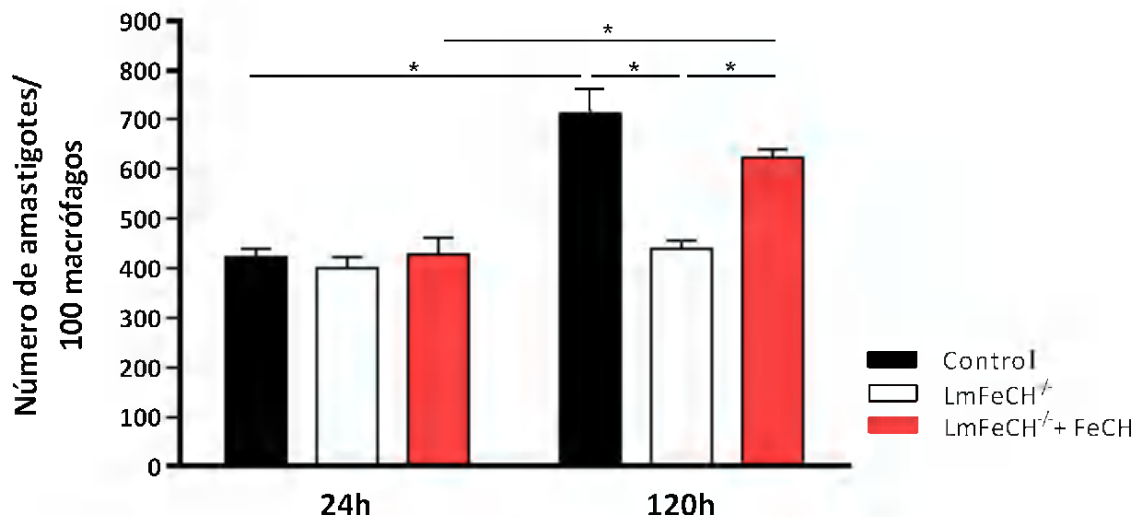


Figura 5.17. La ausencia de la proteína LmFeCH altera la replicación intracelular de los amastigotes de *L. major* en ensayos de infección *in vitro*. Los macrófagos THP1 fueron infectados durante 24 horas con promastigotes en fase estacionaria de las líneas control (Cas9), doble KO (LmFeCH^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmFeCH^{-/-} + FeCH), previamente depletados de hemo. Tras lavar los parásitos no internalizados, las células infectadas fueron fijadas y teñidas con DAPI para su visualización mediante microscopia de fluorescencia. Se representa el número de amastigotes intracelulares

por cada 100 macrófagos, contados mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ. Los experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (*, $p < 0.05$).

El rescate funcional de los parásitos KO con una copia episomal del gen, lleva a un aumento del 46% ($p < 0.05$) en el número de amastigotes intracelulares después de 120 horas de infección, lo que sugiere que la proteína FeCH de *L. major* confiere una ventaja en la supervivencia del estadio intracelular del parásito, permitiéndoles sintetizar su propio hemo a partir de precursores de porfirinas del macrófago dentro de la vacuola parasitófora (Figura 5.17).

6. Virulencia de los parásitos *LmFeCH*^{-/-} en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.

Inicialmente evaluamos mediante una aproximación *in vitro* si la ausencia de la proteína FeCH en *L. major* podría tener algún efecto en el desarrollo de las formas metacíclicas infectivas de los promastigotes, utilizadas para la infección de los ratones. Para ello, se purificaron promastigotes metacíclicos utilizando el método de selección negativa mediante aglutinina de cacahuete (PNA) descrito en el apartado 3.1.4 de materiales y métodos. No observamos diferencias significativas en el porcentaje de promastigotes metacíclicos purificados de las líneas control (Cas9), *LmFeCH*^{-/-} y *LmFeCH*^{-/-} + FeCH, ni cambios morfológicos evidentes de los cultivos en fase estacionaria de crecimiento, sugiriendo que la ausencia de proteína FeCH no altera la transformación de los promastigotes hacia la fase infectiva, al menos, en promastigotes axénicos en cultivo (Figura 5.18).

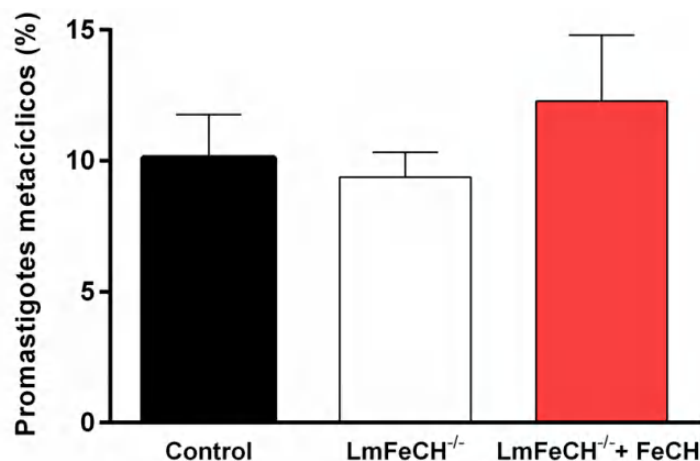


Figura 5.18. Porcentaje de promastigotes PNA negativos obtenidos de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (7 días) de las líneas control (Cas9), doble KO (LmFeCH^{-/-}) y complementados con una copia episomal del gen (LmFeCH^{-/-} + FeCH). Los experimentos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

A continuación decidimos evaluar la capacidad de dichos parásitos para infectar y establecer enfermedad en un modelo experimental de leishmaniosis cutánea. Para ello, se infectaron ratones Balb/c subcutáneamente en la almohadilla plantar con 10⁴ promastigotes metacíclicos de las líneas Cas9, LmFeCH^{-/-} y LmFeCH^{-/-} + FeCH, y la inflamación de ambas patas (infectada y no infectada) fue monitoreada semanalmente como indicador de la progresión de la enfermedad. Los animales fueron sacrificados a la semana 8 post-infección y se determinó la carga parasitaria de las patas infectadas y el nódulo linfático drenante (poplíteo) mediante el método de dilución limitante. Todos los grupos de ratones infectados mostraron una progresión de la enfermedad similar, caracterizada por una reacción inflamatoria progresiva y lesiones no cicatrizantes en la almohadilla plantar de las patas infectadas (Figura 5.19A). Además, no se observaron diferencias en las cargas parasitarias de las patas infectadas entre los 3 grupos de animales infectados con las líneas Cas9, LmFeCH^{-/-} y LmFeCH^{-/-} + FeCH (Figura 5.19B). Estos resultados sugieren que el gen *lmfech* no es requerido para la virulencia de los amastigotes de *L. major*.

Mientras que el modelo murino de leishmaniosis cutánea causada por *L. major* en ratones Balb/c se caracteriza por una respuesta inmunitaria celular tipo Th2 que se correlaciona con una alta susceptibilidad a la infección, los ratones de la cepa C57BL/6 presentan una mayor resistencia y son capaces de lograr la curación espontáneamente gracias a un perfil de respuesta celular tipo Th1 (302).

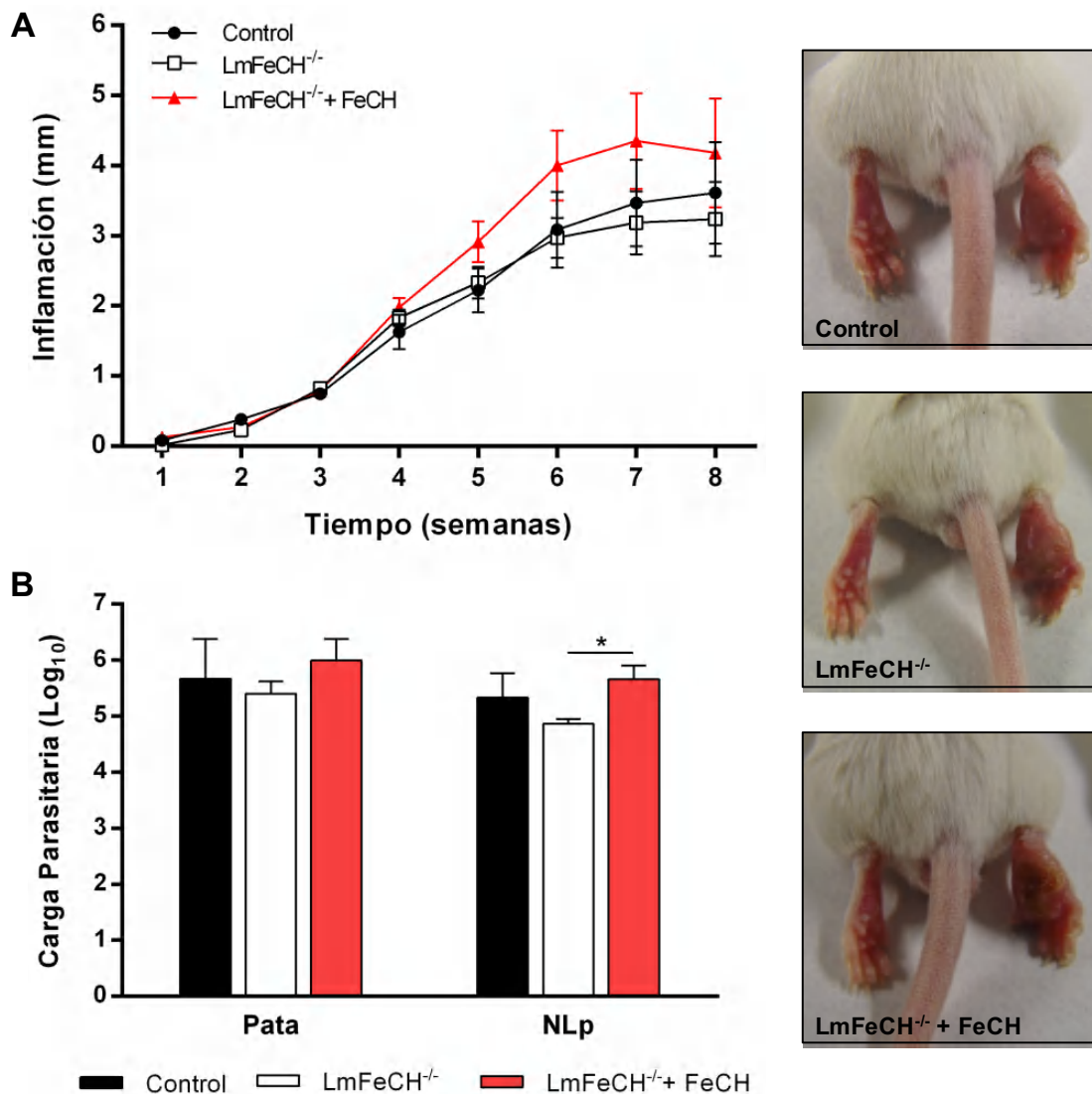


Figura 5.19. Infectividad de los promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de LmFeCH en un modelo murino de ratones Balb/c. Los ratones Balb/c fueron infectados en la almohadilla plantar de la pata derecha con promastigotes metacíclicos (10^4) de las líneas control (Cas9), doble KO (LmFeCH^{-/-}) y doble KO complementados con una copia episomal del gen (LmFeCH^{-/-} + FeCH). A) Progresión de la inflamación registrada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada). B) Cargas parasitarias de las patas infectadas y nódulos linfáticos poplíteos (NLp) tras 8 semanas de infección, determinadas mediante el método de dilución limitante. Los valores representan las medias \pm SEM de 7 ratones. (*, $p < 0.05$). Se muestran imágenes representativas de la inflamación en la almohadilla plantar de los ratones tras 6 semanas de infección (izquierda).

Para confirmar que los resultados obtenidos en los ratones Balb/c no era debido al perfil genético de los animales, decidimos también evaluar la capacidad de los parásitos LmFeCH^{-/-} para establecer enfermedad en un modelo experimental de leishmaniosis

cutánea en ratones C57BL/6, utilizando el mismo procedimiento experimental descrito para el modelo con ratones Balb/c. Los ratones infectados con los parásitos control (Cas9), LmFeCH^{-/-} y LmFeCH^{-/-} + FeCH comenzaron a desarrollar una inflamación progresiva y edema alrededor del sitio inyectado a partir de la segunda semana post-infección, alcanzando un nivel máximo a las tres semanas, después de lo cual la almohadilla comenzó a recuperarse lentamente como se esperaba para este modelo (Figura 5.20). De manera similar al modelo murino con los ratones de la cepa Balb/c, no se observaron diferencias en la progresión de la enfermedad entre los tres grupos de ratones evaluados, confirmando que la proteína FeCH no es requerida para la virulencia de *L. major*.

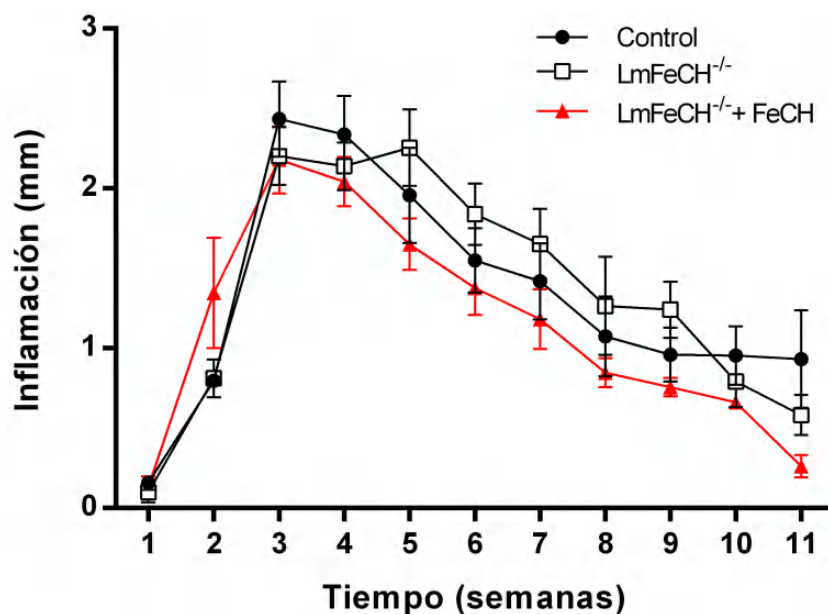


Figura 5.20. Infectividad de los promastigotes de *L. major* con diferentes niveles de expresión de LmFeCH en un modelo murino de ratones C57BL/6. A) Progresión de la inflamación medida de forma semanal (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada). Los valores representan las medias \pm SEM de 5 ratones. B) imágenes representativas de la inflamación de la almohadilla plantar tras 3 semanas de infección.

7. Efecto de los niveles de LmFeCH en el desarrollo de la forma infectiva de *L. major* en el insecto vector

La recuperación de parásitos metacíclicos *in vitro* utilizando el método de selección negativa mediante PNA no mostró diferencias significativas en parásitos de *L. major* con diferentes niveles de expresión de la proteína LmFeCH, similar a lo observado previamente para las proteínas LmCPOX y LmPPOX, sugiriendo que la ruta de síntesis de hemo en los promastigotes de *L. major* no es indispensable para la transformación a las formas metacíclicas en los cultivos *in vitro*. Sin embargo, teniendo en cuenta que el crecimiento y desarrollo de los promastigotes en el hospedero invertebrado puede ser influenciado por las condiciones presentes en el tracto digestivo del insecto, decidimos evaluar la habilidad de los parásitos LmFeCH^{-/-} para multiplicarse y migrar hacia la región anterior (válvula estomodeal) de los flebotomos, donde se acumulan como formas metacíclicas. Para ello, insectos de la especie *Phlebotomus perniciosus* fueron alimentados artificialmente con sangre infectada con promastigotes estacionarios de las líneas Cas9, LmFeCH^{-/-} y LmFeCH^{-/-} + FeCH, y se evaluó la presencia de promastigotes metacíclicos en la válvula estomodeal a los 4, 7 y 9 días post-infección (dpi). Como se describió previamente, durante la transformación en el insecto vector los promastigotes procíclicos migran hacia la región anterior del insecto vector hasta alcanzar la válvula estomodeal aproximadamente a los 5 días post-infección, en donde los promastigotes metacíclicos altamente infectivos y poco proliferativos se diferencian a partir de las leptomónadas (Figura 1.5). Observamos que los parásitos LmFeCH^{-/-} tienen la capacidad de formar promastigotes metacíclicos *in vivo* a un nivel similar que los parásitos control y la línea complementada con una copia episomal del gen *feh*, los cuales alcanzan la válvula estomodeal desde el 4 dpi (Figura 5.21). Estos resultados indican que la síntesis de hemo no es requerida por los promastigotes procíclicos para su desarrollo a las formas infectivas del parásito en el tracto digestivo del insecto vector, al menos en las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo.

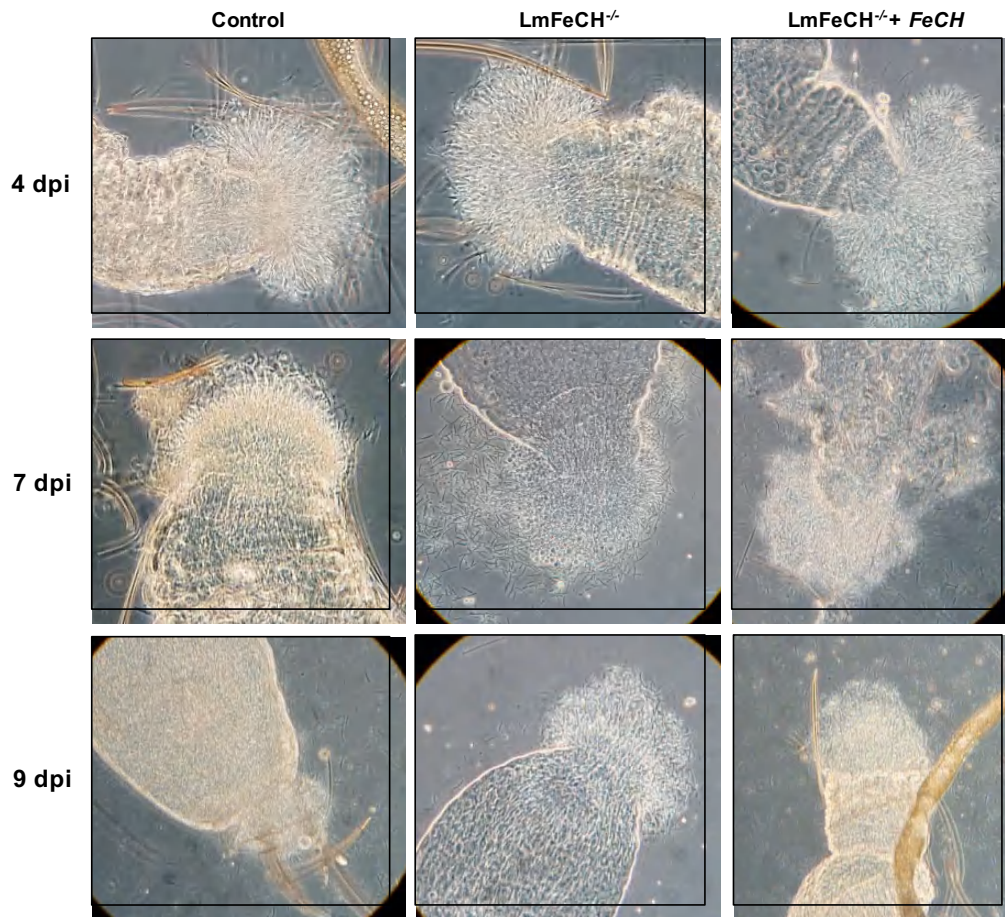


Figura 5.21. La proteína LmFeCH no es requerida para la metaciclologénesis de *L. major*. Insectos de la especie *Phlebotomus perniciosus* fueron alimentados artificialmente con sangre de conejo infectada con promastigotes estacionarios (5×10^7 parásitos/mL) de las líneas control (Cas9), doble KO (LmFeCH^{-/-}) y complementados con una copia episomal del gen (LmFeCH^{-/-} + FeCH). Se muestran imágenes representativas de la válvula estomodeal de los flebótomos infectados y diseccionados a los 4, 7 y 9 días post-infección (dpi).

Discusión

5 DISCUSIÓN

Una forma racional de buscar nuevos fármacos frente a las enfermedades parasitarias consiste en explotar las diferencias bioquímicas entre el parásito y el hospedador humano. Una de estas diferencias en los parásitos tripanosomátidos como *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. es su incapacidad de sintetizar hemo. La auxotrofia para hemo de los parásitos tripanosomátidos, y por lo tanto su absoluta dependencia para adquirirlo de una fuente exógena, ya fue considerada como el “Talón de Aquiles” hace más de 80 años (275). Esta auxotrofia se debe a que, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los organismos aeróbicos, los parásitos tripanosomátidos han perdido completamente las enzimas de su ruta de síntesis durante la evolución de los kinetoplastidos (226).

Los promastigotes de *Leishmania* pueden utilizar *in vitro* el hemo procedente de dos fuentes: el hemo libre a través de su captación por los transportadores de membrana LHR1 y FLVCRb, y el hemo derivado de la endocitosis de la hemoglobina través de receptor de hemoglobina HbR y su posterior rescate al citosol a través de la proteína LHR1 (240,241,249) (Figura 6). Por su parte, los mecanismos mediante el cual los amastigotes intracelulares adquieren hemo son menos conocidos. Este estadio del parásito reside en los macrófagos del hospedero mamífero, células que tienen un papel fundamental en la homeostasis del hemo mediante la captación de hemoglobina, hemo y eritrocitos senescentes del sistema circulatorio (129). En dichas células, los amastigotes se localizan dentro de la vacuola parasitófora, un compartimento de pH ácido fuertemente hidrolítico (303). Por lo tanto, se podría esperar que la fuente de hemo preferente sea diferente en este estadio celular.

La endocitosis de hemoglobina por la proteína HbR también parece ser funcional en amastigotes axénicos y podría participar en la captación de hemo exógena en la forma intracelular de *Leishmania* (248). Igualmente, es posible suponer que los amastigotes intracelulares podrían utilizar los transportadores LHR1 y FLVCRb para la obtención de hemo libre dentro de la vacuola parasitófora (Figura 6). Lo anterior basado en la observación de que la unión de hemo en la membrana de los amastigotes es 5 veces mayor a un pH de 5.4, similar al encontrado dentro de la vacuola parasitófora (243). En nuestro laboratorio también hemos observado que la captación de porfirinas y la afinidad por hemo se incrementa a pH ácido, lo que sugiere que el transporte de hemo a través de la membrana plasmática es más eficaz para las formas intracelulares (Tesis Doctoral MCD).

Este hemo libre podría ser derivado de la degradación proteolítica de las hemoproteínas del macrófago por acción de proteasas endógenas o propias del parásito (248), o incluso podría obtenerse mediante la fusión de la vacuola parasitófora con lisosomas conteniendo los productos de degradación de la hemoglobina endocitada.

La accesibilidad a diferentes fuentes de hemo en los promastigotes, y posiblemente en los amastigotes intracelulares, lleva a cuestionarse porque, a diferencia de *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. ha rescatado por transferencia horizontal desde γ -proteobacterias los genes que codifican para las tres últimas enzimas de la ruta de síntesis de hemo, CPOX, PPOX y FeCH (226,232). Ninguno de los genes que codifican para las primeras cinco proteínas de la ruta están presentes en los genomas de las diferentes especies de *Leishmania* secuenciadas hasta la fecha, y tampoco se ha detectado actividad enzimática relacionada con la producción de porfirinas (228,263). Por lo tanto, la presencia de los últimos tres genes es sorprendente y plantea preguntas acerca de su funcionalidad, puesto que *Leishmania* no puede producir porfirinas precursoras de la ruta de síntesis de hemo. Se ha sugerido que los amastigotes de *Leishmania* podrían tomar el precursor CPIII del citosol de la célula hospedadora para la formación de su propio hemo utilizando las últimas tres enzimas de la ruta, o que inclusive podrían hacer uso de ellas para reparar el hemo del macrófago parcialmente degradado o químicamente modificado en el ambiente ácido de la vacuola parasitófora (226,227,266) (Figura 6).

Previamente se había descrito que la inhibición de la ruta de síntesis de hemo en el macrófago no alteraba la replicación de los amastigotes intracelulares, sugiriendo que la única fuente de hemo para los parásitos se deriva de la hemoglobina captada por los macrófagos del suero presente en el medio de cultivo (264). Sin embargo, nosotros observamos que los parásitos de *L. major* son capaces de utilizar los precursores de porfirinas sintetizadas por el macrófago para su proliferación intracelular en cultivos *in vitro*. Cuando los promastigotes son depletados de hemo antes de la infección de las células THP1, se observa una significativa reducción (84%, $p < 0.001$) en la replicación intracelular de los amastigotes tratados con el inhibidor SA, el cual inhibe la síntesis de cualquier porfirina al bloquear la actividad de la enzima ALAD. Por otra parte, en presencia de LAC, un inhibidor de la enzima PPOX que permite la acumulación de CPIII pero no la síntesis de hemo, se observa un aumento significativo (58%, $p < 0.005$) en la multiplicación de los amastigotes de *L. major* en comparación con el inhibidor SA (Figura 2.5). Aunque los parásitos también poseen una proteína PPOX (265), el LAC no inhibe

su actividad puesto que *L. major* posee una PPOX tipo HemG que no contiene el sitio de unión al inhibidor que si está presente en la proteína homóloga eucariota (Figuras 4.6, 4.7). Estos resultados indican que los amastigotes contenidos dentro de la vacuola parasitófora son capaces de utilizar no solo hemo sintetizado por el macrófago sino también sus porfirinas precursoras, probablemente CPIII, para la síntesis de su propio hemo garantizando y así garantizar su supervivencia intracelular.

La discrepancia observada entre el estudio de Chang & Chang (264) y nuestros resultados, puede ser explicada por la capacidad que tienen los parásitos de *Leishmania* de almacenar hemo en cantidades suficientes para mantener su crecimiento *in vitro* durante un pase en ausencia de cualquier fuente de hemo exógeno (Figura 2.2). Por lo tanto, estas reservas de hemo en los parásitos pueden garantizar que, a pesar de la inhibición de la síntesis de porfirinas en los macrófagos, la replicación intracelular de los amastigotes no se vea afectada durante el tiempo de infección en los ensayos *in vitro* (Figura 2.4). En contraste, cuando utilizamos parásitos de *L. major* depletados de hemo para los ensayos de infección en los macrófagos THP1, las reservas de hemo ya han sido agotadas, por lo que los requerimientos de captación y/o síntesis de hemo son mayores y la replicación intracelular en ausencia de precursores de porfirinas se disminuye significativamente (Figura 2.5). En epimastigotes de *T. cruzi* se ha descrito la presencia de unos orgánulos característicos denominados reservosomas, los cuales además de acumular proteínas como transferrina y albúmina, también son capaces de almacenar hemo (237). Aunque en *Leishmania* no se ha descrito hasta la fecha la presencia de orgánulos encargados del almacenamiento de hemo intracelular, se ha identificado vacuolas capaces de acumular porfirinas, denominadas “porfirinosomas”, las cuales podrían ser equivalentes a los reservosomas presentes en *T. cruzi* (304).

Las porfirinas (hemo o CPIII) del macrófago entrarían a la vacuola parasitófora por un mecanismo aún desconocido y podría ser transportado al interior de los amastigotes mediante las proteínas LHR1 y FLVCRb, posiblemente también localizadas en la membrana plasmática del estadio intracelular del parásito (Figura 6). Por su parte, el transportador ABCB6 involucrado en la translocación porfirinas a través de las membranas lipídicas en mamíferos (193,194), podría ser el responsable del transporte de porfirinas precursoras a la vacuola parasitófora de los macrófagos infectados con *Leishmania* conteniendo los amastigotes. Recientemente se ha demostrado que en macrófagos no infectados este transportador se localiza en la membrana plasmática,

mientras que en macrófagos infectados con *L. panamensis* la proteína ABCB6 se localiza tanto en la membrana plasmática como en la membrana de la vacuola parasitófora, en donde media el transporte de antimoniales (291). Esta evidencia, sumado a que las porfirinas provenientes de la síntesis de hemo *de novo* del macrófago se acumulan alrededor de la vacuola parasitófora (229), apuntan hacia una posible relación del transportador ABCB6 con la captación de precursores de hemo en los amastigotes de *Leishmania*. Si bien nuestros resultados no nos permiten ser concluyentes en este aspecto, no descartamos la posibilidad de que el transportador ABCB6 pueda ser importante para la replicación intracelular de los parásitos, ya que observamos que los parásitos se replicaron de manera menos eficiente en macrófagos ABCB6^{-/-} en comparación con los macrófagos silvestres (Figura 2.5).

Para confirmar la importancia del transportador ABCB6 en un contexto *in vivo*, utilizamos un modelo murino de leishmaniosis cutánea utilizando ratones C57BL/6 silvestres y mutantes nulos para ABCB6. Observamos una reducción significativa en la inflamación de las patas infectadas de los ratones ABCB6^{-/-} durante las últimas semanas de infección en comparación con los ratones silvestres (Figura 2.6), lo que sugiere que en ausencia del transportador los ratones controlan de manera más eficiente la progresión de la infección y por lo tanto, son capaces de curarse con mayor rapidez que los ratones silvestres. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que ayuden a dilucidar el papel de ABCB6 en la entrada de porfirinas precursoras al interior de la vacuola parasitófora de los macrófagos infectados con *Leishmania* y su importancia en el proceso de infección por estos parásitos en hospederos mamíferos. Es importante destacar que la ausencia de este transportador en ratones y humanos no ocasiona ninguna alteración clínica aparente, y por el contrario da lugar a un nuevo grupo sanguíneo poco común denominado Lan(-) (196,197). En caso de que ABCB6 tenga un papel importante en el proceso de infección por *Leishmania*, podría constituir una diana terapéutica original para el desarrollo de fármacos leishmanicidas, ya que al ser una proteína mamífera los parásitos no podrían desarrollar resistencia frente a los compuestos utilizados frente a ella.

Para analizar a fondo la síntesis de hemo *de novo* en *L. major*, caracterizamos las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de *L. major* evaluando además su posible esencialidad para el desarrollo del ciclo de vida del parásito.

El gen que codifica para la proteína FeCH está presente en el cromosoma 17 (LmjF.17.1640) de *L. major* mientras que los genes que codifican para las proteínas CPOX (LmjF.06.1270) y PPOX (LmjF.06.1280) se encuentran localizados en el cromosoma 6, flanqueados por los genes LmjF.06.1260 y LmjF.06.1290 que codifican para un transportador putativo de pteridina y una proteína hipotética que contiene un dominio de unión a hemo tipo citocromo b-5, respectivamente, situados en la misma orientación. De manera interesante, datos de secuenciación de ARN (ARNseq) obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que los genes LmjF.06.1260 y LmjF.06.1290 son sobre-expresados en promastigotes crecidos en ausencia de hemo en comparación con promastigotes crecidos en presencia de SFB (L.M Orrego y J.M Pérez-Victoria, resultados no publicados). A pesar de que el genoma de los tripanosomátidos se encuentra organizado en largas agrupaciones de genes cuya función no está relacionada entre sí, se han identificado cierta excepciones como los genes que codifican para las enzimas de síntesis *de novo* de pirimidinas, los cuales se encuentran agrupados en tándem de forma similar a un operón en el genoma de tripanosomátidos, sugiriendo además su adquisición a través de HGT (305). De manera similar, *Leishmania* spp. podría contener en el cromosoma 6 una agrupación de genes relacionados con la síntesis y homeostasis del hemo, siendo otra de las pocas excepciones observadas en el genoma de estos parásitos, que además resalta el impacto de la HGT en la evolución del metabolismo de los parásitos tripanosomátidos.

Los niveles de ARNm de los genes *cpox*, *ppox* y *fech* de *L. major* no muestran diferencias entre los promastigotes crecidos en presencia y ausencia de hemo (L.M Orrego y J.M Pérez-Victoria, resultados no publicados), y tampoco se ha observado alteraciones en la su expresión durante la diferenciación de promastigotes procíclicos a metacíclicos en condiciones *in vitro* (306) e *in vivo* en el insecto vector (307), ni durante la transición de promastigotes metacíclicos a amastigotes intracelulares en macrófagos (308). En conjunto, estos resultados indican que los genes involucrados con la síntesis *de novo* son constitutivamente expresados en *L. major* (309).

La proteína LmCPOX es una enzima tipo HemF estructuralmente similar a su contraparte Hem13 de levaduras, presentando una conformación homodimérica en la que el sitio activo conteniendo los aminoácidos catalíticamente conservados se encuentra abierto y accesible (153) (Figura 3.5). Por otra parte, la proteína LmPPOX es una proteína monomérica tipo HemG que presenta similitud estructural con su proteína homóloga de *E. coli*, la cual utiliza FMN como cofactor y ubiquinona como aceptor final de electrones, siendo la primera enzima eucariótica con características procarióticas descrita hasta la fecha (265) (Figura 4.4). Finalmente la proteína LmFeCH presenta características procarióticas, ya que a diferencia de las enzimas de origen eucariótico, carece de la región N-terminal que contiene el péptido señal para la localización en mitocondria y tampoco presenta la región C-terminal involucrada en la formación de los clúster [2Fe-2S] y la estabilización de la proteína dimérica (Figura 5.5).

Las proteínas CPOX, PPOX y FeCH de origen eucariótico presentan en su región N-terminal un péptido señal que las dirige a la mitocondria, organelo donde finaliza la síntesis de hemo. Sin embargo, los programas de predicción de localización celular indican que las proteínas de *Leishmania* spp. no contienen señales de localización mitocondrial reconocibles. En un estudio proteómico reciente de fraccionamiento subcelular en promastigotes en *L. donovani*, se observó que el 90% de la proteína LdCPOX se encuentra en la fracción citosólica de los parásitos, mientras que el 39% de la proteína LdFeCH se encuentra en la fracción mitocondrial. Para la proteína LdPPOX no se observa una localización clara, puesto que identificada en bajas proporciones en múltiples organelos como membrana plasmática, mitocondria, acidocalcisomas, glicosomas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (310).

Nuestros resultados indican que la proteína LmFeCH es una proteína mitocondrial igual que sus contrapartes eucarióticas, a pesar de carecer de un péptido de direccionamiento mitocondrial detectable (Figuras 5.8, 5.9), lo que nos sugiere que posiblemente la LmFeCH sea transportada hasta la mitocondria por una proteína chaperona. En contraste, LmCPOX y LmPPOX están localizados fuera de este organelo, lo que diferencia las enzimas de *L. major* de sus contrapartes en metazoos. La proteína LmCPOX es claramente una proteína citosólica (Figuras 3.8, 3.9), similar a su proteína homóloga en levaduras Hem13, mientras que LmPPOX parece estar localizada en una estructura subcelular aún no determinada cercana a la mitocondria de los parásitos

(Figuras 4.8, 4.9). Es tentador sugerir que, una vez el PPGIX es sintetizado en el citosol de los parásitos por la enzima LmCPOX, el PPGIX sea convertido a PPIX en vesículas intracelulares por acción de la LmPPOX, evitando así el tránsito de los intermediarios potencialmente citotóxicos a través del citosol, y que similar a la hipótesis de “*kiss and run*” propuesta para el transporte de hierro a la mitocondria, dichas vesículas interaccionen transitoriamente con la mitocondria para la liberación de la PPIX y su conversión a hemo por la LmFeCH (Figura 6). Sin embargo esta hipótesis es poco probable, ya que no explicaría la localización puntual de la proteína LmPPOX cerca de la mitocondria y tampoco la ausencia de la LdPPOX en la fracción de cuerpos vesiculares (310). Serán necesarios más estudios para determinar la localización exacta de esta proteína en los parásitos de *Leishmania*.

Tras múltiples intentos de generar mutantes nulos para las proteínas LmPPOX y LmFeCH mediante la estrategia clásica de recombinación homóloga, sólo se obtuvieron parásitos heterocigotos en los que solo un alelo del gen era reemplazado por el cassette de resistencia al fármaco de selección. Puesto que los promastigotes eran crecidos en medio de cultivo suplementado con SFB como fuente exógena de hemo, era improbable que los genes *ppox* y *fech* fueran esenciales para los parásitos bajo estas condiciones de cultivo. Durante el transcurso de este trabajo, se describieron dos nuevas metodologías utilizando el sistema CRISPR-Cas9 para la edición genética de *Leishmania*, las cuales fueron implementadas en la generación de parásitos mutantes nulos para las proteínas LmCPOX, LmPPOX y LmFeCH de *L. major*. Mediante la estrategia CRISPR-Cas9 descrita por Sollelis *et al.* (284) obtuvimos parásitos LmPPOX^{-/-} y LmFeCH^{-/-} en una sola ronda de transfección, resaltando la eficiencia de esta nueva metodología en comparación con los métodos de edición genética existentes hasta la fecha. Sin embargo, fue necesario la evaluación de decenas de clones para el aislamiento de parásitos con delección de ambos alelos. En contraste, la estrategia de CRISPR-Cas9 descrita por Beneke *et al.* (285) empleada en la generación de los parásitos LmPPOX^{-/-} fue mucho más eficiente que la descrita anteriormente, ya que en una sola ronda de transfección el 100% de los clones evaluados presentaban la delección de ambos alelos. Adicionalmente, esta metodología nos permitió realizar el marcaje endógeno de las proteínas de estudio, con el fin de determinar su localización celular sin necesidad de introducir una copia episomal del gen y de evaluar su expresión bajo condiciones basales. Por lo tanto, más allá de la delección de genes, esta nueva herramienta de edición genética en *Leishmania* abre una nueva era

en la investigación de estos parásitos, que permitirá no solo el desarrollo de estudios funcionales a gran escala sino también el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad.

Los parásitos LmFeCH^{-/-} generados fueron incapaces de crecer en presencia de PPIX como única fuente de hemo a menos de que fueran complementados con una copia episomal del gen (Figura 5.17). Este resultado indica que la LmFeCH es la única proteína responsable catalizar la inserción de hierro en PPIX en *L. major* y descarta la posibilidad de que la frataxina (LmjF.25.1050), recientemente descrita como una proteína con actividad ferroquelatasa en plantas (172), pueda tener alguna participación en la síntesis de hemo en estos parásitos.

La ausencia de las proteínas LmCPOX, LmPPOX y LmFeCH en *L. major* no disminuyen el porcentaje de promastigote metacíclicos en cultivos *in vitro* (Figuras 3.18, 4.16, 5.19), sugiriendo que no tienen ninguna participación en el desarrollo de promastigotes infectivos. Para confirmarlo, se realizaron infecciones artificiales de mosquitos con las líneas de parásitos expresando diferentes niveles de la proteína FeCH y se evaluó la generación y la migración de los parásitos metacíclicos a la valvula estomodeal de los insectos vectores, en colaboración con el Dr. Ricardo Molina y la Dra. Maribel Jiménez (Instituto de Salud Carlos III). Se utilizó una combinación antinatural vector-parásito puesto que se ha comprobado que *P. perniciosus* es un vector permisivo que admite una amplia gama de especies de *Leishmania* (311). Durante la infección de los flebotomos, a medida que la sangre es digerida, los parásitos migran a la región anterior del insecto vector (valvula estomodeal) en donde los promastigotes metacíclicos infectivos se acumulan para ser transmitidos a un hospedero mamífero (19,80) (Figura 1.5). En nuestros experimentos observamos que la línea LmFeCH^{-/-} es capaz de generar parásitos metacíclicos que se acumulan en la valvula estomodal de los flebotomos artificialmente infectados de manera similar a los parásitos de la línea control, indicando que la síntesis de hemo *de novo* en *L. major* no es esencial para su desarrollo en el insecto vector (Figura 5.22).

Lo anterior puede ser debido a que, durante la fase inicial en el intestino medio del insecto vector, los parásitos de *Leishmania* tienen un fácil acceso a la hemoglobina derivada de la sangre o el hemo liberado de los eritrocitos digeridos dentro de la matriz peritrófica en donde los parásitos se encuentran contenidos, y que probablemente puedan

usarlos para suplir sus necesidades nutricionales. El hemo podría ser captado directamente a través de los transportadores LHR1 (241) y LFLVCRb (MCD y JMPV, sometido) o en forma de hemoglobina no digerida mediante el receptor localizado en el bolsillo flagelar (240,247) y el posterior importe de hemo lisosomal al citosol a través de LHR1 (249) (Figura 1.18). La disminución gradual de los niveles de hemoglobina en el tracto digestivo de los insectos vectores lleva a la secreción de quitinasas por *Leishmania* para la degradación de la membrana peritrófica, permitiendo su liberación y migración al intestino medio anterior (77), además de proporcionar una señal para la diferenciación de las formas proliferativas no infectivas a formas no proliferativas altamente infectivas (312), las cuales probablemente requieran menos hemo. Adicionalmente, en regiones del intestino donde la disponibilidad de hemo es baja, es posible que *Leishmania* pueda utilizar el hemo almacenado intracelularmente, el cual puede estar contenido en reservosomas similar a lo descrito en epimastigotes de *T. cruzi* (313). En cualquier caso, parece que los parásitos no necesitan sintetizar hemo *de novo* utilizando los productos de degradación de la sangre en el tracto digestivo del insecto vector tal como se había sugerido previamente (314), al menos bajo nuestras condiciones experimentales.

De manera interesante, los tripanosomátidos monoxenos *Leptomonas* spp. y *Crithidia* spp, los cuales solo residen extracelularmente en el tracto digestivo de los insectos infectados, también han adquirido los genes *cpox*, *ppox* y *fech* mediante transferencia horizontal de genes (232), sugiriendo que estas enzimas son posiblemente relevantes en el desarrollo dentro de los insectos. Dado que estas especies parasitan principalmente insectos que no son hematófagos (315), se ha propuesto que estos parásitos posiblemente adquieran CPIII de su hospedero (226). Por otra parte, las infecciones humanas causadas por tripanosomátidos mononexos han sido documentadas en pacientes inmunocomprometidos (316–318), y pueden actuar como patógenos oportunistas en coinfecciones con *Leishmania* (319,320). Por lo que sabemos, los tripanosomátidos monoxenos que están surgiendo como agentes oportunistas en infecciones humanas, pertenecen a las únicas subfamilias de tripanosomátidos que poseen los últimos tres genes de la ruta de síntesis de hemo, por lo que es posible que la recuperación parcial de esta vía metabólica mediante HGT les haya conferido una ventaja evolutiva para adaptarse a nuevas condiciones ambientales que faciliten su prevalencia (321).

En los macrófagos infectados con las líneas de parásitos mutantes nulos para las proteínas LmCPOX, LmPPOX y LmFeCH observamos un defecto en la replicación de los amastigotes intracelulares en comparación con los parásitos control, la cual era recuperada una vez los parásitos eran complementados con una copia episomal del gen correspondiente (Figuras 3.17, 4.17, 5.18). Estos resultados sugieren que en infecciones *in vitro*, los amastigotes de *L. major* requieren la síntesis de su propio hemo para la replicación intracelular, lo cual es soportado por el hecho de que los parásitos silvestres también disminuyen su capacidad de replicación cuando la célula hospedera es tratada con inhibidores de la síntesis de hemo, SA y LAC (Figura 2.5). Por lo tanto, las proteínas LmCPOX, LmPPOX y LmFeCH podrían jugar un papel importante en el estadio intracelular de *L. major*, actuando de manera orquestrada para sintetizar su propio hemo a partir del precursor CPIII sintetizado por el macrófago.

A pesar de que los resultados *in vitro* sugerían que las proteínas de la síntesis de hemo en *L. major* podrían ser importantes en el establecimiento de la enfermedad en el hospedero mamífero, los parásitos mutantes nulos para LmCPOX, LmPPOX y LmFeCH mostraron la misma virulencia que los parásitos control en un modelo murino de leishmaniasis cutánea, observándose una inflamación similar en las patas infectadas de todos los grupos de estudio (Figuras 3.19A, 4.18, 5.20A). Además, en los modelos animales para el estudio de las proteínas LmCPOX y LmFeCH, se obtuvo una carga parasitaria similar en los ratones infectados con los parásitos mutantes nulos en comparación con el grupo de animales infectado con los parásitos control (Figuras 3.19B, 5.20B). Sin embargo, se observó una disminución significativa en la carga parasitaria de los ratones infectados con los parásitos LmPPOX^{-/-} en comparación con los ratones infectados con los parásitos control, la cual fue restablecida en los ratones infectados con la línea LmPPOX^{-/-} + PPOX conteniendo una copia episomal del gen (Figura 4.19). Los estudios de histopatología, realizados en colaboración con el Dr. Francisco O'Valle (Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada), indicaron que aunque el número de amastigotes por macrófago fue igual en todos los grupos, la cantidad de macrófagos infectados por área de tejido fue significativamente mayor en los ratones infectados con la línea LmPPOX^{-/-} + PPOX en comparación con los ratones infectados con la línea LmPPOX^{-/-} (Figura 4.19B). En conjunto, los anteriores resultados indican que la síntesis de hemo *de novo* en *L. major* no es requerida para el establecimiento de la enfermedad en un modelo murino, y que posiblemente la proteína LmPPOX pueda tener

una función adicional que le confiera a los parásitos una ventaja para su supervivencia en el hospedero mamífero.

Además del hemo sintetizado por el macrófago, estas células captan hemoglobina, hemo y eritrocitos senescentes de la circulación (129) (Figura 6). De hecho, en casos de leishmaniasis visceral se ha descrito que la eritofagocitosis (322) y la captación de hemoglobina (323) se incrementa en los macrófagos infectados, esto último debido probablemente al aumento en la expresión del receptor haptoglobina/hemoglobina (CD163) del macrófago inducido por el parásito (323). Aunque este hemo es rápidamente degradado por la actividad hemo oxigenasa del macrófago, la cual es aumentada en infección con *Leishmania* spp. (105,324), es posible que algunas moléculas puedan escapar de la degradación y ser capturadas por los amastigotes intracelulares, permitiendo el establecimiento de la enfermedad.

Es importante apuntar que a diferencia de los macrófagos presentes en el hospedero mamífero, la línea celular THP1 no expresa el receptor CD163 en su superficie y tampoco puede inducirse mediante estimulación con PMA (325). Esto también podría explicar la discrepancia entre los resultados de las infecciones *in vitro* y el modelo de infección *in vivo*, sugiriendo que en las células THP1 los amastigotes intracelulares podrían tener un acceso limitado al hemo derivado de la hemoglobina y por lo tanto, dependan en mayor medida de las porfirinas precursoras del macrófago para la síntesis de su propio hemo con el fin de suplir sus necesidades nutricionales.

El hecho de que la síntesis de hemo *de novo* no sea esencial durante el ciclo de vida de *L. major*, plantea la pregunta de porqué los genes que codifican para las tres últimas enzimas de la ruta fueron readquiridas por HGT desde γ -proteobacterias. Incluso, si su origen se debe a un proceso de reemplazo genético de los genes eucarióticos más que a un evento de adquisición *de novo* como ha sido sugerido previamente (232), porqué la presión evolutiva ha favorecido su adquisición desde bacterias si aparentemente estos genes no confieren ninguna ventaja para la adaptación de *Leishmania* spp. a los ambientes extremos donde se desarrollan (vacuola parasitófora en el macrófago e intestino medio del insecto vector)?. Actualmente, no tenemos respuesta para ello. La HGT juega un papel crítico en la evolución de los genomas procariontes y eucariotes, y en *Leishmania* es un proceso continuo que contribuye a la especiación y la diversificación de las especies que les permite la adquisición de nuevas capacidades (326). La presencia de los genes de

la síntesis de hemo en los tripanosomátidos ha sido el resultado de una intrincada historia de pérdida de genes y múltiples eventos de HGT en diferentes ramas de la filogenia de Trypanosomatidae, que ha requerido de una estrecha cooperación entre estos organismos flagelados y sus endosimbiontes (230). Los análisis filogenéticos del gen *fech* sugieren que su presencia en el genoma de *Leishmania* es el resultado de varios eventos de HGT durante la evolución de la clase Kinetoplastea, ya que aparentemente ha sido adquirido en el orden Bodonida, y también en las subfamilias Leishmaniinae/Strigomononadinae a partir de β -proteobacterias y γ -proteobacterias (230,232). La evolución de los genes *cpox* y *ppox* parece ser más simple, ya que los estudios filogenéticos sugieren que fueron adquiridos una sola vez durante la evolución en Leishmaniinae/Strigomononadinae a partir de γ -proteobacterias (232).

Estas evidencias sugieren que existe una clara retención de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis del hemo en *Leishmania* spp., como resultado de una presión evolutiva selectiva, lo cual es inconsistente con nuestros resultados que indican que dichos genes no son esenciales en el desarrollo del ciclo de vida de *L. major*. Se podría, por lo tanto, proponer una posible explicación basados en una de las hipótesis alternativas sobre la evolución de la ruta de síntesis de hemo en Kinetoplastidae propuesta por U. Cenci *et al.* (232). De acuerdo a esta, la HGT no es un factor determinante en la evolución de la ruta, y por el contrario implica la existencia de un organismo ancestral rico en genes (eucarióticos y procarióticos) de la ruta de síntesis de hemo en el origen de la clase Kinetoplastea. Durante la evolución, los primeros genes de la ruta de ambos orígenes y los genes *cpox*, *ppox* y *fech* de origen eucariótico podrían haberse perdido en *Leishmania*, mientras que los genes de las tres enzimas de origen procariótico podrían haberse conservado (232). De acuerdo a dicha hipótesis, proponemos que es posible que no haya una presión de selección para conservar esta ruta parcial de síntesis de hemo en *Leishmania* y que los genes *cpox*, *ppox* y *fech* de origen procariótico puedan ser perdidos en un futuro durante la evolución de estos parásitos, lo cual explicaría que no sean esenciales durante el ciclo de vida de *L. major*. Sin embargo, como indican los autores, esta hipótesis sobre la evolución de la ruta de síntesis de hemo es poco probable (232). Adicionalmente, el hecho de que los genes no sean esenciales no significa que la síntesis de hemo *de novo* no sea importante en el desarrollo de la infección en el hospedero mamífero, tal como lo sugieren nuestros resultados en el modelo *in vivo* de la proteína LmPPOX. Las enzimas del macrófago también podrían importarse a los amastigotes

intracelulares para potenciar la síntesis de hemo por *Leishmania*, similar a la captación de las enzimas ALAD y FeCH durante la fase eritrocítica de *Plasmodium* spp. (327), aunque no tenemos evidencias experimentales que soporten esta hipótesis.

A pesar de los resultados obtenidos en el presente trabajo no podemos descartar que la biosíntesis de hemo en *Leishmania* pueda desempeñar un papel crucial en el desarrollo del parásito en condiciones naturales, afectando su virulencia o potencial de transmisión. Primero, en nuestras condiciones experimentales los flebótomos son infectados con un gran número de promastigotes extracelulares, en comparación con la pequeña cantidad de amastigotes intracelulares que pueden ser adquiridos de forma natural del mamífero infectado durante la picadura del insecto vector. Este hecho es relevante ya que ha sido descrito que el incremento en el número de parásitos presentes en el inóculo durante una ingesta de sangre, permite a los parásitos de *L. donovani* diferenciarse a formas infectivas metacíclicas que se acumulan en la válvula estomodeal de *P. papatasi*, una especie de flebótomo inherentemente refractaria a la infección por esta especie de *Leishmania* (312). Además, la infección con las formas promastigote del parásito en lugar de amastigotes intracelulares como ocurre naturalmente, también podría marcar la diferencia, ya que la transformación de los amastigotes a promastigotes dentro del insecto vector requiere la presencia de hemo (264). Segundo, la infección de los ratones mediante la inoculación de los parásitos utilizando una aguja, también difiere del mecanismo de transmisión natural, en la cual el insecto vector inyecta un número mucho menor de parásitos en conjunto con pequeñas cantidades de saliva, lo cual es crucial para el desarrollo clínico e inmunológico de la enfermedad (302). Por lo tanto, es necesario un modelo de infección natural que nos permita probar de manera definitiva la importancia de la síntesis de hemo *de novo* en *Leishmania*. De hecho, solo los modelos de infección natural han permitido evidenciar la esencialidad de la proteína FeCH en el estadio hepático de *Plasmodium* (274).

También es posible considerar que la síntesis parcial de hemo en *Leishmania* sea un mecanismo de retroalimentación que solo comience a ser esencial en los casos en que la disponibilidad de hemo sea limitada, como se ha sugerido en malaria (272). Por ejemplo, la leishmaniasis visceral en humanos se caracteriza por una condición anémica que puede ser grave (322), en la cual los macrófagos podrían captar menos hemo exógeno de la circulación, y los amastigotes de *Leishmania* podrían verse obligados a sintetizar su

propio hemo tomando precursores de porfirinas de la célula hospedadora, por lo que la ruta parcial de síntesis sería mas relevante para su supervivencia intracelular. Otro caso podría ser la presencia de hemoglobinopatías o porfirias, como también ha sido sugerido en las infecciones por *Plasmodium* (328).

En conclusión, en el presente trabajo hemos demostrado que los amastigotes intracelulares y los promastigotes extracelulares de *L. major* pueden usar precursores de hemo, sintetizados por el macrófago o adicionados al medio de cultivo, para sintetizar su propio hemo. Sin embargo, esta actividad no es esencial para el desarrollo del ciclo de vida de *L. major* en el hospedero mamífero ni en el insecto vector, al menos bajo nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, las proteínas involucradas en la síntesis de hemo en *Leishmania* no representan dianas farmacológicas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Muchos aspectos intrigantes acerca de la síntesis de hemo en estos parásitos quedan abiertos: El acceso que tiene *Leishmania* al hemo del hospedador es diferente cuando se desarrolla en órganos internos (leishmaniasis visceral) o en la piel (leishmaniasis cutánea) del hospedero mamífero? La ruta de síntesis de hemo es esencial en especies de *Leishmania* que causan leishmaniasis visceral o en condiciones patológicas como la anemia? Ha adquirido esta ruta parcial de síntesis de hemo algún papel en la transmisión natural de la enfermedad? Cómo se trafican las porfirinas desde el citosol de los macrófagos a la vacuola parasitofóra conteniendo los amastigotes intracelulares? Se requiere trabajo adicional para responder a todas estas preguntas aún sin resolver.

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

1. Los estadios promastigote y amastigote de *L. major* almacenan hemo intracelular que le permite proliferar durante varias generaciones en ambientes que carecen de una fuente exógena de este metabolito esencial.
2. Los amastigotes intracelulares de *L. major* son capaces de utilizar hemo sintetizado *de novo* por el macrófago.
3. La ruta parcial de síntesis de hemo readquirida por *L. major* es funcional ya que los amastigotes intracelulares también son capaces de utilizar porfirinas precursoras sintetizadas por el macrófago para finalizar la síntesis de su propio hemo.
4. Los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfech* de *L. major* codifican enzimas funcionales capaces de complementar la auxotrofia para hemo en cepas de bacterias y levaduras deficientes para los genes correspondientes.
5. A diferencia de la localización mitocondrial en eucariotas superiores, las enzimas CPOX, PPOX y FeCH de *Leishmania major* se encuentran en diferentes compartimentos celulares. LmCPOX se localiza en el citosol, LmFeCH en la mitocondria y LmPPOX en estructuras subcelulares aun no identificadas cerca de la mitocondria.
6. El sistema de edición genética CRISPR-Cas9 basado en plásmidos representa la metodología más eficiente y económica descrita hasta la fecha en *Leishmania*, ya que permite la obtención de parásitos mutantes nulos o marcados endógenamente en solo una semana.
7. La eliminación de los genes *lmcpx*, *lmpox* y *lmfech* en *L. major* no afecta *in vitro* ni a la proliferación de los promastigotes ni a su desarrollo a formas infectivas metacíclicas, pero si disminuye la replicación de los amastigotes intracelulares en células THP1.
8. La síntesis de hemo *de novo* no es esencial para el desarrollo de promastigotes metacíclicos de *L. major* en el insecto vector, como demuestra la presencia de parásitos mutantes nulos para LmFeCH en la valvula estomodeal de insectos de *P. perniciosus* infectados artificialmente
9. La eliminación de los genes *lmcpx*, *lmpox*, y *lmfech* no disminuyen la virulencia de *L. major* en un modelo murino de leishmanioasis cutánea, sugiriendo que no son esenciales para el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, las proteínas que

codifican no representan dianas farmacológicas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Referencias

7 REFERENCIAS

1. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014 Nov;69:S10–8.
2. Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):340–4.
3. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30(12–13):1269–81.
4. Postigo JAR. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Nov;36:S62–5.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305–18.
6. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012 May 31;7(5):e35671.
7. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. 2010 Mar 11;15(10):19505.
8. Torpiano P, Pace D. Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015 Sep 2;13(9):1123–38.
9. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Jul 4;9(6):588–96.
10. Gálvez R, Descalzo MA, Guerrero I, Miró G, Molina R. Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 Jul;11(7):799–806.
11. Gomez-Barroso D, Herrador Z, San Martín J V, Gherasim A, Aguado M, Romero-Mate A, et al. Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013. *Euro Surveill*. 2015 Feb 19;20(7):11–20.
12. Arce A, Estirado A, Ordoñas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013 Jul 25;18(30):20546.
13. Olmedo Lucerón C, Pérez Meixeira AM, Iriso Calle A, Aránguez Ruiz E, Abad Sanz I. [Evolution and spatial analysis of leishmaniasis cases in a rural area

- bordering a community outbreak in Madrid: 2001-2017]. *Rev Esp Salud Publica*. 2018 Nov 20;92.
14. Amillategui Dos Santos R, Cano Portero R, Almazan-Isla J, Boix Martínez R, Delgado-Sanz C, Diaz Garcia O, et al. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2015. 2015;
 15. Roth-Damas P, Sempere-Manuel M, Mialaret-Lahiguera A, Fernández-García C, Gil-Tomás JJ, Colomina-Rodríguez J, et al. Brote comunitario de leishmaniasis cutánea en la comarca de La Ribera: a propósito de las medidas de Salud Pública. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Jun 1;35(6):338–43.
 16. Velez R, Ballart C, Domenech E, Abras A, Fernández-Arévalo A, Gómez SA, et al. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. *Prev Vet Med*. 2019 Jan 1;162:67–75.
 17. Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Sierra Moros MJ, Molina Moreno R, Astray Mochales J, et al. [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Rev Esp Salud Publica*. 2012 Dec;86(6):555–64.
 18. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Mar;10(3):e0004349.
 19. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097–106.
 20. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000 Apr;16(4):142–4.
 21. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct;366(9496):1561–77.
 22. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018 Sep 15;392(10151):951–70.
 23. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999 Oct 1;354(9185):1191–9.
 24. Piscopo T V, Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J*. 2007 Feb;83(976):649–57.
 25. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease

- control. *BMJ*. 2003 Feb 15;326(7385):377–82.
26. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. 2008;26(14):1709–24.
 27. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:25–40.
 28. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2016 Aug 30;227:98–114.
 29. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003;19(11):502–8.
 30. Zulfiqar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today*. 2017 Oct;22(10):1516–31.
 31. Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini-Reviews Med Chem*. 2017 Dec 8;18(1).
 32. Ouellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat*. 2004;7(4–5):257–66.
 33. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004 Sep 17;279(38):39925–32.
 34. Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2005;21(11):508–12.
 35. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jan 1;19(1):111–26.
 36. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001 Nov;6(11):849–54.
 37. Bonfante-Garrido R, Barroeta S, de Alejos MA, Meléndez E, Torrealba J, Valdivia O, et al. Disseminated American cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1996 Aug;35(8):561–5.
 38. Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1992 Jul;47(1):117–26.
 39. Vélez ID, Colmenares LM, Muñoz CA. Two cases of visceral leishmaniasis in

- Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009 Aug;51(4):231–6.
40. Sampaio RNR, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome™. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Jan;91(1):77.
 41. Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol*. 2007 Feb 1;56(2):143–53.
 42. L egar e D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof Y-D, Rosen BP, Haimeur A, et al. The *Leishmania* ATP-binding Cassette Protein PGPA Is an Intracellular Metal-Thiol Transporter ATPase. *J Biol Chem*. 2001 Jul 13;276(28):26301–7.
 43. Papadopoulou B, K undig C, Singh A, Ouellette M. Drug resistance in *Leishmania*: similarities and differences to other organisms. *Drug Resist Updat*. 1998;1(4):266–78.
 44. Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Aug 31;130(2):83–90.
 45. Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis : Newer developments. 2014;4(1).
 46. de Menezes JPB, Guedes CES, Petersen AL de OA, Fraga DBM, Veras PST. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–11.
 47. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, et al. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):1031–41.
 48. Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 May 30;17(5):787–94.
 49. Bhandari V, Sundar S, Dujardin JC, Salotra P. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 May 1;58(5):2580–5.
 50. Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol*. 1987 Aug 15;36(16):2633–6.
 51. Burk K, David M, Junge K, Sindermann H. Overview on the clinical development of miltefosine solution (Miltex) for the treatment of cutaneous breast cancer. *Drugs of Today*. 1994;30:59–72.

52. Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem.* 2006;281(33):23766–75.
53. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1425–30.
54. Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr 1;51(4):1327–32.
55. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *N Engl J Med.* 2002 Nov 28;347(22):1739–46.
56. Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, et al. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine , an Oral Agent. 2001;33(5):57–61.
57. Soto J, Soto P. [Oral miltefosine to treat leishmaniasis]. *Biomedica.* 2006 Oct;26 Suppl 1:207–17.
58. Sundar S, Singh A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. *Parasitology.* 2018 Apr 7;145(4):481–9.
59. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 Jan 21;14(1):53–63.
60. Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter: A novel p-type phospholipid translocase from *leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem.* 2003;278(50):49965–71.
61. García-Sánchez S, Sánchez-Cañete MP, Gamarro F, Castanys S. Functional role of evolutionarily highly conserved residues, N-glycosylation level and domains of the *Leishmania* miltefosine transporter-Cdc50 subunit. *Biochem J.* 2014 Apr 1;459(1):83–94.
62. Perez-Victoria JM, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, et al. Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep 1;45(9):2468–74.

63. Castanys-Muñoz E, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3573–9.
64. Deep DK, Singh R, Bhandari V, Verma A, Sharma V, Wajid S, et al. Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jun;11(6):e0005641.
65. Carnielli JBT, Crouch K, Forrester S, Silva VC, Carvalho SFG, Damasceno JD, et al. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine.* 2018 Oct;36:83–91.
66. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2015 Feb;16(2):237–52.
67. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs.* 2013;73(17):1889–920.
68. Nassif PW, De Mello TFP, Navasconi TR, Mota CA, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Parasitology.* 2017;144(8):995–1004.
69. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. Knoll LJ, editor. *PLoS Pathog.* 2013 Oct 10;9(10):e1003594.
70. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* 2017;7(9).
71. Bates PA. The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. *Exp Parasitol.* 1994 Sep 1;79(2):215–8.
72. Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002 Aug;18(8):332–4.
73. Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol.* 2001 Oct;31(12):1311–20.
74. OMS OM de la S. Control de las leishmaniasis. 2010. 33 p.
75. Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 1989 Jul;69(1):100–3.

76. Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science*. 2001 Apr 13;292(5515):285–7.
77. Schlein Y, Jacobson RL. Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitology*. 1994 Jul;109 (Pt 1):23–8.
78. Charlab R, Tesh RB, Rowton ED, Ribeiro JM. *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol*. 1995 Mar;80(2):167–75.
79. Méndez S, Fernández-Pérez FJ, de la Fuente C, Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Alunda JM. Partial anaerobiosis induces infectivity of *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasitol Res*. 1999 Jun;85(6):507–9.
80. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006;22(9):439–45.
81. Sacks D, Lawyer P, Kamhawi S. The biology of *Leishmania*–sand fly interactions. *Leishmania after the genome*. 2008;205–38.
82. Sacks DL, Modi G, Rowton E, Späth G, Epstein L, Turco SJ, et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):406–11.
83. Vaidyanathan R. Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its function in the vector sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 2005 Mar;42(2):142–52.
84. Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology*. 1994;108 Suppl:S55-62.
85. Hajmová M, Chang K-P, Kolli B, Volf P. Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microbes Infect*. 2004 Jun 1;6(7):646–9.
86. Singh SB, Tandon R, Krishnamurthy G, Vikram R, Sharma N, Basu SK, et al. Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*. *EMBO J*. 2003 Nov 3;22(21):5712–22.
87. Patel N, Singh SB, Basu SK, Mukhopadhyay A. *Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed hemoglobin for their growth. *Proc Natl Acad*

- Sci. 2008;105(10):3980–5.
88. Rogers ME, Ilg T, Nikolaev A V, Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004 Jul 22;430(6998):463–7.
 89. Doehl JSP, Sádlová J, Aslan H, Pružinová K, Metangmo S, Votýpka J, et al. Leishmania HASP and SHERP Genes Are Required for In Vivo Differentiation, Parasite Transmission and Virulence Attenuation in the Host. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):e1006130.
 90. Olivier M, Gregory DJ. Interactions between Leishmania and the host macrophage. *Leishmania: after The Genome*. 2008;239–62.
 91. Rogers ME. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. *Front Microbiol*. 2012;3:223.
 92. Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jul;11(7):e0005600.
 93. van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 12;103(37):13837–42.
 94. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol*. 2004 Dec 1;173(11):6521–5.
 95. Kane MM, Mosser DM. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jan 1;7(1):26–31.
 96. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage : a multifaceted interaction. 2015;10:111–29.
 97. Tripathi A, Gupta CM. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in Leishmania promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Apr 25;128(1):1–9.
 98. Wanderley JLM, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cell Mol Life Sci*. 2010 May 7;67(10):1653–9.
 99. Campos-Salinas J, León-Guerrero D, González-Rey E, Delgado M, Castanys S, Pérez-Victoria JM, et al. LABC2, a New ABC Transporter Implicated in Phosphatidylserine Exposure, Is Involved in the Infectivity and Pathogenicity of

- Leishmania. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(4).
100. Alcolea PJ, Alonso A, Gomez MJ, Sanchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gonzalez-Pastor E, et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. BMC Genomics. 2010;11(1):31.
 101. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):293–305.
 102. Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. Cell Microbiol. 2006 Dec 1;8(12):1922–31.
 103. Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ, Descoteaux A. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. PLoS Pathog. 2009 Oct;5(10):e1000628.
 104. Pham N-K, Mouriz J, Kima PE. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. Infect Immun. 2005 Dec;73(12):8322–33.
 105. Luz NF, Andrade BB, Feijó DF, Araújo-Santos T, Carvalho GQ, Andrade D, et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. J Immunol. 2012 May 1;188(9):4460–7.
 106. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. Future Microbiol. 2015 Jan 19;10(1):111–29.
 107. Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Macrophage IL-12 Production by *Leishmania mexicana* Amastigotes: The Role of Cysteine Peptidases and the NF- κ B Signaling Pathway. J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):3297–304.
 108. Forget G, Gregory DJ, Olivier M. Proteasome-mediated degradation of STAT1 α following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. J Biol Chem. 2005 Aug 26;280(34):30542–9.
 109. Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. PLoS Pathog. 2010 Oct 14;6(10):e1001148.

110. Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microbiol.* 2014 Oct;16(10):1549–64.
111. Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol.* 2015;31(3):100–8.
112. Sterkers Y, Lachaud L, Bourgeois N, Crobu L, Bastien P, Pagès M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Mol Microbiol.* 2012 Oct 1;86(1):15–23.
113. Myler PJ. Genome structure and content. *Leishmania After Genome* Caister Acad Press Wymondham. 2008;15–28.
114. Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell.* 2003 May;11(5):1291–9.
115. Myler PJ, Sisk E, McDonagh PD, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Sunkin SM, et al. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* 2000 Oct 1;28(5):527–31.
116. Gaudenzi JG De, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* 2011 Oct 24;51:31–46.
117. Papadopoulou B, Huang X-F, Boucher N, Ois Mcnicoll F. Stage-Specific Regulation of Gene Expression in *Leishmania*. *ASM News-American Soc Microbiol.* 2003;69(6):282–8.
118. Cavalcanti DP, de Souza W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning.* 2018;2018:9603051.
119. Salavati R, Moshiri H, Kala S, Shateri Najafabadi H. Inhibitors of RNA editing as potential chemotherapeutics against trypanosomatid pathogens. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2012 Dec;2:36–46.
120. Haanstra JR, González-Marcano EB, Gualdrón-López M, Michels PAM. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016 May;1863(5):1038–48.
121. Parsons M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol.* 2004 Jun 28;53(3):717–24.
122. Miranda K, Docampo R, Grillo O, Franzen A, Attias M, Vercesi A, et al. Dynamics

- of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. *Histochem Cell Biol.* 2004 May 1;121(5):407–18.
123. Docampo R, Huang G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell Calcium.* 2015 Mar;57(3):194–202.
 124. Leroux AE, Krauth-Siegel RL. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol.* 2016 Mar;206(1–2):67–74.
 125. Carter NS, Yates P, Arendt CS, Boitz JM, Ullman B. Purine and Pyrimidine Metabolism in *Leishmania*. In: *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 141–54.
 126. Cunningham ML, Beverley SM. Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Apr 6;113(2):199–213.
 127. Yao C, Wilson ME. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. *Parasit Vectors.* 2016 Apr 12;9(1):200.
 128. Barupala DP, Dzul SP, Riggs-Gelasco PJ, Stemmler TL. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors. *Arch Biochem Biophys.* 2016;592:60–75.
 129. Alam MZ, Devalaraja S, Haldar M. The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology. *Front Immunol.* 2017;8:33.
 130. Korolnek T, Hamza I. Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Front Pharmacol.* 2014;5:126.
 131. Munro AW, Girvan HM, McLean KJ, Cheesman MR, Leys D. Heme and hemoproteins. In: *Tetrapyrroles: birth, life and death*. Landes Bioscience. Springer; 2009. p. 160–83.
 132. Chiabrando D, Mercurio S, Tolosano E. Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica.* 2014 Jun;99(6):973–83.
 133. Padmanaban G, Venkateswar V, Rangarajan PN. Haem as a multifunctional regulator. *Trends Biochem Sci.* 1989 Dec;14(12):492–6.
 134. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol.* 2014;5:61.
 135. Rytter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in

- oxidant sensitivity. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jan;28(2):289–309.
136. Schaer CA, Deuel JW, Bittermann AG, Rubio IG, Schoedon G, Spahn DR, et al. Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage. *Cell Death Differ*. 2013 Nov;20(11):1569–79.
 137. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman H-J, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001 Jan;409(6817):198–201.
 138. Thomsen JH, Etzerodt A, Svendsen P, Moestrup SK. The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:523652.
 139. Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. Heme Scavenging and the Other Facets of Hemopexin. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jan 15;12(2):305–20.
 140. Nielsen MJ, Møller HJ, Moestrup SK. Hemoglobin and Heme Scavenger Receptors. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jan 15;12(2):261–73.
 141. Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: Heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813(5):668–82.
 142. Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci*. 2010 Jun;19(6):1137–61.
 143. Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008;474(2):238–51.
 144. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006 Jul 1;1763(7):723–36.
 145. Gill AC, Darby AC, Makepeace BL. Iron Necessity: The Secret of Wolbachia's Success? Picardeau M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 16;8(10):e3224.
 146. Yoshinaga T, Sano S. Coproporphyrinogen oxidase. II. Reaction mechanism and role of tyrosine residues on the activity. *J Biol Chem*. 1980 May 25;255(10):4727–31.
 147. Grandchamp B, Phung N, Nordmann Y. The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase. *Biochem J*. 1978 Oct 15;176(1):97–102.
 148. Susa S, Daimon M, Ono H, Li S, Yoshida T, Kato T. The long, but not the short, presequence of human coproporphyrinogen oxidase is essential for its import and sorting to mitochondria. *Tohoku J Exp Med*. 2003 May;200(1):39–45.
 149. Medlock AE, Dailey HA. Human coproporphyrinogen oxidase is not a

- metalloprotein. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32507–10.
150. Martásek P, Camadro JM, Raman CS, Lecomte MC, Le Caer JP, Demeler B, et al. Human coproporphyrinogen oxidase. Biochemical characterization of recombinant normal and R231W mutated enzymes expressed in *E. coli* as soluble, catalytically active homodimers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1997 Feb;43(1):47–58.
 151. Gitter SJ, Cooper CL, Friesen JA, Jones MA. Investigation of the catalytic and structural roles of conserved histidines of human coproporphyrinogen oxidase using site-directed mutagenesis. *Med Sci Monit*. 2007;13(1):BR1-10.
 152. Labbe P. Purification and properties of coproporphyrinogen III oxidase from yeast. In 1997. p. 367–78.
 153. Phillips JD, Whitby FG, Warby CA, Labbe P, Yang C, Pflugrath JW, et al. Crystal Structure of the Oxygen-dependant Coproporphyrinogen Oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38960–8.
 154. Camadro JM, Chambon H, Jolles J, Labbe P. Purification and properties of coproporphyrinogen oxidase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 1986 May 2;156(3):579–87.
 155. Amillet JM, Buisson N, Labbe-Bois R. Positive and negative elements involved in the differential regulation by heme and oxygen of the HEM13 gene (coproporphyrinogen oxidase) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 1995 Nov;28(6):503–11.
 156. Breckau D, Mahlitz E, Sauerwald A, Layer G, Jahn D. Oxygen-dependent Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is Stimulated by Manganese. *J Biol Chem*. 2003;278(47):46625–31.
 157. Macieira S, Martins BM, Huber R. Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase from *Escherichia coli*: one-step purification and biochemical characterisation. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Sep 1;226(1):31–7.
 158. Layer G, Verfürth K, Mahlitz E, Jahn D. Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):34136–42.
 159. Rosipal R, Lamoril J, Puy H, Da Silva V, Gouya L, De Rooij FWM, et al. Systematic analysis of coproporphyrinogen oxidase gene defects in hereditary coproporphyrinemia and mutation update. *Hum Mutat*. 1999;13(1):44–53.
 160. Skotnicová P, Sobotka R, Shepherd M, Hájek J, Hrouzek P, Tichý M. The

- cyanobacterial protoporphyrinogen oxidase HemJ is a new b₅-type heme protein functionally coupled with coproporphyrinogen III oxidase. *J Biol Chem*. 2018 Aug 10;293(32):12394–404.
161. Kobayashi K, Masuda T, Tajima N, Wada H, Sato N. Molecular phylogeny and intricate evolutionary history of the three isofunctional enzymes involved in the oxidation of protoporphyrinogen IX. *Genome Biol Evol*. 2014 Aug;6(8):2141–55.
 162. Dailey TA, Meissner P, Dailey HA. Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase. *J Biol Chem*. 1994 Jan 14;269(2):813–5.
 163. Boynton TO, Daugherty LE, Dailey T a., Dailey H a. Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity. *Biochemistry*. 2009;48(29):6705–11.
 164. Koch M, Breithaupt C, Kiefersauer R, Huber R, Messerschmidt A. Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. 2004;23(8):1720–8.
 165. Patzoldt WL, Hager AG, McCormick JS, Tranel PJ. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12329–34.
 166. Whatley SD, Puy H, Morgan RR, Robreau AM, Roberts AG, Nordmann Y, et al. Variegate porphyria in Western Europe: identification of PPOX gene mutations in 104 families, extent of allelic heterogeneity, and absence of correlation between phenotype and type of mutation. *Am J Hum Genet*. 1999 Oct 1;65(4):984–94.
 167. Dailey HA, Dailey TA, Wu C-K, Medlock AE, Rose JP, Wang K-F. Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Dec;57(13):1909–26.
 168. Wu C-K, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM, Wang B-C. The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 2001 Feb 1;8(2):156–60.
 169. Gillam ME, Hunter GA, Ferreira GC. The Ultimate Step of Heme Biosynthesis: Orchestration between Iron Trafficking and Porphyrin Synthesis. *Handbook of Porphyrin Science (Volumes 26–30): With Applications To Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology And Medicine*. Vol. 6. World Scientific; 2013. 129–179 p.
 170. Dailey HA, Dailey TA, Gerdes S, Jahn D, Jahn M, O'Brian MR, et al. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiol*

- Mol Biol Rev. 2017 Mar 25;81(1):1–62.
171. Masuda T, Suzuki T, Shimada H, Ohta H, Takamiya K. Subcellular localization of two types of ferrochelatase in cucumber. *Planta*. 2003 Aug 1;217(4):602–9.
 172. Armas AM, Balparda M, Terenzi A, Busi M V, Pagani MA, Gomez-Casati DF. Ferrochelatase activity of plant frataxin. *Biochimie*. 2019 Jan;156:118–22.
 173. Ponka P, Sheftel AD, English AM, Scott Bohle D, Garcia-Santos D. Do Mammalian Cells Really Need to Export and Import Heme? *Trends Biochem Sci*. 2017 May;42(5):395–406.
 174. Wegiel B, Nemeth Z, Correa-Costa M, Bulmer AC, Otterbein LE. Heme oxygenase-1: a metabolic nuke. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Apr 10;20(11):1709–22.
 175. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jan 15;28(2):289–309.
 176. Sun J, Brand M, Zenke Y, Tashiro S, Groudine M, Igarashi K. Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 10;101(6):1461–6.
 177. Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, Evans SC, Ferguson M, Kellogg MD, et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet*. 2009 Jun 3;41(6):651–3.
 178. Lunetti P, Damiano F, De Benedetto G, Siculella L, Pennetta A, Muto L, et al. Characterization of Human and Yeast Mitochondrial Glycine Carriers with Implications for Heme Biosynthesis and Anemia. *J Biol Chem*. 2016 Sep 16;291(38):19746–59.
 179. Fernández-Murray JP, Prykhozhiy S V, Dufay JN, Steele SL, Gaston D, Nasrallah GK, et al. Glycine and Folate Ameliorate Models of Congenital Sideroblastic Anemia. *PLoS Genet*. 2016 Jan;12(1):e1005783.
 180. Bayeva M, Khechaduri A, Wu R, Burke MA, Wasserstrom JA, Singh N, et al. ATP-binding cassette B10 regulates early steps of heme synthesis. *Circ Res*. 2013 Jul 19;113(3):279–87.
 181. Seguin A, Takahashi-Makise N, Yien YY, Huston NC, Whitman JC, Musso G, et al. Reductions in the mitochondrial ABC transporter Abcb10 affect the transcriptional profile of heme biosynthesis genes. *J Biol Chem*. 2017 Sep

- 29;292(39):16284–99.
182. Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, et al. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Sep 22;106(38):16263–8.
 183. Chen W, Dailey HA, Paw BH. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):628–30.
 184. Hamdi A, Roshan T, Sheftel A, Ponka P. Further Elucidation of the Mechanism of Iron Transport Form Plasma Transferrin to Mitochondrial Ferrochelatase: Further Evidence for the “Kiss and Run” Hypothesis. *Blood*. 2014;124(21).
 185. Maio N, Kim KS, Holmes-Hampton G, Singh A, Rouault TA. Dimeric ferrochelatase bridges ABCB7 and ABCB10 homodimers in an architecturally defined molecular complex required for heme biosynthesis. *Haematologica*. 2019;haematol.2018.214320.
 186. Piel RB, Dailey HA, Medlock AE. The mitochondrial heme metabolon: Insights into the complex(ity) of heme synthesis and distribution. *Mol Genet Metab*. 2019;(October 2018):0–1.
 187. Medlock AE, Shiferaw MT, Marcero JR, Vashisht A a., Wohlschlegel J a., Phillips JD, et al. Identification of the Mitochondrial Heme Metabolism Complex. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135896.
 188. Yien YY, Robledo RF, Schultz IJ, Takahashi-Makise N, Gwynn B, Bauer DE, et al. TMEM14C is required for erythroid mitochondrial heme metabolism. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4294–304.
 189. Azuma M, Kabe Y, Kuramori C, Kondo M, Yamaguchi Y, Handa H. Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria. Herman C, editor. *PLoS One*. 2008 Aug 27;3(8):e3070.
 190. Pondarre C, Campagna DR, Antiochos B, Sikorski L, Mulhern H, Fleming MD, et al. Abcb7, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3567–9.
 191. Bekri S, Kispal G, Lange H, Fitzsimons E, Tolmie J, Lill R, et al. Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood*. 2000;96(9).

192. Piel RB, Shiferaw MT, Vashisht AA, Marcero JR, Praissman JL, Phillips JD, et al. A Novel Role for Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): A Partner and Regulator of Ferrochelatase. *Biochemistry*. 2016;55(37):5204–17.
193. Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, et al. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature*. 2006;443(7111):586–9.
194. Chavan H, Khan MMT, Tegos G, Krishnamurthy P. Efficient purification and reconstitution of ATP binding cassette transporter B6 (ABCB6) for functional and structural studies. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22658–69.
195. Kiss K, Brozik A, Kucsma N, Toth A, Gera M, Berry L, et al. Shifting the paradigm: The putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One*. 2012;7(5).
196. Helias V, Saison C, Ballif B a, Peyrard T, Takahashi J, Takahashi H, et al. ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. *Nat Genet*. 2012 Feb 15;44(2):170–3.
197. Ulrich DL, Lynch J, Wang Y, Fukuda Y, Nachagari D, Du G, et al. ATP-dependent mitochondrial porphyrin importer ABCB6 protects against phenylhydrazine toxicity. *J Biol Chem*. 2012 Apr 13;287(16):12679–90.
198. Fukuda Y, Cheong PL, Lynch J, Brighton C, Frase S, Kargas V, et al. The severity of hereditary porphyria is modulated by the porphyrin exporter and Lan antigen ABCB6. *Nat Commun*. 2016;7:12353.
199. Kabe Y, Ohmori M, Shinouchi K, Tsuboi Y, Hirao S, Azuma M, et al. Porphyrin accumulation in mitochondria is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *J Biol Chem*. 2006 Oct 20;281(42):31729–35.
200. Donegan RK, Moore CM, Hanna DA, Reddi AR. Handling heme: The mechanisms underlying the movement of heme within and between cells. *Free Radic Biol Med*. 2019 Mar 1;133:88–100.
201. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Mar;62(1):1–34.
202. Chiabrando D, Marro S, Mercurio S, Giorgi C, Petrillo S, Vinchi F, et al. The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J Clin Invest*. 2012 Dec;122(12):4569–79.
203. Taylor CS, Willett BJ, Kabat D. A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter

- superfamily. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6500–5.
204. Quigley JG, Burns CC, Anderson MM, Lynch ED, Sabo KM, Overbaugh J, et al. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood.* 2000;95(3).
 205. Yang Z, Philips JD, Doty RT, Giraudi P, Ostrow JD, Tiribelli C, et al. Kinetics and specificity of feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) export function and its dependence on hemopexin. *J Biol Chem.* 2010 Sep 10;285(37):28874–82.
 206. Mercurio S, Petrillo S, Chiabrando D, Bassi ZI, Gays D, Camporeale A, et al. The heme exporter *Flvcr1* regulates expansion and differentiation of committed erythroid progenitors by controlling intracellular heme accumulation. *Haematologica.* 2015 Jun;100(6):720–9.
 207. Sweeny EA, Singh AB, Chakravarti R, Martinez-Guzman O, Saini A, Haque MM, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a chaperone that allocates labile heme in cells. *J Biol Chem.* 2018;293(37):14557.
 208. Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2012 Apr 15;83(8):1084–103.
 209. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, et al. The Stem Cell Marker *Bcrp/ABCG2* Enhances Hypoxic Cell Survival through Interactions with Heme. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24218–25.
 210. Krishnamurthy P, Schuetz JD. The ABC Transporter *Abcg2/Bcrp*: Role in Hypoxia Mediated Survival. *BioMetals.* 2005 Aug;18(4):349–58.
 211. Zhou S, Zong Y, Ney PA, Nair G, Stewart CF, Sorrentino BP. Increased expression of the *Abcg2* transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood.* 2005 Mar 15;105(6):2571–6.
 212. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15649–54.
 213. Korolnek T, Zhang J, Beardsley S, Scheffer GL, Hamza I. Control of metazoan heme homeostasis by a conserved multidrug resistance protein. *Cell Metab.* 2014 Jun 3;19(6):1008–19.
 214. Duffy SP, Shing J, Saraon P, Berger LC, Eiden M V., Wilde A, et al. The Fowler Syndrome-Associated Protein FLVCR2 Is an Importer of Heme. *Mol Cell Biol.*

- 2010;30(22):5318–24.
215. Yuan X, Protchenko O, Philpott CC, Hamza I. Topologically conserved residues direct heme transport in HRG-1-related proteins. *J Biol Chem*. 2012 Feb 10;287(7):4914–24.
 216. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005 Sep 9;122(5):789–801.
 217. Rouault TA. The Intestinal Heme Transporter Revealed. *Cell*. 2005 Sep 9;122(5):649–51.
 218. Schaer CA, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ. Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2008 Feb 1;83(2):325–33.
 219. Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Physiol*. 2012 Jun 15;302(12):C1780–5.
 220. Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakhri S, Hider RC, Simpson RJ, McKie AT. Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *Br J Nutr*. 2009 Apr 10;101(08):1150.
 221. Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID. The intestinal absorption of folates. *Annu Rev Physiol*. 2014 Feb 10;76(1):251–74.
 222. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, et al. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*. 2008 Jun 16;453(7198):1127–31.
 223. White C, Yuan X, Schmidt PJ, Bresciani E, Samuel TK, Campagna D, et al. HRG1 Is Essential for Heme Transport from the Phagolysosome of Macrophages during Erythrophagocytosis. *Cell Metab*. 2013 Feb;17(2):261–70.
 224. Yuan X, Rietzschel N, Kwon H, Walter Nuno AB, Hanna DA, Phillips JD, et al. Regulation of intracellular heme trafficking revealed by subcellular reporters. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(35):E5144–52.
 225. Chang KP, Chang CS, Sassa S. Heme biosynthesis in bacterium-protist symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbionts. *Proc Natl Acad Sci*. 1975;72(8):2979–83.
 226. Kořený L, Lukeš J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in

- kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? *Int J Parasitol.* 2010;40(2):149–56.
227. Kořený L, Oborník M, Lukeš J. Make It, Take It, or Leave It: Heme Metabolism of Parasites. *PLoS Pathog.* 2013;9(1).
228. Sah JF, Ito H, Kolli BK, Peterson DA, Sassa S, Chang K. Genetic Rescue of *Leishmania* Deficiency in Porphyrin Biosynthesis Creates Mutants Suitable for Analysis of Cellular Events in Uroporphyrin and for Photodynamic Therapy. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):14902–9.
229. Akilov OE, Kosaka S, O’Riordan K, Hasan T. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol.* 2007 Aug;16(8):651–60.
230. Alves JMP, Voegtly L, Matveyev A V., Lara AM, Silva FM da, Serrano MG, et al. Identification and Phylogenetic Analysis of Heme Synthesis Genes in Trypanosomatids and Their Bacterial Endosymbionts. *PLoS One.* 2011;6(8):e23518.
231. Koreny L, Sobotka R, Kovarova J, Gnipova A, Flegontov P, Horvath A, et al. Aerobic kinetoplastid flagellate *Phytomonas* does not require heme for viability. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Mar 6;109(10):3808–13.
232. Cenci U, Moog D, Curtis BA, Tanifuji G, Eme L, Lukeš J, et al. Heme pathway evolution in kinetoplastid protists. *BMC Evol Biol.* 2016 Dec 18;16(1):109.
233. Tripodi KEJ, Menendez Bravo SM, Cricco JA. Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatid Essential Metabolic Pathways. *Enzyme Res.* 2011;2011:1–12.
234. Adak S, Pal S. Ascorbate Peroxidase Acts As a Novel Determiner of Redox Homeostasis in *Leishmania*. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(7):746–54.
235. Chen JJ. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: Relevance to anemias. *Blood.* 2007;109(7):2693–9.
236. da Silva Augusto L, Moretti NS, Ramos TCP, de Jesus TCL, Zhang M, Castilho BA, et al. A Membrane-bound eIF2 Alpha Kinase Located in Endosomes Is Regulated by Heme and Controls Differentiation and ROS Levels in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):1–27.
237. Lara FA, Sant’Anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho MGP, Reis Salles I, et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(1):16–22.

238. Ciccarelli A, Araujo L, Batlle A, Lombardo E. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2007 Jul 22;134(07):959.
239. Pal JK, Joshi-Purandare M. Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. *J Biosci*. 2001 Jun;26(2):225–31.
240. Krishnamurthy G, Vikram R, Singh SB, Patel N, Agarwal S, Mukhopadhyay G, et al. Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5884–91.
241. Huynh C, Yuan X, Miguel DC, Renberg RL, Protchenko O, Philpott CC, et al. Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog*. 2012;8(7):36.
242. Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, García-Hernández R, Pérez-Victoria I, Castanys S, Gamarro F, et al. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol Microbiol*. 2011;79(6):1430–44.
243. Galbraith RA, McElrath MJ. Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988;29(1):47–53.
244. Miguel DC, Flannery AR, Mittra B, Andrews NW. Heme Uptake Mediated by LHR1 Is Essential for *Leishmania amazonensis* Virulence. Flynn JL, editor. *Infect Immun*. 2013 Oct;81(10):3620–6.
245. Renberg RL, Yuan X, Samuel TK, Miguel DC, Hamza I, Andrews NW, et al. The Heme Transport Capacity of LHR1 Determines the Extent of Virulence in *Leishmania amazonensis*. Jardim A, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 May 22;9(5):e0003804.
246. Agarwal S, Rastogi R, Gupta D, Patel N, Raje M, Mukhopadhyay A. Clathrin-mediated hemoglobin endocytosis is essential for survival of *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2013;1833(5):1065–77.
247. Sengupta S, Tripathi J, Tandon R, Raje M, Roy RP, Basu SK, et al. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket. *J Biol Chem*. 1999;274(5):2758–65.
248. Carvalho S, Cruz T, Santarém N, Castro H, Costa V, Tomás AM. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Trop*. 2009 Feb;109(2):131–5.
249. Cabello-Donayre M, Malagarie-Cazenave S, Campos-Salinas J, Gálvez FJ, Rodríguez-Martínez A, Pineda-Molina E, et al. Trypanosomatid parasites rescue

- heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters. *Mol Microbiol.* 2016;101(6).
250. Campos-salinas J, Cabello-donayre M, García-hernández R, Pérez-victoria I, Castanys S, Gamarro F, et al. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. 2011;79(January):1430–44.
 251. Martínez-García M, Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, Pineda-Molina E, Gálvez FJ, Orrego LM, et al. LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis. *Parasites and Vectors.* 2016;9(1).
 252. Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 2006;22(10):484–91.
 253. Dauchy F-A, Bonhivers M, Landrein N, Dacheux D, Courtois P, Lauruol F, et al. Trypanosoma brucei CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model. Raper J, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Nov 17;10(11):e0005125.
 254. Vanhollebeke B, De Muylder G, Nielsen MJ, Pays A, Tebabi P, Dieu M, et al. A Haptoglobin-Hemoglobin Receptor Conveys Innate Immunity to Trypanosoma brucei in Humans. *Science (80-)*. 2008 May 2;320(5876):677–81.
 255. Vanhollebeke B, Pays E. The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Mol Microbiol.* 2010 Apr 1;76(4):806–14.
 256. Vanhollebeke B, Nielsen MJ, Watanabe Y, Truc P, Vanhamme L, Nakajima K, et al. Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 6;104(10):4118–23.
 257. Horáková E, Changmai P, Vancová M, Sobotka R, Van Den Abbeele J, Vanhollebeke B, et al. The Trypanosoma brucei TbHrg protein is a heme transporter involved in the regulation of stage-specific morphological transitions. *J Biol Chem.* 2017 Apr 28;292(17):6998–7010.
 258. Salzman TA, Stella AM, Wider de Xifra EA, Batlle AM, Docampo R, Stoppani AO. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in Trypanosoma cruzi. *Comp Biochem Physiol B.* 1982;72(4):663–7.
 259. Salzman TA, Batlle AM, de Souza W. Heme synthesis in Trypanosoma cruzi: influence of the strain and culture medium. *Comp Biochem Physiol B.* 1986;83(1):57–61.

260. Lombardo ME, Araujo LS, Batlle A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Aug 1;35(8):1263–71.
261. Merli ML, Pagura L, Hernández J, Barisón MJ, Pral EMF, Silber AM, et al. The *Trypanosoma cruzi* Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):1–18.
262. Cupello MP, Souza CF, Menna-Barreto RF, Nogueira NPA, Laranja GAT, Sabino KCC, et al. Trypanosomatid essential metabolic pathway: New approaches about heme fate in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;449(2):216–21.
263. Dutta S, Furuyama K, Sassa S, Chang K-P. *Leishmania* spp.: Delta-aminolevulinic acid-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway. *Exp Parasitol.* 2008 Apr;118(4):629–36.
264. Chang CS, Chang KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1985 Sep;16(3):267–76.
265. Zwerschke D, Karrie S, Jahn D, Jahn M. *Leishmania major* possesses a unique HemG-type protoporphyrinogen IX oxidase. *Biosci Rep.* 2014;34(4):391–400.
266. Opperdoes FR, Michels PAM. The metabolic repertoire of *Leishmania* and implications for drug discovery. *Leishmania, after the Genome.* 2008;123–58.
267. Lechuga GC, Pereira MCS, Bourguignon SC. Heme metabolism as a therapeutic target against protozoan parasites. *J Drug Target.* 2018 Oct 31;1–13.
268. Toh SQ, Glanfield A, Gobert GN, Jones MK. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasit Vectors.* 2010 Nov 18;3:108.
269. Ghedin E, Wang S, Spiro D, Caler E, Zhao Q, Crabtree J, et al. Draft Genome of the Filarial Nematode Parasite *Brugia malayi*. *Science (80-).* 2007 Sep 21;317(5845):1756–60.
270. Wu B, Novelli J, Foster J, Vaisvila R, Conway L, Ingram J, et al. The heme biosynthetic pathway of the obligate *Wolbachia* endosymbiont of *Brugia malayi* as a potential anti-filarial drug target. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(7):1–10.
271. Wu B, Novelli J, Jiang D, Dailey HA, Landmann F, Ford L, et al. Interdomain lateral gene transfer of an essential ferrochelatase gene in human parasitic nematodes. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 May 7;110(19):7748–53.
272. Goldberg DE, Sigala PA. *Plasmodium* heme biosynthesis: To be or not to be

- essential? PLOS Pathog. 2017 Sep 28;13(9):e1006511.
273. Ke H, Sigala PA, Miura K, Morrissey JM, Mather MW, Crowley JR, et al. The Heme Biosynthesis Pathway Is Essential for Plasmodium falciparum Development in Mosquito Stage but Not in Blood Stages. J Biol Chem. 2014 Dec 12;289(50):34827–37.
 274. Nagaraj VA, Sundaram B, Varadarajan NM, Subramani PA, Kalappa DM, Ghosh SK, et al. Malaria Parasite-Synthesized Heme Is Essential in the Mosquito and Liver Stages and Complements Host Heme in the Blood Stages of Infection. Mota MM, editor. PLoS Pathog. 2013 Aug 1;9(8):e1003522.
 275. Lwoff M. Remarques sur la nutrition des Trypanosomides et des bactéries parahémotrophes le “fer actif” de baudisch. Ann Inst Pasteur. 1933;51:703–7.
 276. Kelly JX, Ignatushchenko M V, Bouwer HG, Peyton DH, Hinrichs DJ, Winter RW, et al. Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. Mol Biochem Parasitol. 2003 Jan;126(1):43–9.
 277. Lechuga GC, Borges JC, Calvet CM, de Araújo HP, Zuma AA, do Nascimento SB, et al. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against Trypanosoma cruzi. Int J Parasitol Drugs drug Resist. 2016;6(3):154–64.
 278. Cupello MP, Souza CF de, Buchensky C, Soares JBRC, Laranja GAT, Coelho MGP, et al. The heme uptake process in Trypanosoma cruzi epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. Acta Trop. 2011 Dec 1;120(3):211–8.
 279. Mottram J. Protocols for handling and working with Leishmania species. Mottram Lab. 2008;2–31.
 280. Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of Leishmania major promastigotes. J Immunol. 1985 Jul 1;135(1):564–9.
 281. Sasarman A, Chartrand P, Lavoie M, Tardif D, Proschek R, Lapointe C. Mapping of a New hem Gene in Escherichia coli K12. J Gen Microbiol. 1979 Aug 1;113(2):297–303.
 282. Nakahigashi K, Nishimura K, Miyamoto K, Inokuchi H. Photosensitivity of a protoporphyrin-accumulating, light-sensitive mutant (visA) of Escherichia coli K-12. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(23):10520–4.
 283. Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol. 2002;350:87–96.

284. Sollelis L, Ghorbal M, MacPherson CR, Martins RM, Kuk N, Crobu L, et al. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell Microbiol.* 2015 Oct;17(10):1405–12.
285. Beneke T, Madden R, Makin L, Valli J, Sunter J, Gluenz E. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci.* 2017 May 3;4(5):170095.
286. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975 Nov 5;98(3):503–17.
287. McLatchie AP, Burrell-Saward H, Myburgh E, Lewis MD, Ward TH, Mottram JC, et al. Highly Sensitive In Vivo Imaging of *Trypanosoma brucei* Expressing “Red-Shifted” Luciferase. Raper J, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Nov 21;7(11):e2571.
288. Mitra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *J Exp Med.* 2013;210(2):401–16.
289. Molina R. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res Rev Parasitol.* 1991;51(1–4):87–9.
290. Molina R, Jiménez M, Alvar J, González E, Hernández-Taberna S, Ines MM. *Methods in Sand Fly Research.* Madrid, Spain Serv Publicaciones Univ Alcalá Henares. 2017;1–109.
291. Gómez MA, Navas A, Márquez R, Rojas LJ, Vargas DA, Blanco VM, et al. *Leishmania panamensis* infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: Impact on intracellular parasite survival. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):139–49.
292. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011 Oct 11;7(1):539.
293. Holm L, Rosenström P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul;38(Web Server issue):W545-9.
294. Nagaraj VA, Prasad D, Arumugam R, Rangarajan PN, Padmanaban G. Characterization of coproporphyrinogen III oxidase in *Plasmodium falciparum* cytosol. *Parasitol Int.* 2010;59(2):121–7.
295. Boynton TO, Daugherty LE, Dailey TA, Dailey HA. Identification of *Escherichia*

- coli HemG as a Novel, Menadione-Dependent Flavodoxin with Protoporphyrinogen Oxidase Activity. *Biochemistry*. 2009 Jul 28;48(29):6705–11.
296. Parish T, Schaeffer M, Roberts G, Duncan K. HemZ is essential for heme biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2005 May;85(3):197–204.
297. Ben Yaakov D, Rivkin A, Mircus G, Albert N, Dietl A-M, Kovalerchick D, et al. Identification and characterization of haemofungin, a novel antifungal compound that inhibits the final step of haem biosynthesis. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr;71(4):946–52.
298. Ferreira GC, Hunter GA. Ferrochelatase Structure and Reaction Mechanism. In: *Handbook of Porphyrin Science*. World Scientific Publishing Company; 2011. p. 49–121. (*Handbook of Porphyrin Science*; vol. Volume 15).
299. Hansson MD, Karlberg T, Rahardja MA, Al-Karadaghi S, Hansson M. Amino Acid Residues His183 and Glu264 in *Bacillus subtilis* Ferrochelatase Direct and Facilitate the Insertion of Metal Ion into Protoporphyrin IX. *Biochemistry*. 2007 Jan 9;46(1):87–94.
300. Krnáčová K, Vesteg M, Hampl V, Vlček Č, Horváth A. *Euglena gracilis* and Trypanosomatids Possess Common Patterns in Predicted Mitochondrial Targeting Presequences. *J Mol Evol*. 2012 Oct 12;75(3–4):119–29.
301. Claros MG, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*. 1996 Nov 1;241(3):779–86.
302. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002 Nov 1;2(11):845–58.
303. Burchmore RJS, Barrett MP. Life in vacuoles - Nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol*. 2001;31(12):1311–20.
304. Dutta S, Kolli BK, Tang A, Sassa S, Chang K-P. Transgenic *Leishmania* model for delta-aminolevulinate-inducible monospecific uroporphyrin: cytolytic phototoxicity initiated by singlet oxygen-mediated inactivation of proteins and its ablation by endosomal mobilization of cytosolic uroporphyrin. *Eukaryot Cell*. 2008 Jul;7(7):1146–57.
305. Tiwari K, Dubey VK. Fresh insights into the pyrimidine metabolism in the trypanosomatids. *Parasit Vectors*. 2018 Dec 8;11(1):87.

306. Dillon LAL, Okrah K, Hughitt K V., Suresh R, Li Y, Fernandes MC, et al. Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(14):6799–813.
307. Inbar E, Hughitt VK, Dillon LAL, Ghosh K, El-Sayed NM, Sacks DL. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. *MBio.* 2017 May 3;8(2).
308. Fernandes MC, Dillon LAL, Belew AT, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Dual Transcriptome Profiling of *Leishmania* -Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. *MBio.* 2016 Jul 6;7(3).
309. Rastrojo A, Carrasco-Ramiro F, Martín D, Crespillo A, Reguera RM, Aguado B, et al. The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: Transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics.* 2013;14(1):1–13.
310. Jardim A, Hardie DB, Boitz J, Borchers CH. Proteomic Profiling of *Leishmania donovani* Promastigote Subcellular Organelles. *J Proteome Res.* 2018;17(3):1194–215.
311. Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley SM, Volf P. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jan 12;4(1):e580.
312. Sacks D, Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001 Oct;55(1):453–83.
313. Sant’Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, de Souza W, Almeida IC, et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics.* 2009 Apr;9(7):1782–94.
314. Opperdoes FR, Coombs GH. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol.* 2007 Apr;23(4):149–58.
315. Mcghee RB, Cosgrove WB. Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* 1980;44(1):140–73.
316. Jiménez MI, López-Vélez R, Molina R, Cañavate C, Alvar J. HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *Lancet.* 1996 Jan 27;347(8996):264–5.
317. Morio F, Reynes J, Dollet M, Pratlong F, Dedet J-P, Ravel C. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin*

- Microbiol. 2008 Nov;46(11):3845–7.
318. Ghobakhloo N, Motazedian MH, Naderi S, Ebrahimi S. Isolation of *Crithidia* spp. from lesions of immunocompetent patients with suspected cutaneous leishmaniasis in Iran. *Trop Med Int Heal*. 2018 Dec 10;24(1):116–26.
 319. Srivastava P, Prajapati VK, Vanaerschot M, Van der Auwera G, Dujardin JC, Sundar S. Detection of *Leptomonas* sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. *Infect Genet Evol*. 2010 Oct;10(7):1145–50.
 320. Ghosh S, Banerjee P, Sarkar A, Datta S, Chatterjee M. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2012 Aug 1;50(8):2774–8.
 321. Yurchenko V, Votýpka J, Lukeš J, Týč J, Skalický T. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol*. 2014;195(2):115–22.
 322. Goto Y, Cheng J, Omachi S, Morimoto A. Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2017 Feb 7;116(2):457–64.
 323. Thakur AK, Bimal S, Singh SK, Gupta AK, Das VNR, Das P, et al. Degree of anemia correlates with increased utilization of heme by *Leishmania donovani* parasites in visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013 Nov;135(3):595–8.
 324. Saha S, Basu M, Guin S, Gupta P, Mitterstiller A-M, Weiss G, et al. *Leishmania donovani* Exploits Macrophage Heme Oxygenase-1 To Neutralize Oxidative Burst and TLR Signaling-Dependent Host Defense. *J Immunol*. 2019 Feb 1;202(3):827–40.
 325. Neu C, Sedlag A, Bayer C, Förster S, Crauwels P, Niess J-H, et al. CD14-dependent monocyte isolation enhances phagocytosis of *listeria monocytogenes* by proinflammatory, GM-CSF-derived macrophages. Coers J, editor. *PLoS One*. 2013 Jun 11;8(6):e66898.
 326. Vikeved E, Backlund A, Alsmark C. The Dynamics of Lateral Gene Transfer in Genus *Leishmania* - A Route for Adaptation and Species Diversification. Myler PJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 5;10(1):e0004326.
 327. Bonday ZQ, Taketani S, Gupta PD, Padmanaban G. Heme biosynthesis by the malarial parasite. Import of delta-aminolevulinate dehydrase from the host red cell. *J Biol Chem*. 1997 Aug 29;272(35):21839–46.
 328. Nagaraj VA, Padmanaban G. Insights on Heme Synthesis in the Malaria Parasite. *Trends Parasitol*. 2017 Aug;33(8):583–6.
 329. Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing

- luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboured macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol.* 2005 Mar;7(3):383–92.
330. Claes F, Vodnala SK, van Reet N, Boucher N, Lunden-Miguel H, Baltz T, et al. Bioluminescent Imaging of *Trypanosoma brucei* Shows Preferential Testis Dissemination Which May Hamper Drug Efficacy in Sleeping Sickness. Tschudi C, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Jul 21;3(7):e486.
331. Myburgh E, Coles JA, Ritchie R, Kennedy PGE, McLatchie AP, Rodgers J, et al. In Vivo Imaging of Trypanosome-Brain Interactions and Development of a Rapid Screening Test for Drugs against CNS Stage Trypanosomiasis. Raper J, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Aug 22;7(8):e2384.
332. Beneke T, Gluenz E. LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. In: *Leishmania*. Springer; 2019. p. 189–210.
333. Lander N, Chiurillo MA. State-of-the-art CRISPR/Cas9 Technology for Genome Editing in Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol.* 2019;0–3.
334. Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Aug 1;47(8):2397–403.
335. Seifert K, Pérez-Victoria FJ, Stettler M, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F, et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30(3):229–35.
336. Branche C, Kohl L, Toutirais G, Buisson J, Cosson J, Bastin P. Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. *J Cell Sci.* 2006 Aug 15;93(3):491–500.

Anexos

ANEXO I: Generación y validación de una línea de *L. major* bioluminiscente

La bioluminiscencia *in vivo* representa una técnica novedosa para el estudio de las infecciones causadas por parásitos tripanosomátidos en modelos murinos, ya que permite evaluar la diseminación de los parásitos a diferentes órganos y la progresión de la enfermedad en tiempo real. Adicionalmente, una de las grandes ventajas de esta técnica es que la señal detectada puede ser correlacionada con la carga parasitaria, proporcionando una herramienta simple y no invasiva de cuantificar los efectos de un tratamiento terapéutico o inclusive evaluar la capacidad de parásitos genéticamente modificados para establecer enfermedad.

Recientemente se describió un nuevo modelo de bioluminiscencia *in vivo* basado en parásitos de *T. brucei* expresando una proteína reportera luciferasa optimizada, denominada *PpyRE9H*, la cual permitió detectar hasta 100 parásitos de *T. brucei* en ratones infectados intraperitonealmente, con una correlación directa entre la carga parasitaria y la señal bioluminiscente (287). La mayoría de los estudios de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* previamente publicados en tripanosomátidos han usado proteínas reporteras luciferasa que emiten luz en el rango 480-560 nm (329–331), la cual concide con la región del espectro donde la absorción de la luz por la hemoglobina es máxima, ocasionando la disminución de la señal cuando los parásitos alcanzan tejidos profundos. Sin embargo, *PpyRE9H* es una luciferasa obtenida de *Photinus pyrales* que ha sido mutada para la emisión de luz a un longitud de onda de 617 nm (“Red-Shifted”), evitando la pérdida de sensibilidad causada por la hemoglobina (287).

El gen de la luciferasa *PpyRE9H* fue integrado en el locus 18S rRNA de *L. major* utilizando el vector pLEXY-bsd2.1, tal como se describe en el apartado 3.8 de materiales y métodos, para la obtención de parásitos bioluminiscentes. La correcta integración de dicho gen fue confirmado mediante PCR utilizando los pares de oligonucleótidos F3001-A1715 y F3002-H4895, los cuales amplifican un fragmento de 1.6 kb de la región 5' ssu-utr1 y 2.2 kb de la región bsd-3' ssu, respectivamente (Figura S1). La línea transgénica resultante fue denominada *L. major* LucRE9.

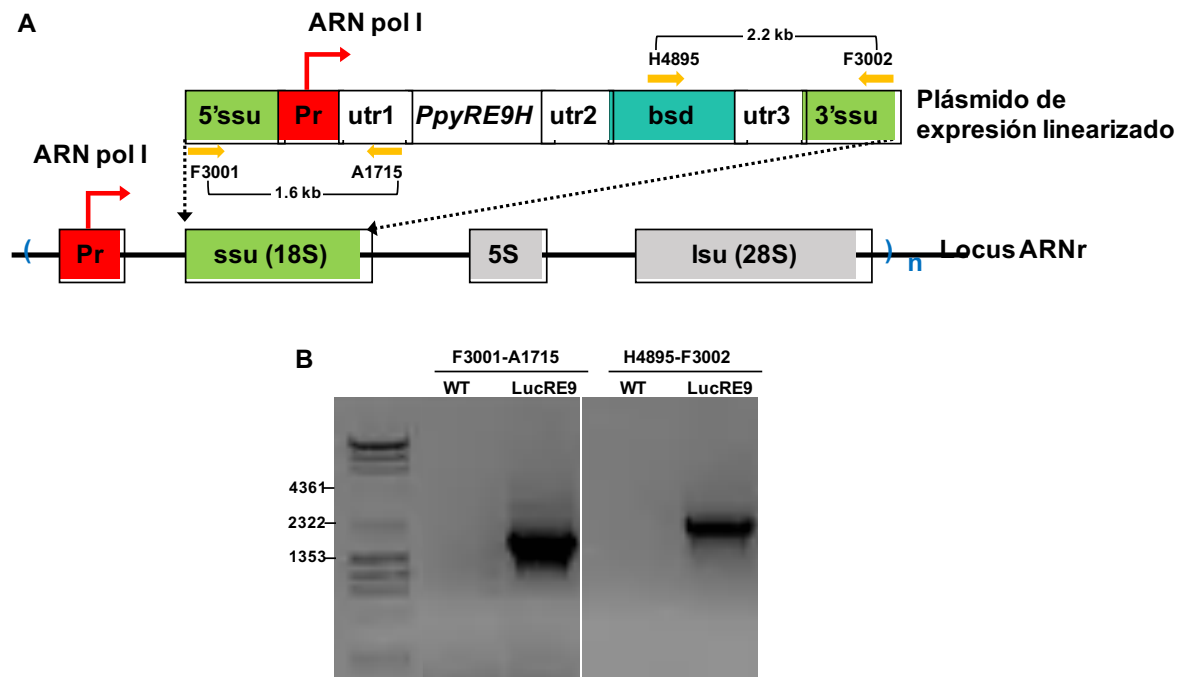


Figura S1. A) Esquema de la estructura del locu18S rRNA en donde se realizó la integración del gen *PpyRE9H* utilizando el vector de expresión pLEXSY conteniendo el cassette de resistencia a blasticidina (*bsd*). Se indican en la figura los oligonucleótidos utilizados para la confirmación por PCR y los fragmentos esperados en cada caso. B) PCR a partir de de ADN genómico confirmando la integración del gen *PpyRE9* en el locus 18S rRNA de *L. major*.

Para determinar si la integración y la expresión de la proteína reportera afectaba el crecimiento parasitario, se realizaron curvas parasitarias de los promastigotes de la línea *L. major* LucRE9 y los parásitos WT. Para ello, los promastigotes fueron ajustados a una concentración inicial de 10^6 parásitos/mL y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 5 días. Como se observa en la figura S2, no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento de la línea LucRE9 en comparación con los parásitos WT de *L. major*, indicando que la proteína *PpyRE9H* no altera la proliferación de los parásitos.

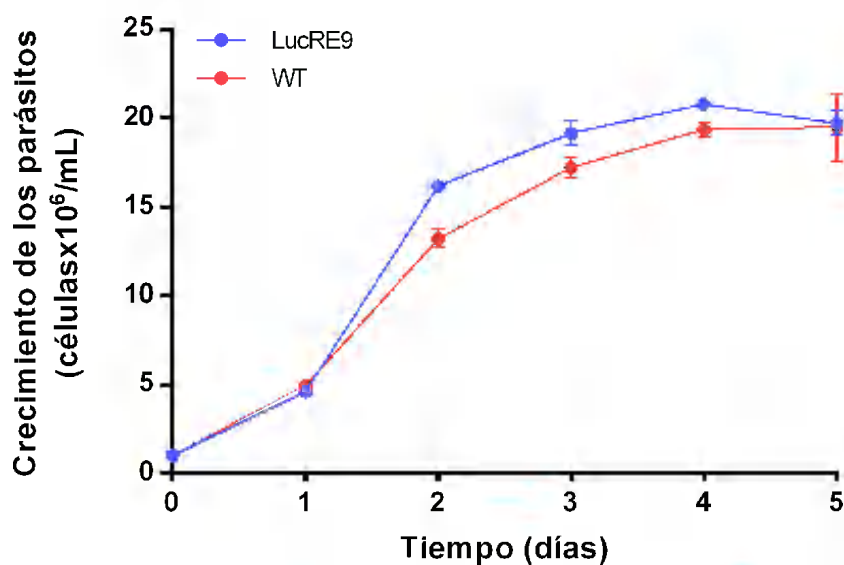


Figura S2. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* LucRE9 y WT. Los promastigotes fueron ajustados a una concentración inicial de 10^6 parásitos/mL en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 5 días. Los experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Posteriormente, para evaluar si existía una correlación lineal entre el número de promastigotes de la línea LucRE9 y la actividad luciferasa *in vitro* detectada por ambos equipos a utilizar, lector de microplacas TECAN[®] y el equipo de imagen *in vivo* IVIS Spectrum (Perkin Elmer), se midieron los valores de luminiscencia emitidos por concentraciones decrecientes de promastigotes. Para ello, se realizaron 5 diluciones seriadas (1:4) de los promastigotes de *L. major* LucRE9 en placas de 96 pocillos por triplicado, y posteriormente fueron lisados mediante congelación a -80 °C con el tampón de lisis contenido en el kit Luciferase Assay System (Promega). Tras 40 minutos de incubación, las placas fueron descongeladas a temperatura ambiente y se adicionaron a cada pocillo 30 μ L del sustrato de luciferasa para la medición de los valores de luminiscencia utilizando un lector de microplacas TECAN[®]. El análisis de regresión lineal de los valores obtenidos, indica que existe una correlación lineal entre el nivel de luminiscencia detectado por el equipo y el número de promastigotes ($R^2=0.999$), con un límite de detección de aproximadamente 500 parásitos (Figura S3A). Por su parte, para evaluar la actividad luciferasa en el equipo de imagen *in vivo* IVIS Spectrum (Perkin Elmer), los promastigotes fueron sembrados en placas de 96 pocillos en concentraciones decrecientes y la actividad luciferasa fue medida directamente sobre los pocillos conteniendo los parásitos vivos. El límite de detección de luminiscencia del equipo IVIS

fue de aproximadamente 10^5 promastigotes (Figura S3B). En ambos casos se utilizaron parásitos WT como control.

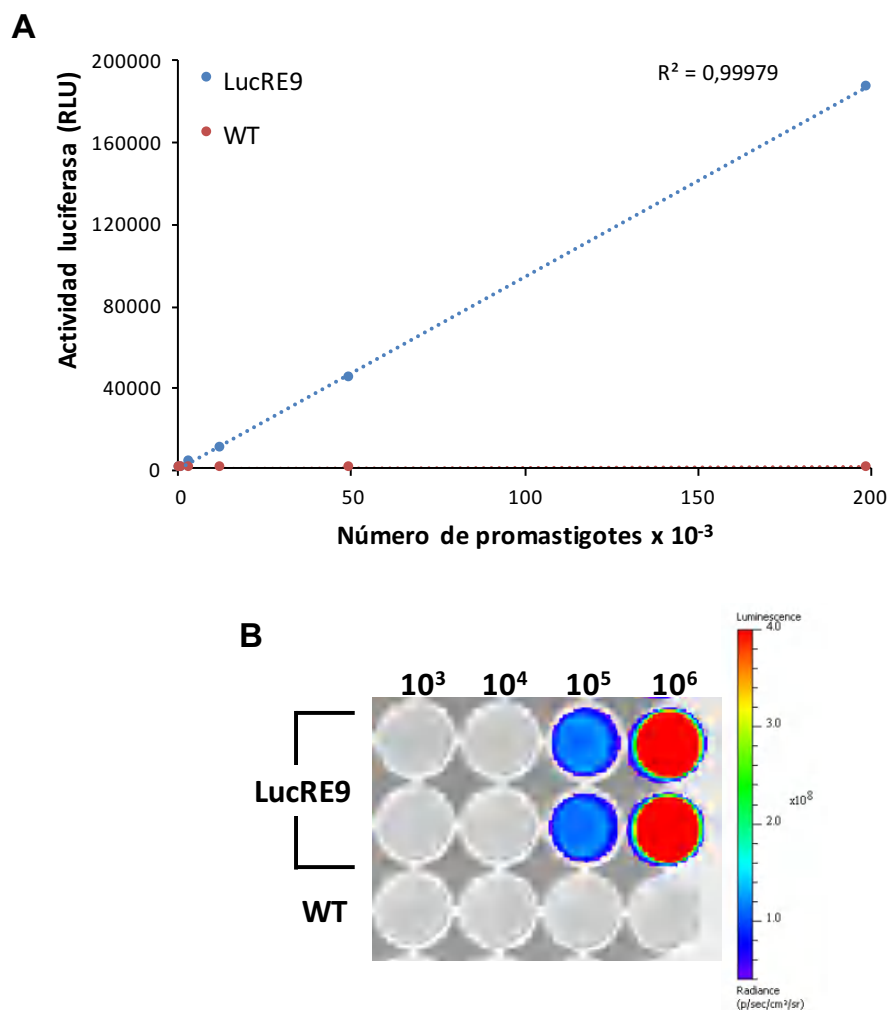


Figura S3. Correlación entre la actividad luciferasa y el número de parásitos. Los parásitos fueron contados microscópicamente en cámara de Neubauer y se realizaron diluciones seriadas para la determinación de luminiscencia en el luminómetro TECAN[®] (A) y el IVIS Spectrum (B).

Para determinar el límite de detección *in vivo*, se infectaron ratones BALB/c subcutáneamente en la pata posterior derecha con diferentes concentraciones de promastigotes de *L. major* LucRE9 en fase estacionaria de crecimiento. Una semana después de la infección, tras la cual los promastigotes se han transformado a amastigotes, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con D-luciferina (150 mg/kg) y posteriormente anestesiados con isoflurano al 2.5% para la obtención de las imágenes de las patas infectadas tanto en posición ventral como dorsal. Las imágenes fueron obtenidas 10 minutos después de la inyección del sustrato, tiempo en el cual se observó

la estabilización de la luminiscencia. La señal de luminiscencia fue detectada en todos los ratones, incluso en aquel infectado con la menor carga parasitaria (10^4), y fue posible observar diferencias en la señal a pesar de que la inflamación de las patas infectadas era similar (Figura S4A). A la semana 4 post-infección, en la cual los ratones presentan una considerable inflamación en las patas infectadas, se midió nuevamente la señal y se observó una correlación positiva entre la luminiscencia emitida y el número inicial de parásitos inoculados en los ratones, indicando que la luminiscencia del tejido infectado es proporcional a la cantidad de amastigotes presentes y que además se corresponde con el grado de inflamación de la pata (Figura S4B). Por lo tanto, las cargas parasitarias de ratones infectados con la línea *L. major* LucRE9 pueden ser evaluadas en tiempo real durante la evolución de la infección a partir de la luminiscencia emitida por los amastigotes presentes en los tejidos infectados.

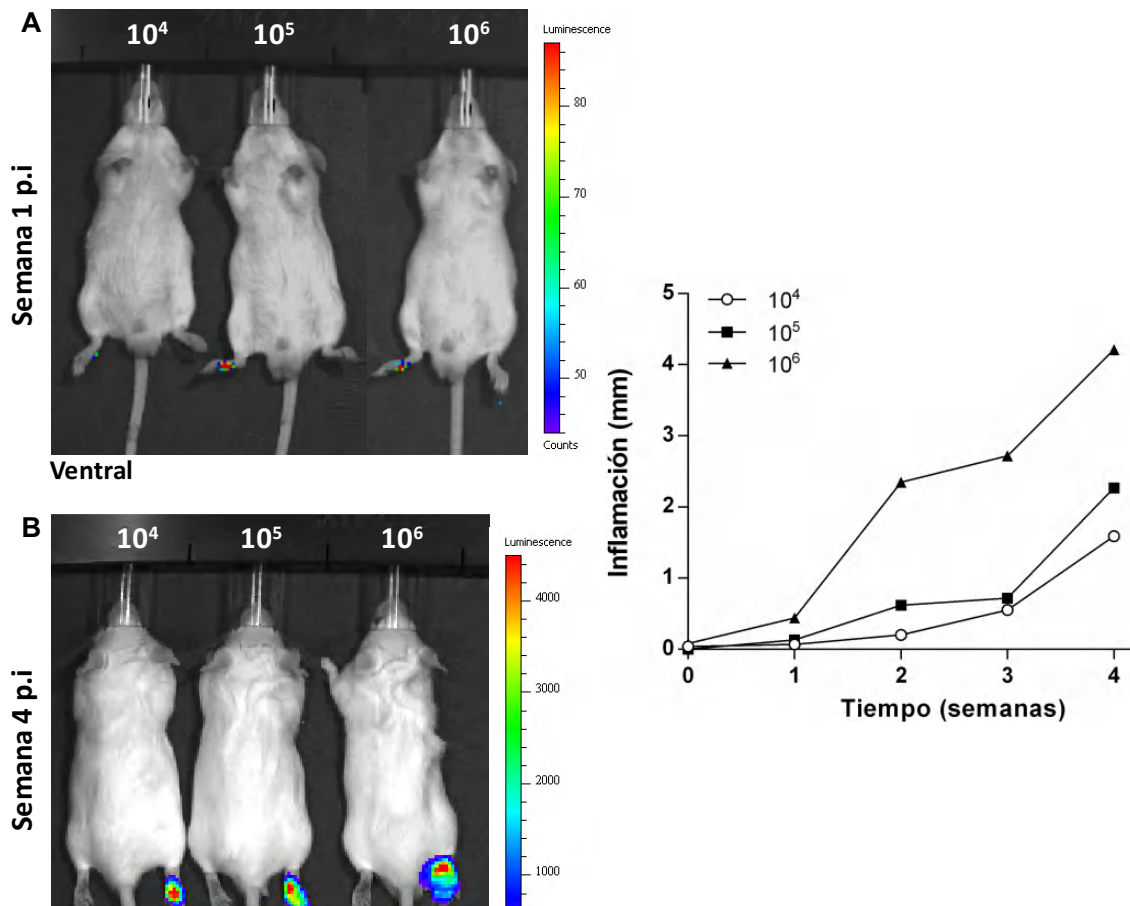


Figura S4. Evaluación *in vivo* de la actividad luciferasa de la línea de *L. major* LucRE9. Los ratones fueron infectados con 10^4 , 10^5 y 10^6 promastigotes en fase estacionaria y las imágenes fueron capturadas tras (A) una semana y (B) cuatro semanas después de la infección. C) Progresión de la inflamación monitoreada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada).

Lo anterior además nos permite indicar que la expresión de la proteína reportera LucRE9 no afecta la virulencia de los parásitos de *L. major*, ya que la inflamación de las patas infectadas alcanzan valores similares a los observados en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio utilizando parásitos *L. major* WT.

ANEXO II: Generación y validación de líneas de *L. major* para edición genética empleando el sistema CRISPR-Cas9

La manipulación genética de los parásitos tripanosomátidos se ha basado tradicionalmente en la recombinación homóloga de largos fragmentos de ADN generados mediante clonación, requiriendo brazos de homología de más de 300 nucleótidos para lograr una integración eficiente de ADN exógeno en el genoma de los parásitos. Este enfoque metodológico es bastante laborioso y ha permitido dilucidar la función de sólo 200 genes de los cerca de 9000 presentes en el genoma de *Leishmania* (332). Desde la aparición de la tecnología CRISPR-Cas9, la manipulación genética de los parásitos tripanosomátidos ha mejorado notablemente dada la facilidad y rapidez de la técnica. Como consecuencia, la edición del genoma utilizando esta herramienta está desempeñando un papel clave en el estudio funcional de proteínas, la caracterización de vías metabólicas, la validación de nuevos blancos terapéuticos y el estudio de la biología básica y la patogénesis de estos parásitos (333).

En el presente trabajo implementamos en nuestro laboratorio dos de los tres sistemas de CRISPR-Cas9 disponibles hasta la fecha para la edición genética de *Leishmania*, gracias a los cuales fue posible determinar la funcionalidad de la ruta de síntesis de hemo en *L. major*, y por los que será posible seguir evaluando la esencialidad de otras proteínas involucradas con el metabolismo del grupo hemo que puedan constituir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis.

1. Estrategia CRISPR-Cas9 basada en plásmidos

En el año 2015 fue publicado el primer estudio de edición genética en *Leishmania* empleando la tecnología CRISPR-Cas9, en el cual se emplearon dos plásmidos para la delección del locus PFR2 (Paraflagellar Rod-2) (284). El plásmido pTCas9 contiene el gen de la endonucleasa Cas9 junto con el péptido señal de localización nuclear y tres etiquetas FLAG, el cual es expresado bajo el promotor de la Dihidrofolato Reductasa-Timidilato Sintasa (DHFR-TS). Adicionalmente contiene un cassette de resistencia a higromicina para la selección de los clones de parásitos transfectados exitosamente con el plásmido (Figura S5A). El plásmido donador pLS7 contiene cassette de resistencia a puomicina flanqueado por las regiones de homología del gen que se desea deleccionar, y el ADN molde

para la transcripción *in vivo* del ARNg utilizando la maquinaria de transcripción del parásito basado en el promotor U6snRNA (Figura S5B) (284).

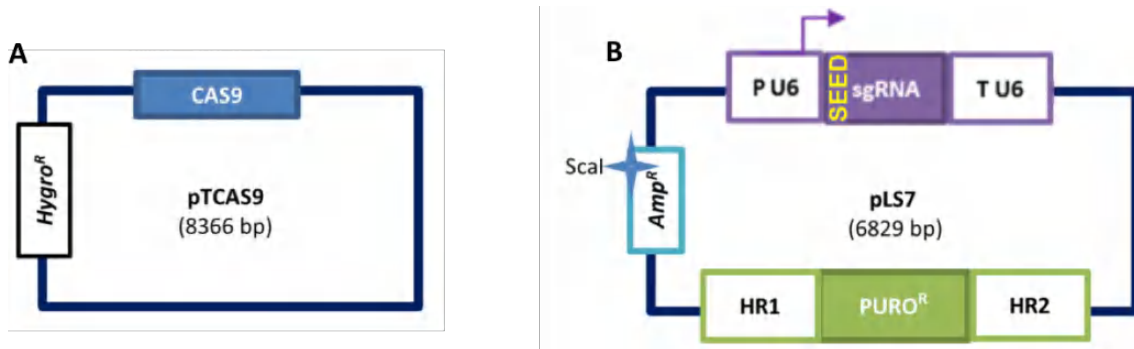


Figura S5. Estrategia CRISPR-Cas9 para la delección de genes mediante transfección de plásmidos. A) El plásmido pTCas9 contiene el gen de la endonucleasa Cas9 (azul) expresado bajo el promotor DHFR-TS y el cassette de resistencia a higromicina (Hygro^R). B) El plásmido donador pLS7 contiene el cassette de resistencia a puomicina (verde) flanqueado por regiones de homología (HR) del gen a deleccionar, el cassette de expresión del ARNg bajo el promotor U6snRNA (púrpura) y un sitio *Scal* para la linearización del plásmido. Imagen tomada de (284).

Los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica fueron transfectados con el plásmido pTCas9 y seleccionados en medio de cultivo sólido suplementado con higromicina, tras lo cual se evaluó la correcta expresión de la proteína en clones resistentes al fármaco mediante Western blot, tal como se describe en el apartado 3.6.1.1 de materiales y métodos. Como se observa en la figura S6, los tres clones evaluados expresaron correctamente la proteína Cas9.

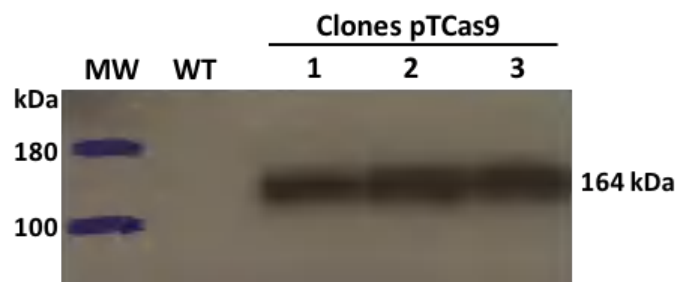


Figura S6. Análisis de la expresión de la endonucleasa Cas9 mediante Western blot. Proteínas totales obtenidas de lisados de parásitos *L. major* WT o transfectados con el plásmido pTCas9 (clones 1, 2, 3) fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. La membrana fue incubada durante 1 hora con el anticuerpo primario anti-FLAG (1:2000) y tras lavados con PBS-T incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa (1:10000) durante una hora. La membrana se reveló con el sustrato quimioluminiscente ECL (Pierce).

Se seleccionó aleatoriamente el clon 2 expresando la proteína Cas9 para continuar con los experimentos, la cual se denominó *L. major* Cas9. Para determinar si la expresión episomal de la proteína Cas9 afectaba el crecimiento de los promastigotes en cultivo *in vitro* se realizaron curvas de crecimiento de la línea *L. major* Cas9 y los parásitos WT, observando que en ambos casos se obtuvo un perfil de crecimiento similar (Figura S7).

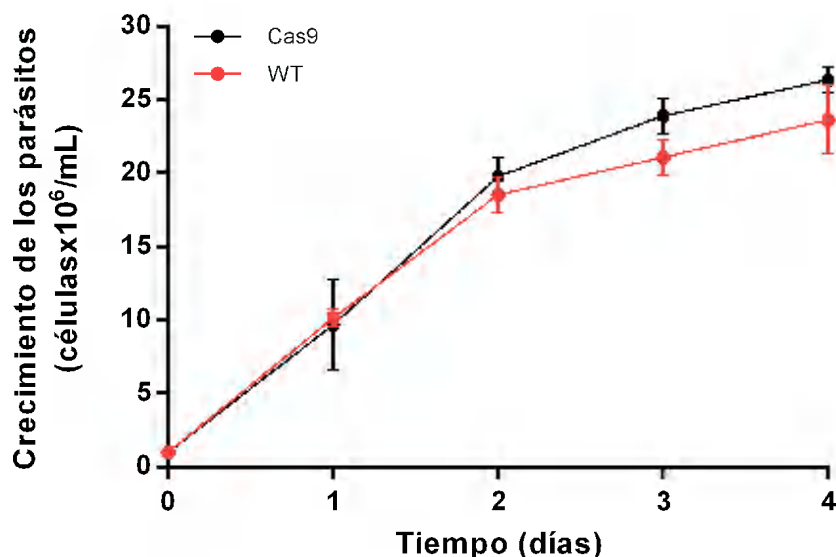


Figura S7. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* Cas9 y WT. Los promastigotes fueron ajustados a una concentración inicial de 10^6 parásitos/mL en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 4 días. Los experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Finalmente, se decidió evaluar si la expresión de la proteína Cas9 podría afectar la virulencia de los parásitos de *L. major* en un modelo murino de leishmaniosis cutánea. Para ello, ratones Balb/c ($n=5$) se infectaron subcutáneamente en la almohadilla plantar con 10^6 promastigotes estacionarios de *L. major* WT y la línea Cas9, y la inflamación de ambas patas (infectada y no infectada) fue monitoreada semanalmente como indicador de progresión de la enfermedad. Los animales fueron sacrificados a la semana 7 post-infección. Se observó una reacción inflamatoria progresiva y lesiones no cicatrizantes en la almohadilla plantar de las patas infectadas de ambos grupos de animales, indicando que la expresión de la proteína Cas9 en *L. major* no altera el desarrollo de la enfermedad en modelos de infección *in vivo* (Figura S8).

Se aislaron promastigotes de la línea de *L. major* Cas9 de la pata infectada de uno de los ratones, la cual fue utilizada como línea base para la edición genética de los parásitos de *L. major*.

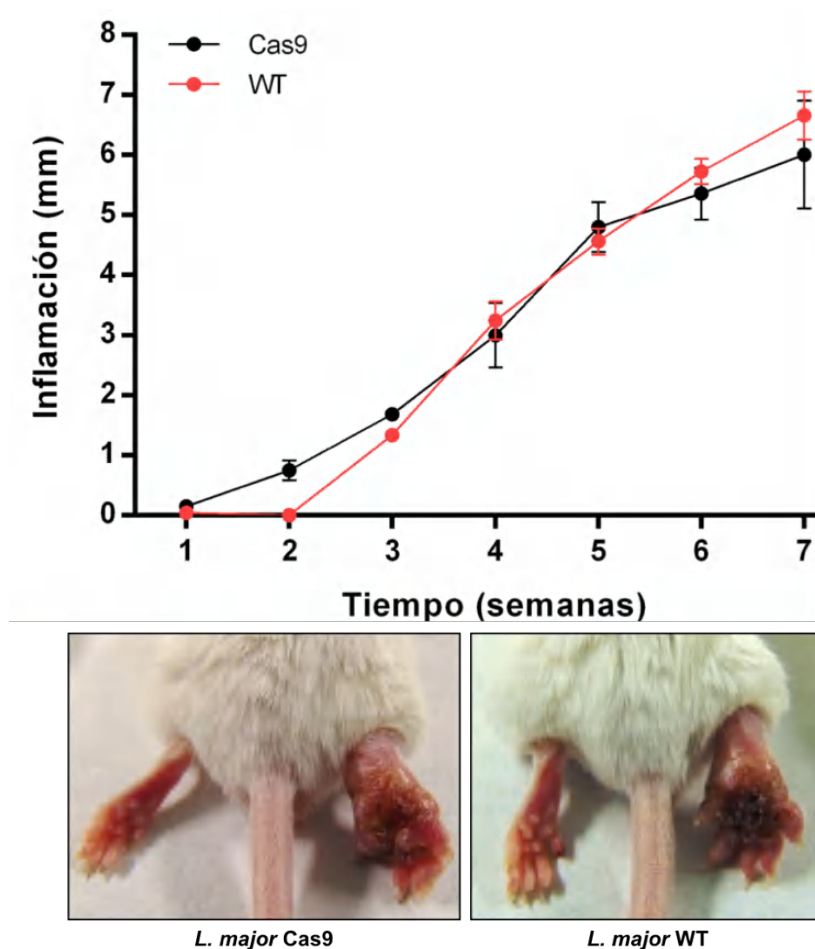


Figura S8. Infectividad de los promastigotes de *L. major* Cas9. Los ratones Balb/c fueron infectados en la almohadilla plantar con promastigotes estacionarios (10^6) de *L. major* WT y la línea Cas9. La progresión de la inflamación fue determinada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada) durante 7 semanas. Los valores representan las medias \pm SEM de 5 ratones. Se muestran imágenes representativas de la inflamación en la almohadilla plantar de los ratones tras 6 semanas de infección (abajo).

2. Estrategia CRISPR-Cas9 basada en productos de PCR

Dos años después de la publicación de la estrategia CRISPR-Cas9 para *Leishmania* spp. basada en la transfección de plásmidos, el grupo de la Dra. Eva Gluenz (University of Oxford, UK) describió una nueva metodología para la edición genética de *Leishmania* spp y *T. brucei* basada en la transfección de productos de PCR que permite, además de la delección de genes, el marcaje *in situ* de proteínas sin requerir la clonación de fragmentos de ADN en plásmidos (285).

Esta nueva metodología consiste en la generación de líneas celulares expresando de manera constitutiva las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa, lo cual permite la

transcripción *in vivo* de los ARNg a partir de fragmentos de PCR de 124 nucleótidos generados mediante el uso de dos oligonucleótidos que incorporan un promotor T7. El otro producto de PCR consiste en un ADN donador que contiene el cassette de resistencia al fármaco de selección flanqueado por brazos de homología de 30 nucleótidos específicos del locus diana. Este ADN donador es amplificado a partir de los plásmidos comunes pT y pPLOT (285).

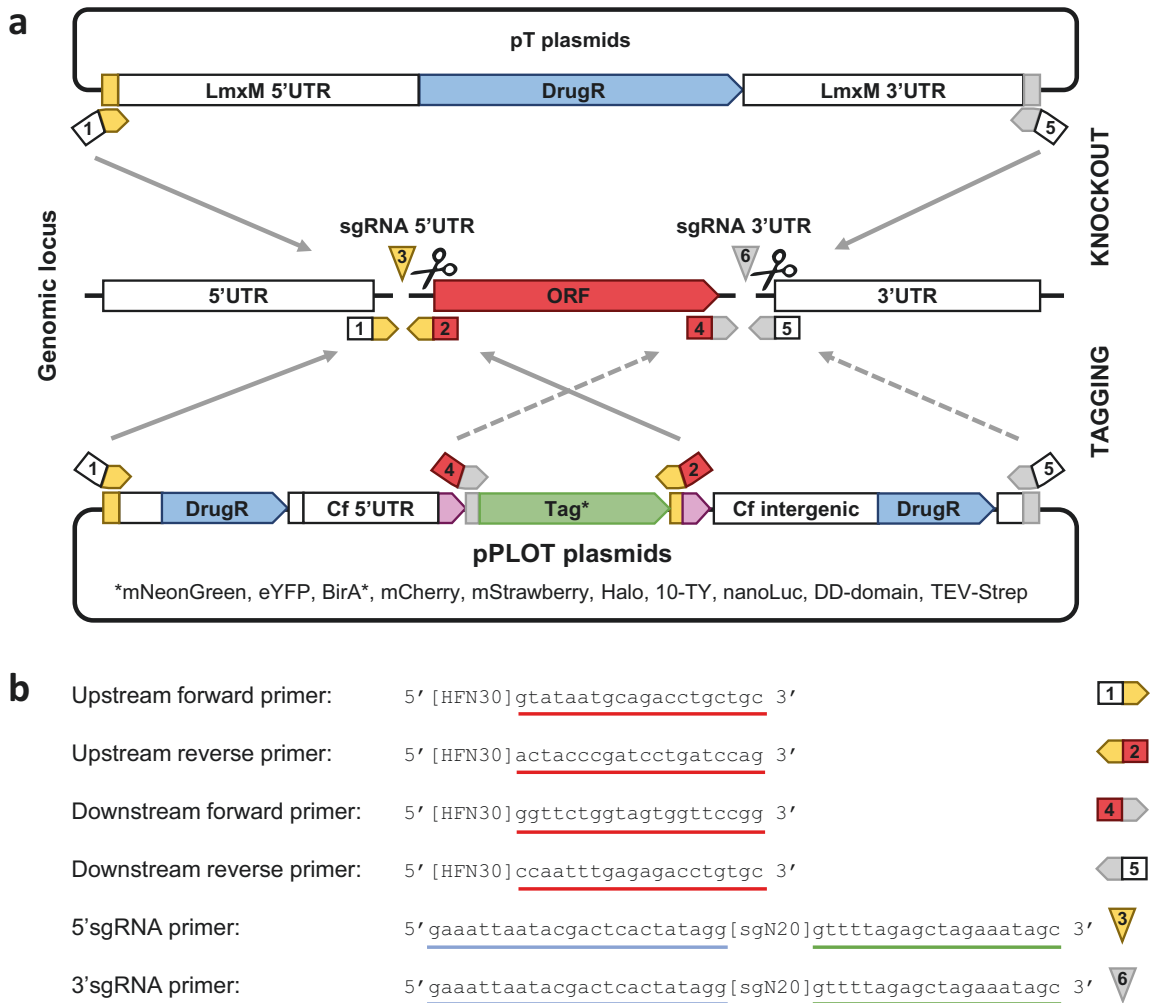


Figura S9. Estrategia CRISPR-Cas9 para la delección de genes mediante transfección de productos de PCR. A) Estrategia para la amplificación del ADN donador a partir de los plásmidos pT y pPLOT que repara mediante recombinación homóloga el punto de ruptura de la doble cadena mediado por la endonucleasa Cas9. Los números 1-6 indican los oligonucleótidos utilizados para la edición genética: los oligonucleótidos 1, 2, 4 y 5 contienen 30 nucleótidos específicos al lugar de integración del ADN donador; 3 y 6 contienen las secuencias de los ARNg que dirigen a la Cas9 para cortar inmediatamente corriente arriba (5') o corriente abajo (3') del ORF del locus diana, respectivamente. El ADN donador para la delección de un locus contiene el cassette de resistencia para un fármaco de selección, amplificado a partir de los plásmidos pT utilizando los oligonucleótidos 1 y 5, el cual se integra en el locus diana tras el corte dirigido por los ARNg 3 y 6. El ADN donador para el marcaje *in situ* del gen diana contiene los genes que codifican

para una proteína fluorescente (indicadas en la figura) y un marcador de selección, el cual es amplificado a partir de los plásmidos pPLOT. Para el marcaje *in situ* en el extremo N-terminal se emplea el ARNg 3 para el corte en la región 5' del gen y el ADN donador es amplificado utilizando los oligonucleótidos 1 y 2. Para el marcaje *in situ* en el extremo C-terminal se emplea el ARNg 6 para el corte en la región 3' del gen y el ADN donador es amplificado utilizando los oligonucleótidos 4 y 5. B) Secuencias de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos 1, 2, 4 y 5 contienen un brazo de homología de 30 nucleótidos específico del locus diana (HFN30) seguido de una secuencia común que hibrida en plásmidos pT y pPLOT (subrayados en rojo). Los oligonucleótidos 3 y 6 contienen un promotor T7 (subrayado en azul) seguido de la secuencia del ARNg específica de 20 nt (sgN20) y una secuencia complementaria al oligonucleótido G00 (Anexo 3) (subrayado en verde). Imagen tomada de (332).

1. Generación de la línea de *L. major* Cas9/T7

Los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica fueron transfectados secuencialmente con los plásmidos pRM006 y pTB008, conteniendo los genes que codifican para las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa, respectivamente, tal como se describe en el apartado 3.6.2.1. Los transfectantes fueron seleccionados en medio sólido conteniendo los fármacos de selección para ambos genes, tras lo cual se evaluó la correcta expresión de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa en los clones obtenidos mediante Western blot. Se seleccionó aleatoriamente uno de los clones expresando ambas proteínas, el cual se denominó *L. major* Cas9/T7.

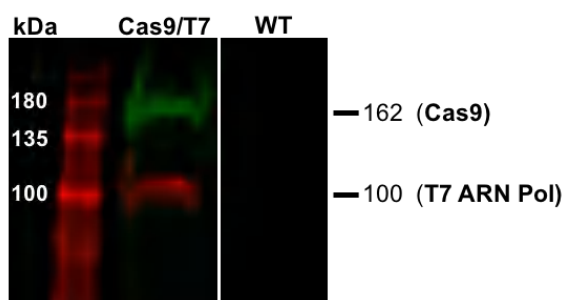


Figura S10. Análisis de la expresión de la endonucleasa Cas9 y T7 ARN polimerasa mediante Western blot. Proteínas totales obtenidas de lisados de parásitos *L. major* WT o transfectados con los plásmidos pRM006 y pTB008 fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. La membrana fue incubada con los anticuerpos primarios anti-FLAG (1:2000) y T7RNAP (1:10000) y posteriormente con los anticuerpos secundarios IRDye® 800CW anti-Rabbit (1:10000) y 680RD anti-mouse (1:10000) (LI-COR Biosciences) para la detección de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa, respectivamente. La imagen se adquirió en el equipo Odyssey CLx.

Con el fin de evaluar si el crecimiento de los promastigotes era afectado por la expresión constitutiva de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa en los parásitos de *L.*

major, se realizaron curvas de crecimiento de la línea *L. major* Cas9/T7 y los parásitos WT. Como se observa en la figura S10 ambas poblaciones de parásitos crecieron logarítmicamente de manera similar, alcanzando la fase estacionaria al mismo tiempo (Figura S11).

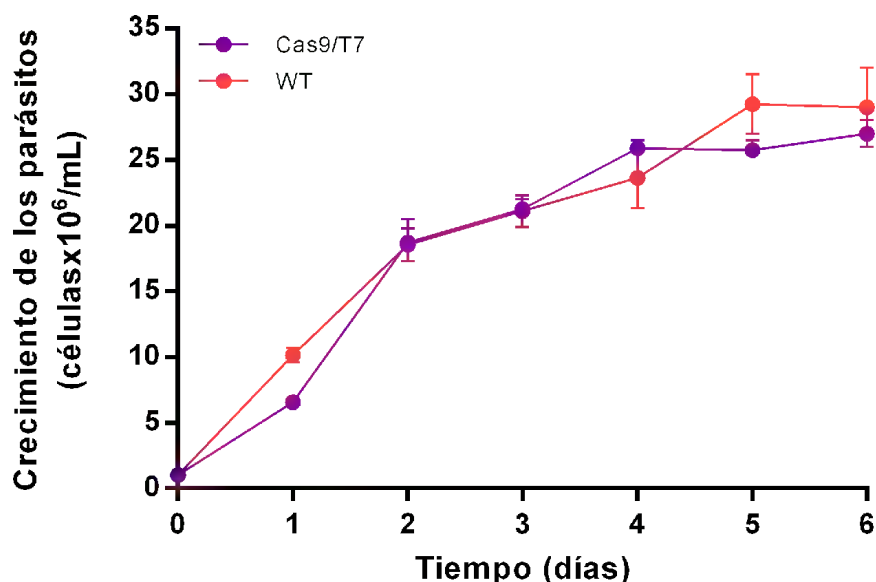


Figura S11. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* Cas9/T7 y WT. Los promastigotes fueron ajustados a una concentración inicial de 10^6 parásitos/mL en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y la densidad parasitaria fue medida cada 24 horas durante 6 días. Los experimentos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Posteriormente se infectaron ratones Balb/c subcutáneamente en la almohadilla plantar con 10^5 promastigotes estacionarios de la línea Cas9/T7, con el fin de obtener parásitos virulentos que serían utilizados como línea base para la edición genética de *L. major*. En este caso solo se emplearon dos ratones para la evaluación de la infectividad de la línea Cas9/T7, ya por experimentos previos conocíamos la progresión de la enfermedad en ratones Balb/c infectados con la línea WT, y por lo tanto siguiendo el principio de las 3Rs para la investigación con animales, se decidió reducir el número de animales para dicho experimento. Como se observa en la figura S12, los ratones infectados con parásitos de la línea Cas9/T7 presentan una progresión de la enfermedad similar a los ratones infectados con los parásitos WT, indicando que la expresión de las proteínas Cas9 y T7 ARN polimerasa en *L. major* no altera el desarrollo de la enfermedad en modelos de infección *in vivo*.

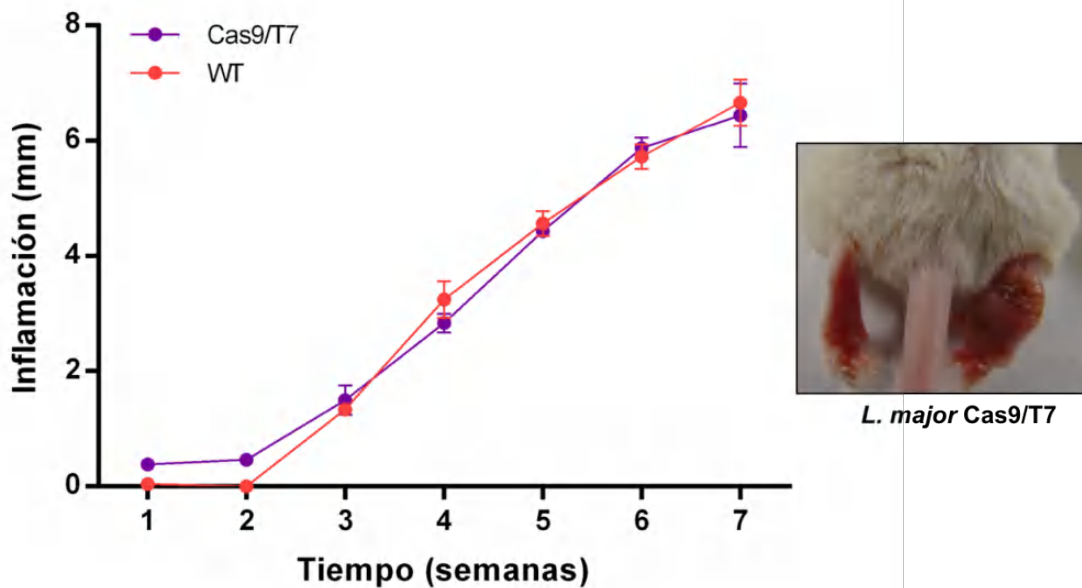


Figura S12. Infectividad de los promastigotes de *L. major* Cas9/T7. Los ratones Balb/c fueron infectados en la almohadilla plantar con promastigotes estacionarios (10^6) de *L. major* WT y la línea Cas9/T7. La progresión de la inflamación fue determinada semanalmente (diferencia entre el espesor de la pata infectada y el espesor de la pata contralateral no infectada) durante 7 semanas. Los valores del grupo de ratones infectados con los parásitos WT representan las medias \pm SEM de 5 ratones (Figura S8) y los valores del grupo de ratones infectados con los parásitos de la línea Cas9/T7 representan las medias \pm SEM de 2 ratones. Se muestran una imagen representativa de la inflamación en la almohadilla plantar de uno de los ratones infectado con la línea Cas9/T7 tras 6 semanas de infección (derecha).

Se aislaron promastigotes de la línea de *L. major* Cas9/T7 de la pata infectada de uno de los ratones, la cual fue utilizada como línea base para la edición genética de los parásitos de *L. major* utilizando la estrategia basada en productos de PCR.

2. Validación de la línea de *L. major* Cas9/T7

Para validar la línea de *L. major* Cas9/T7 generada en nuestro laboratorio se eligieron genes cuya funcionalidad (LmRos3) y localización celular (PF16) ya había sido reportada previamente.

2.1 Deleción del gen *LmRos3* de *L. major*

Uno de los principales mecanismos de resistencia a miltefosina en *Leishmania* consiste en la inactivación de la maquinaria de translocación presente en la membrana plasmática de los parásitos, la cual esta conformada por la subunidad catalítica LdMT y la subunidad beta LdRos3 (52,60,334). La inactivación de cualquiera de estas dos subunidades genera resistencia a miltefosina debido a la incapacidad del parásito para incorporar el fármaco (61,335). Debido al claro fenotipo de los parásitos de presentan una alteración en este complejo proteico, decidimos delecionar el gen *LmRos3* en los parásitos de *L. major*.

El gen *LmRos3* de *L. major* (LmjF.32.0510) fue delecionado utilizando la estrategia de CRISPR-Cas9 descrita previamente, mediante la transfección de los parásitos de la línea Cas9/T7 con el ADN donador conteniendo el gen de resistencia a geneticina flanqueado por brazos de homología de 30 nucleótidos específicos del gen *LmRos3* y dos ADN moldes para la transcripción *in vivo* de los ARNg dirigidos a las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen (Figura S13), tal como se detalla en el apartado 3.6.2.1.1 de materiales y métodos.

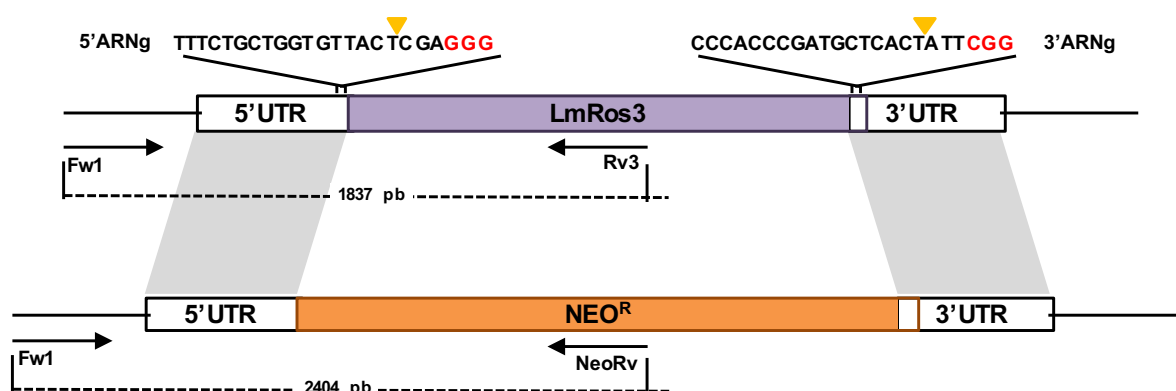


Figura S13. Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 utilizada para la generación de los parásitos *LmRos3*^{-/-}. Se utilizaron dos ARNg dirigidos a las secuencias adyacentes a los codones de inicio y de parada del gen *LmRos3* para generar la ruptura de la doble cadena de ADN, la cual es reparada mediante recombinación homóloga utilizando como molde el ADN donador conteniendo el cassette de resistencia a geneticina flanqueado por brazos de homología de 30 nucleótidos de las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *LmRos3*. Se indican en la figura los oligonucleótidos utilizados para la confirmación por PCR y los fragmentos esperados en cada caso.

Después de 24 horas de transfección, los parásitos se seleccionaron durante 6 días en medio de cultivo líquido suplementado con 10% de SFB y 40 µg/mL de geneticina, y

la población de parásitos seleccionada fue evaluada mediante PCR y Western blot para confirmar la delección del gen *LmRos3*. Adicionalmente se evaluó el fenotipo resistente de los parásitos mediante ensayo de citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico de MTT en presencia de miltefosina.

No se observó amplificación del producto de PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen *LmRos3* (Fw1-Rv3) y por el contrario se observó la amplificación del fragmento específico para el gen de resistencia a geneticina (Fw1-NeoRv), indicando que en la población de parásitos obtenida el gen *LmRos3* había sido delecionado y reemplazado por el cassette de resistencia al fármaco de selección (Figura S14A). La delección del gen *LmRos3* fue confirmada mediante Western blot, en el cual no se detectó la presencia de la proteína LRos3 en la población de parásitos transfectados en comparación con la población WT (Figura S14B). Tal como se esperaba, la ausencia de la proteína aumento los valores de resistencia a miltefosina alcanzándose un índice de resistencia de 10.89 ± 1.20 (Figura S14C).

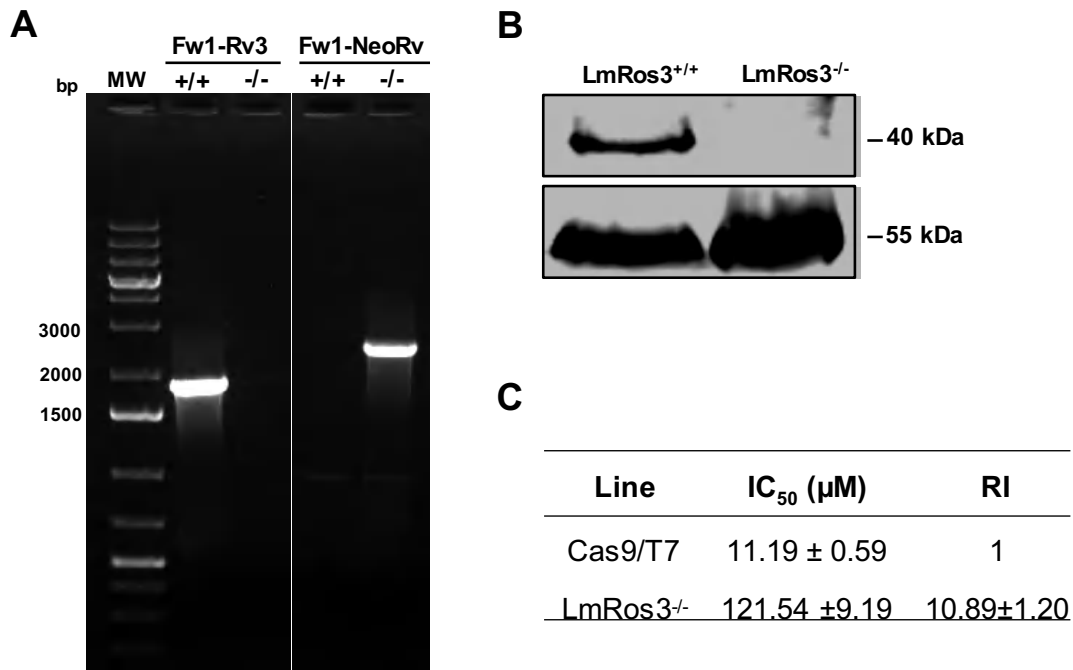


Figura S14. Generación de de promastigotes de *L. major* mutantes nulos para el gen *LmRos3* mediante CRISPR-Cas9. A) Análisis de genotipo mediante PCR del locus *LmRos3* usando los oligonucleótidos Fw1-Rv3 y Fw1-NeoRv específicos de gen y cassette de resistencia a geneticina, respectivamente. La amplificación de fragmento de 1837 pb específico de gen solo en los parásitos control (+/+) y fragmento de 2404 pb específico de cassette geneticina en la línea LmRos3^{-/-} (-/-) indica la delección

de ambos alelos del gen *LmRos3*. B) Western blot de proteínas totales obtenidas de parásitos *LmRos3*^{-/-} y parásitos WT (*LmRos3*^{+/+}) utilizando el los anticuerpos anti-LRos3 (panel superior) y anti- α -tubulina (panel inferior) como control de carga de proteínas. C) Los promastigotes *LmRos3*^{-/-} en fase logarítmica de crecimiento fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de miltefosina (rango de 0.19 a 200 μ M) a 26 °C durante 72 horas, tras las cuales se determinó la sensibilidad al fármaco usando el método colorimétrico de MTT. Los resultados representan la media \pm SD de dos experimentos independientes y se expresan como IC50 (concentración de fármaco necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular). RI: Índice de Resistencia.

2.2 Marcaje *in situ* de la proteína PF16 de *L. major*

Para validar nuestra línea de *L. major* Cas9/T7 para el marcaje *in situ* de los genes en estos parásitos, seleccionamos la proteína PF16 (LmjF.20.1400) que codifica una las proteína centrales del axonema de *Leishmania* (336). Para ello los promastigotes de la línea Cas9/T7 fueron transfectados con un ADN donador conteniendo el gen que codifica para la proteína fluorescente mNeonGreen y el cassette de resistencia a puromicina flanqueado por brazos de homología de 30 nucleótidos específicos del gen *pf16* y un ADN molde para la transcripción *in vivo* de un ARNg dirigido a la secuencia adyacente al codón de parada de la proteína LmPF16 (Figura S15). Los detalles de la amplificación de los fragmentos de ADN se describen en el apartado 3.6.2.1.2.

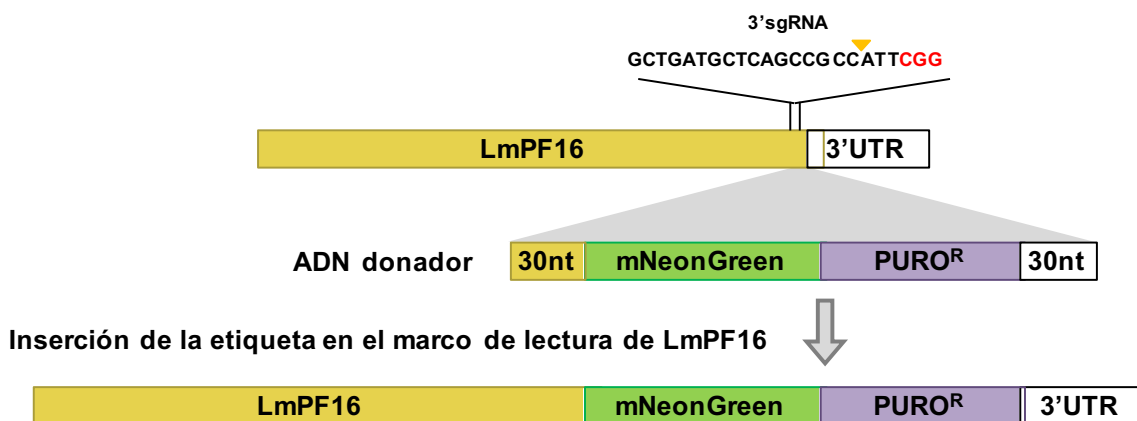


Figura S15. Representación esquemática de la estrategia CRISPR-Cas9 empleada para el marcaje *in situ* de la proteína LmPF16 de *L. major* en su extremo C-terminal. El ARNg hibrida cerca del codón de parada de LmPF16 indicando el punto de ruptura de la doble cadena mediado por la proteína Cas9 (triángulo amarillo), tras lo cual el ADN es reparado por recombinación homóloga utilizando el ADN donador que contiene la proteína fluorescente.

Los parásitos transfectados fueron seleccionados con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina durante una semana, y posteriormente fueron observados mediante microscopía de fluorescencia. Se obtuvo una población homogénea de promastigotes en la cual se observó el marcaje de la proteína paraflagelar (Figura S16).

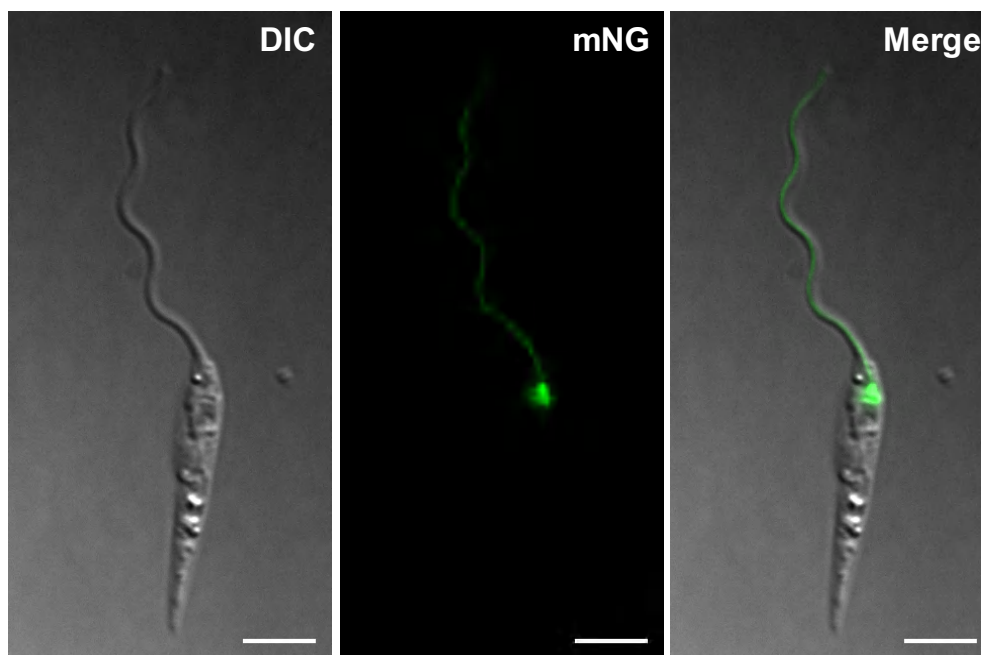


Figura S16. Localización celular de LmPF16-mNeonGreen Los promastigotes de *L. major* expresando el gen *pf16* marcado endógenamente con mNeonGreen (mNG) fueron crecidos hasta fase logarítmica y fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia. La figura muestra un parásito representativo de una población total con un patrón de fluorescencia similar. Barra de escala: 5 μm .

ANEXO III. Oligonucleótidos referidos en el texto de materiales y métodos

Oligonucleótidos utilizados para el análisis del gen *cpoX* de *L. major*

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Aplicación
CPOXTopoFw CPOXTopoRv	CACCATGTCGCTTGCAGTCGAAGC CTACACCCACTGCCTCTTCGTCAAAAAG	Clonación en el vector de entrada TOPO [®] y posterior subclonación en el vector de expresión de levaduras pDR
CPOXBamHIFw CPOXEcoRVrV	GGGGGATCCATGTCGCTTGCAGTC CCCGATATCCACCCACTGCCTCTTCG	Clonación en el vector de expresión de <i>Leishmania</i> pXG-/GFP+
CPOXBamHIFw CPOXBamHIRv	GGGGGATCCATGTCGCTTGCAGTC CCCGGATCCCTACACCCACTGCCTC	Clonación en el vector de expresión de <i>Leishmania</i> pXGNEO
CPOX-RTFw CPOX-RTRv	ACCAAGTTGCACAGGACCTC GCTGTTCCGTGTATGGTGTG	Evaluación de los niveles de expresión de ARNm
C-TagCPOXFw C-TagCPOXRv	GAGTACTTTTTGACGAAGAGGCAGTGGGTGGGTCTGGTAGTGGTTCCGG ACATAGCGAAATATAAGTATGGGATGTGCACCAATTTGAGAGACCTGTGC	Amplificación de fragmento de ADN molde para integración de la proteína NeonGreen mediante recombinación homóloga
3'gRNACPOX G00*	gaaattaatacgactcactatagg TGGCACC GCGATAGAAAGAG gttttagagctagaaatagc	Amplificación de fragmento de ADN molde para la transcripción <i>in vivo</i> del 3'gRNA
5UTRCPOXFw 5UTRCPOXRv	CGGTTAACAGGCATGCAGCGTTTCTATCC CGCAATTGGCTTCGACTGCAAGCGACATTTTC	Clonación de región de homología 5'UTR en vector pLS7
3UTRCPOXFw 3UTRCPOXRv	GCTCTAGACTTGCTGGAGCCTGCACGTAT CCGGGTACCACGTCAGCCACCGCAATAGAATAC	Clonación de región de homología 3'UTR en vector pLS7
SeedCPOXFw SeedCPOXRv	CAGGCACCGCTGGTGGGGACGGACAGGCAACATTTGGTTTTAGAGCTAGAAAT ATTTCTAGCTCTAAAAC CAAATGTTGCCTGTCCGTCC CCACCAGCGGTGCCTG	Clonación de secuencia del sgRNA en vector pLS7
KOCPOXFw1 KOCPOXRv3 PuroRv	CACTGATTGGGCTGCTGTTTCGAC GGCAGTCTTCCTCCACAGCATAGTAC GGAGGCCTTCCATCTGTTGC	Evaluación de la delección del gen <i>cpoX</i> e integración de cassette de resistencia a puromicina
CPOXV33Fw CPOXV33Rv	GGACAGGCAACATTTGTTGAAGATAAGTGGACACG CGTGTCCTTATCTTCAACAAATGTTGCCTGTCC	Generación de mutación V33 en el gen <i>cpoX</i> clonado en el vector de expresión pXGNEO

Sonda5UTRCPOXFw Sonda5UTRCPOXRv	CTTGGCGCGTCCATTTCGC CGCACCCGGACACTGAAGC	Generación de sonda específica de la región 5'UTR del gen <i>cpx</i> para análisis por Southern blot
SondaCPOXFw CPOXTopoRv	CTTCGAGGCGATGGGAGTCTCG CTACACCCACTGCCTCTTCGTCAAAAAG	Generación de sonda específica del gen <i>cpx</i> para análisis por Southern blot

Oligonucleótidos utilizados para el análisis del gen *ppox* de *L. major*

Nombre	Secuencia (5'-3')	Aplicación
PPOX <i>Nhe</i> I Fw PPOX <i>Xho</i> I Rv	GGGGCTAGCATGGCGTCACAGAGC CCCCTCGAGTCCGCGTTTTGCAGC	Clonación en el vector de expresión de bacterias pET21b(+)
PPOX <i>Bgl</i> II Fw PPOX <i>Nhe</i> I Rv	TTTAGATCTATGGCGTCACAGAGCCC TTTTTGCTAGCTCCGCGTTTTGCAGCGA	Clonación en el vector de expresión de <i>Leishmania</i> pLEXSY-hyg2-mCherry
PPOX <i>Bam</i> HI Fw PPOX <i>Bam</i> HI Rv	GGGGGATCCATGGCGTCACAGAG CCCGGATCCTCATCCGCGTTTTGCAG	Clonación en el vector de expresión de <i>Leishmania</i> pXGNEO
PPOX-RT Fw PPOX-RTRv	GCTGGCAGACTACGAAAAGG ACTTGCGTGCTGTGAGATTG	Evaluación de los niveles de expresión de ARNm
LmPPOXFw LmPPOXRv	AGTTGTTGCCTTGAATCAGAGGTGCTGCCTGTATAATGCAGACCTGCTGC GAAGCCACCTCGAGGTGTCTGCCTTCGCCACCAATTTGAGAGACCTGTGC	Amplificación de fragmento de ADN molde para delección del gen <i>ppox</i> e integración del cassette de resistencia a neomicina mediante recombinación homóloga
C-TagPPOXFw LmPPOXRv	GGAATCCGTATAATCGCTGCAAAACGCGGAGGTTCTGGTAGTGGTTCCGG GAAGCCACCTCGAGGTGTCTGCCTTCGCCACCAATTTGAGAGACCTGTGC	Amplificación de fragmento de ADN molde para integración de la proteína NeonGreen mediante recombinación homóloga
5'gRNAPPOX 3'gRNAPPOX G00*	<i>gaaattaatacgaactcactatagg</i> AAGCGCCTCACTTCAAAAAC <i>gttttagagctagaaatagc</i> <i>gaaattaatacgaactcactatagg</i> ATGGGCTTTCAGTTCTGTGC <i>gttttagagctagaaatagc</i>	Amplificación de fragmentos de ADN molde para la transcripción <i>in vivo</i> de 5'gRNA y 3'gRNA
KOPPOXFw1 KOPPOXRv3 NeoRv	GGACGAAGCATTGACGGTATTG CTCCCCCTGTCACCTTCATAATG CACGAGGAAGCGGTCAGC	Evaluación de la delección del gen <i>ppox</i> e integración de cassette de resistencia neomicina
Sonda5UTRPPOXFw Sonda5UTRPPOXRv	CTCGCATGCATCCAGGTGG GATACGTTTCGAGTCACGCGG	Generación de sonda específica de la región 5'UTR del gen <i>ppox</i> para análisis por Southern blot

SondaPPOXFw SondaPPOXRv	GGGGGATCCATGGCGTCACAGAG CCCGGATCCTCATCCGCGTTTTGCGAG	Generación de sonda específica del gen <i>pbox</i> para análisis por Southern blot
----------------------------	--	--

Oligonucleótidos utilizados para el análisis del gen *fech* de *L. major*

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Aplicación
FeCH <i>Nhe</i> I Fw FeCH <i>Xho</i> I Rv	GGGGCTAGCATGTCCTGCGCACCCGG CCCCTCGAGCGCGCCAACAACGGAG	Clonación en el vector de expresión de bacterias pET21b(+)
FeCH <i>Bam</i> HI Fw FeCH <i>Eco</i> RI Rv	GGGGGATCCATGTCCTGCGCACCC CCCGATATCCGCGCCAACAACGGAG	Clonación en el vector de expresión de <i>Leishmania</i> pXG-/GFP+
FeCH <i>Bam</i> HI Fw FeCH <i>Bam</i> HIRv	GGGGGATCCATGTCCTGCGCACCC CCCGGATCCTCACGCGCCAACAAC	Clonación en el vector de expresión de <i>Leishmania</i> pXGNEO
FeCH-RT Fw FeCH-RTRv	ACGGCTTTATCTTGCCCTTT TGCTACAAGGCTTTTCGGAGT	Evaluación de los niveles de expresión de ARNm
C-TagFeCHFw C-TagFeCHRv	GTCAAGGTGCTCACCTCCGTTGTTGGCGGGTCTGGTAGTGGTTCCGG CGAGCAGCGGCAGGAGAGAGGACGCAAACACCAATTTGAGAGACCTGTGC	Amplificación de fragmento de ADN molde para integración de la proteína NeonGreen mediante recombinación homóloga
3'gRNAFeCH G00*	gaaattaatac gactcactataggAAGAAGGAGTCCCAACAACGG gttttagagctagaaatagc	Amplificación de fragmento de ADN molde para la transcripción <i>in vivo</i> del 3'gRNA
5UTRFeCHFw 5UTRFeCHRv	CGGTTAACGCATGGCTACAACCGACTGCC CGCAATTGGAATGGATGCGCTATCGGCAAGAC	Clonación de región de homología 5'UTR en vector pLS7
3UTRFeCHFw 3UTRFeCHRv	GCTCTAGACCATGTCAAGGTGCTCACCTCC CCGGGTACCTCGACGGATACGTGCTGGACC	Clonación de región de homología 3'UTR en vector pLS7
SeedFeCHFw SeedFeCHRv	CAGGCACCGCTGGTGGGCCATCCTCCTGGTGAACCTGTTTTAGAGCTAGAAAT ATTTCTAGCTCTAAAAC AAGTTACACAGGAGGATGGCC ACCAGCGGTGCCTG	Clonación de secuencia del sgRNA en vector pLS7
KOFeCHFw1 KOFeCHRv3 PuroRv	GACCTCTTTCCTCGAACCCGAATG CTTGATGCTGCTCAAGAGACTCGATC GGAGGCCTTCCATCTGTTGC	Evaluación de la delección del gen <i>fech</i> e integración de cassette de resistencia a puromicina
FecHG17AFw FecHG17ARv	CTCCTGGTGAACCTGGCTACCACGACTGCACCAA TTGGTGCAGTCGTGGTAGCCAAGTTACACAGGAG	Generación de mutación G17A en el gen <i>fech</i> clonado en el vector de expresión pXGNEO

Sonda5UTRFeCHFw Sonda5UTRFeCHRv	GCTTGGTGTGTGCTTGCACG GCTACAGCGCTGTCCAGGATG	Generación de sonda específica de la región 5'UTR del gen <i>fech</i> para análisis por Southern blot
FeCH <i>NheI</i> Fw FeCHRv3	GGGGCTAGCATGTCCTGCGCACCCGG CTTGATGCTGCTCAAGAGACTCGATC	Generación de sonda específica del gen <i>fech</i> para análisis por Southern blot

Oligonucleótidos adicionales

Nombre	Secuencia (5'-3')	Aplicación
GAPDH-RTFw GAPDH-RTRv	CTCACAAGCACATTGAAGCAGG AACTTCTCGTTCAGCACCTTTG	Evaluación de los niveles de expresión de ARNm del gen control <i>gapdh</i>
LmRos3Fw LmRos3Rv	TTTCTTGCGCATTGGTTTTTCATTCGTTGTTGTATAATGCAGACCTGCTGC ATCATGAACGTCTGCAGCACAAAGGTAACCGCCAATTTGAGAGACCTGTGC	Amplificación de fragmento de ADN molde para delección del gen <i>LmRos3</i> e integración del cassette de resistencia a neomicina mediante recombinación homóloga
5'gRNALmRos3 3'gRNALmRos3 G00*	gaaattaatac gactcactatagg TTTCTGCTGGTGTTACTCGA gttttagagctagaaatagc gaaattaatac gactcactatagg CCCACCCGATGCTCACTATT gttttagagctagaaatagc	Amplificación de fragmentos de ADN molde para transcripción <i>in vivo</i> de 5'gRNA y 3'gRNA
KO1LmRos3 KO3LmRos3	CTAATGCCTGCCAAGAGTGC CACCACACGGGTTATAGTAGC	Evaluación de la delección del gen <i>LmRos3</i> e integración de cassette de resistencia a neomicina
C-TagPF16Fw C-TagPF16Rv	AAGATCGAGAACTACCACGTGCAGCAGCACGGTCTGGTAGTGGTTCCGG CGAGCAGCGTGCCTGGGCGTGACTATGCCGCCAATTTGAGAGACCTGTGC	Amplificación de fragmento de ADN molde para integración de la proteína NeonGreen mediante recombinación homóloga
3'gRNAPF16 G00*	gaaattaatac gactcactatagg GCTGATGCTCAGCCGCCATT gttttagagctagaaatagc	Amplificación de fragmento de ADN molde para la transcripción <i>in vivo</i> del 3'gRNA

*G00: AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC (Beneke et al. 2017)

**Los sitios de restricción se encuentran subrayados, los adaptadores de 16 nucleótidos utilizados para el Sistema In-Fusion® se encuentran en negrita, y en minúscula se muestra la región promotora de la T7 ARN polimerasa (rojo) y la secuencia 20 nucleótidos que hibrida con extremo 3' del oligonucleótido G00 (azul) para la generación de los ARN guías mediante PCR.

Anexo IV. Medios de cultivo y soluciones referidos en el texto de materiales y métodos

MEDIOS DE CULTIVO		COMPOSICIÓN
Bacterias	LB líquido	Bacto-Triptona 1 % (p/v), NaCl 1 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v)
	LB sólido	Bacto-Agar al 1.5% (p/v) en medio LB líquido
Levaduras	YPD líquido	Extracto de levadura 10% (p/v), peptona 20% (p/v), dextrosa 20% (p/v)
	YPD sólido	Bacto-Agar al 1.5% (p/v) en medio YPD líquido
	Sc-Ura líquido	Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos 6.7% (p/v) (Sigma), suplemento de mezcla de aminoácidos sin Uracilo 1.87% (p/v) (Formedium), MES 3.9% (p/v). Ajustar el pH a 5.7 con NaOH y esterilizar por autoclave. Suplementar con glucosa al 2% (p/v) y rafinosa al 0.4% (p/v)
	Sc-Ura sólido	Bacto-Agar al 1.5% (p/v) en medio Sc-Ura líquido
Parásitos	RPMI modificado líquido	RPMI 1640 (Gibco) suplementado con Hepes 0.475% (p/v), bicarbonato sódico 0.16 % (p/v), solución de aminoácidos orgánicos y azúcares 1X, vitaminas 0.02% (v/v). Ajustar pH a 7.2 y esterilizar por filtración. Suplementar con FBS inactivado (Gibco) al 10 o el 20 % (v/v)
	RPMI modificado sólido	RPMI 1640 modificado líquido suplementado con agar al 1% (p/v)
Macrófagos	RPMI 1640 (Gibco)	Suplementado con 5-10 % (v/v) de FBS inactivado (Gibco), 2 mM L-glutamina y penicilina/estreptomicina (10000 U/ml-10000 µg/ml)
	DMEM (Gibco)	Suplementado con 20 % (v/v) de FBS inactivado (Gibco), 2 mM L-glutamina y penicilina/estreptomicina (10000 U/ml-10000 µg/ml)

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	USO
Tampón HBS	NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na ₂ HPO ₄ 7 mM, glucosa 6 mM, HEPES 20 mM, pH 7.4	Transfección de parásitos por electroporación
Tampón fosfato salino (PBS) 1X	NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM; Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH a 7.4	Solución isotónica empleada para la preparación de reactivos y lavado de células
Tampón fosfato salino-Tween 20 (PBS-T)	Tween 20 al 0.1% (v/v) en tampón PBS 1X	Preparación de solución de bloqueo, inmunodetección y lavado de membranas para Western blot
Tampón TAE 10X	Tris 0.4 M, EDTA 10 mM, ácido acético glacial 0.2 M	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa
Tampón Laemmli 2X	Tris-HCl 100 mM, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2%, 20mM β-mercaptoetanol	Tampón de carga para proteínas en condiciones desnaturalizantes
Tampón TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM	Resuspensión de ADN
Tampón de corrida 10X	Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1 % (p/v)	Tampón para separación de proteínas por SDS-PAGE

Tampón de transferencia	Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 1 % (v/v)	Transferencia de proteínas en gel de poliacrilamida a membranas de PVDF
Tampón SSC 20X	NaCl 3M, citrato sódico 0.3 M, pH 7.0	Transferencia de ADN en gel de agarosa a membrana de nylon por capilaridad
Solución de depurinación	HCl 0.25 M	Tratamiento del ADN en gel de agarosa para Southern blot
Solución desnaturalizante	NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M	
Solución de neutralización	Tris-HCl 0.5 M y NaCl 1.5 M	
Solución de hibridación	DIG Easy Hyb Granules, en 64 mL de agua destilada	Soluciones para Southern blot utilizadas en la hibridación de sondas de ADN marcadas con DIG y posterior detección cromogénica
Solución de lavado	Solución de ácido maléico (ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM), Tween 20 al 0.3% (v/v)	
Solución de bloqueo	10% (p/v) de Blocking Reagent (Roche) en solución de ácido maléico (ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM)	
Solución de detección	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl	