



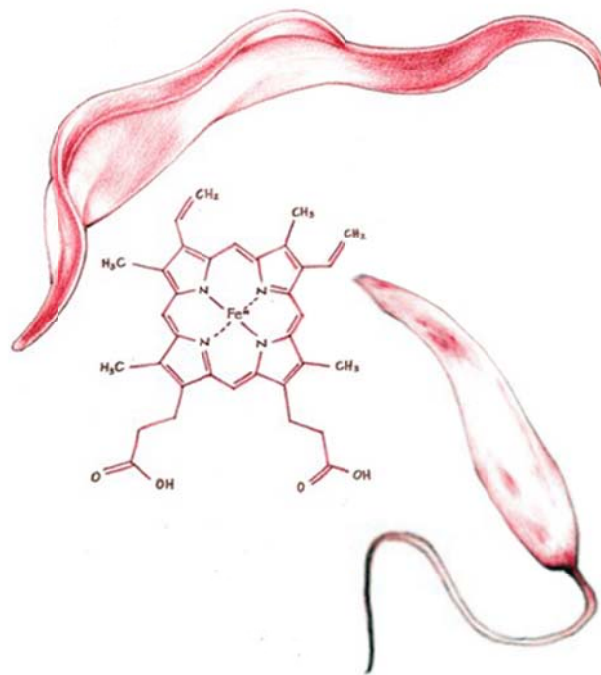
ipbln

Instituto de Parasitología y
Biomedicina "López-Neyra"



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Caracterización bioquímica y explotación farmacológica del mecanismo de rescate de hemo en *Leishmania spp.* y *Trypanosoma brucei*, patógenos auxótrofos para este metabolito esencial



María Cabello Donayre

TESIS DOCTORAL

2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Cabello Donayre
ISBN: 978-84-1306-472-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/62182>



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

**Caracterización bioquímica y explotación
farmacológica del mecanismo de rescate de hemo en
Leishmania spp. y *Trypanosoma brucei*, patógenos
auxótrofos para este metabolito esencial**

Director de la Tesis

Dr. José María Pérez-Victoria Moreno de Barreda

Memoria presentada por la Licenciada **María Cabello Donayre** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada en el Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

Marzo 2017

D. JOSÉ MARÍA PÉREZ-VICTORIA MORENO DE BARREDA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “Caracterización bioquímica y explotación farmacológica del mecanismo de rescate de hemo en *Leishmania* spp. y *Trypanosoma brucei*, patógenos auxótrofos para este metabolito esencial”, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada por **María Cabello Donayre**, Licenciada en Biología y en Bioquímica por la Universidad de Granada, para optar al grado de Doctor por esta misma Universidad.

Fdo. Dr. José María Pérez-Victoria Moreno de Barreda
Científico Titular del CSIC

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC) de Granada y ha sido financiada por una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (2010-2015) y con un contrato asociado al Proyecto de Excelencia, Subvencionado por la Consejería de Educación y Ciencia, Junta de Andalucía. Convocatoria 2012 (Ref. BIO1786). Las estancias en el extranjero (Montevideo) han estado financiadas por el Proyecto "Implicación de factores de respuesta a estrés oxidativo en parásitos tripanosomátidos en la virulencia y resistencia a fármacos", concedido por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ministerio de Ciencia y Tecnología (2009UY0018).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en :

1. **Campos-Salinas, J., CABELLO-DONAYRE, M., García-Hernández, R., Pérez-Victoria, I., Castanys, S., Gamarro, F. and Pérez-Victoria, J.M. (2011).** "Characterisation of a new ATP-binding cassette transporter with a role in porphyrin trafficking in *Leishmania*, a pathogen protozoan parasite auxotrophous for heme". *Molecular Microbiology*, 79(6):1430-44. doi: [10.1111/j.1365-2958.2010.07531.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07531.x).
2. **CABELLO-DONAYRE, M., Malagarie-Cazenave, S., Campos-Salinas, J., Gálvez F.J., Rodríguez-Martínez, A., Pineda-Molina, E., Orrego, L.M., Martínez-García, M., Sánchez-Cañete, M.P., Estévez, A. and Pérez-Victoria, J.M. (2016).** "Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters". *Molecular Microbiology*, 101(6):895-908. doi: [10.1111/mmi.13430](https://doi.org/10.1111/mmi.13430).

Otras publicaciones obtenidas como resultado de colaboraciones realizadas durante mi período de formación predoctoral con investigadores de otros centros y con otros miembros del laboratorio, han sido:

3. **Álvarez-Mercado, A.I., Sáez-Lara, M.J., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., Abadía, F., CABELLO-DONAYRE, M., Gil, A., González-Gallego, J. and Fontana, L. (2008).** "Xenotransplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells to rats with D-Galactosamine-induced hepatitis". *Cell Transplantation*; 17(7):845-57.
4. **Álvarez-Mercado, A.I. , García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., Abadía, F., Sáez-Lara, M.J., CABELLO-DONAYRE, M., Gil, A., González-Gallego, J. and Fontana, L. (2009).** "Deleterious effect of human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation on thioacetamide-induced chronic liver damage in rats". *Cell Transplantation*; 18(10):1069-79. doi: [10.3727/096368909X12483162197088](https://doi.org/10.3727/096368909X12483162197088).
5. **Martínez-García, M., Campos-Salinas, J.*, CABELLO-DONAYRE, M.*, Pineda-Molina, E., Gálvez, F.J., Orrego, L.M., Sánchez-Cañete, M.P., Malagarie-Cazenave, S., Koeller, D.M. and Pérez-Victoria, J.M. (*equal authors) (2016).** "LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence acts in heme and cytosolic Iron/Sulfur clusters biogenesis". *Parasites and Vectors*; 5;9:7. doi: [10.1186/s13071-015-1284-5](https://doi.org/10.1186/s13071-015-1284-5).

A Carlos y a nuestros niños

Agradecimientos

Los que me conocen sabrán que tengo muchas personas a las que agradecer y dedicar este trabajo, por lo que me dispongo a redactar esta sección aún a riesgo de olvidarme de alguien. Disculpas de antemano.

Quiero empezar agradeciendo a mi director, José María Pérez-Victoria, por toda la confianza depositada en mí desde el primer día y por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio. Mil gracias de verdad por esta oportunidad.

A Paco Gamarro y Santiago Castanys, por todos los comentarios, fundamentalmente de índole científica, que han aportado y que han sido siempre de gran ayuda. A Antonio Estévez, por toda su ayuda con *Trypanosoma brucei*, y por estar siempre dispuesto a responder cualquier duda.

A todas las personas que he conocido en las licenciaturas de Biología y Bioquímica. Gracias a los profesores que han dejado huella de una manera u otra en mí. Gracias especialmente a mis compañeros durante estos años con los que tanto compartí y disfruté, especialmente Carmen, María, César, Piña, Cristi, Bea, Magüy, Avi,...

Al departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, donde se me abrieron las puertas de la investigación. Gracias a los que fueron mis compañeros durante ese tiempo y que tanto me ayudaron: Natalia, Laura, Sergio, Pili y Dámaso.

Gracias a todo el personal del Instituto que me ha ayudado durante este tiempo, especialmente a Clara y los compañeros del animalario. A Laura, por su ayuda con las imágenes de microscopía. A Salva, por su ayuda en citometría. A Edu, por su ayuda con los árboles filogenéticos. Y a todos aquellos compañeros con los que he compartido este tiempo.

Especialmente tengo que dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio 208, por hacerme tan agradable este trabajo. A Sophie, por haber sido nuestra hermana mayor tantas veces y por todos sus consejos. A Fran, por toda su ayuda con el modelo de las levaduras. A Estela, por su ayuda con los modelos de las proteínas. A Paola, por toda la ayuda prestada y por todo lo que has aportado al laboratorio durante este tiempo que llevas con nosotros. A Lina, porque estás siempre ahí y ha sido una suerte compartir contigo el día a día. A Marta, porque empezaste conmigo esta aventura y estás siempre dispuesta a colaborar. A Jenny, por su ayuda con el modelo *in vivo* y las imágenes de microscopía. A los estudiantes que han pasado por nuestro laboratorio y han compartido conmigo este trabajo: Noemí, Alba y mi hermana Irene, porque lo habéis realizado con mucha ilusión. También a la gente del laboratorio 203-204: Sebas, David, Luis, Nacho, Ana, Rubén, Vero y Talia, por tantos buenos ratos compartidos. A Mery, porque eres un primor y por toda tu ayuda con la biología molecular. A Raquel, porque ha sido un regalo conocerte y compartir contigo todo este tiempo.

Para mí también han sido muy especiales las colaboraciones que he realizado con otros centros durante este período de formación. Tengo que dar las gracias a la gente del Instituto Pasteur de Montevideo, por la acogida tan afectuosa que tuvieron conmigo durante las dos estancias que allí realicé. También a Paqui, Bastien y Lorena, de la Fundación Medina, por su

ayuda con el cribado de los compuestos. Del mismo modo a José Juan García Marín y Elisa Herráez Aguilar, de la Universidad de Salamanca, por acogerme en su laboratorio y por toda la ayuda prestada tanto con el modelo de los oocitos, como con la cuantificación de hemo mediante HPLC-MS/MS. Gracias por el interés mostrado en este trabajo.

A mi familia, por haberme apoyado y ayudado tanto en este tiempo. En especial a mis padres, por haberme animado siempre a trabajar y estudiar por amor a los demás. A mis abuelos, por haberme dado, cada uno a su manera, la mejor y más valiosa lección que se pueda recibir en la vida. A mis hermanos, porque me habéis enseñado mucho. A mis suegros, por estar siempre dispuestos a echarme una mano.

A Carlos, por tu paciencia y tu apoyo mientras realizaba esta Tesis, pero sobretodo por todos estos años compartidos y por los que vendrán, y porque eres lo mejor que tengo. A mis niños, por ser la mayor alegría de mi vida.

Y lo más importante, gracias a Dios por haberme regalado la Vida.

Resumen

Los protozoos de la familia *Trypanosomatidae* incluyen parásitos responsables de importantes enfermedades en seres humanos y animales domésticos. *Trypanosoma brucei* (subespecies *gambiense* y *rhodesiense*), *Trypanosoma cruzi*, y *Leishmania* spp. son patógenos para los humanos causando, respectivamente, la tripanosomiasis humana africana o enfermedad del sueño, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (en sus distintas manifestaciones clínicas: visceral, cutánea y mucocutánea). Otros tripanosomátidos (*T. b. brucei*, *T. congolense* y *T. vivax*) son agentes etiológicos del Nagana en el ganado, ocasionando una grave enfermedad que supone un obstáculo importante en el desarrollo económico de las áreas rurales afectadas.

El control de estas enfermedades se basa en un arsenal farmacológico muy tóxico, anticuado y poco eficaz frente al que se han desarrollado resistencias clínicas. Debido a ello es urgente encontrar nuevos tratamientos. Una estrategia atractiva para conseguir este objetivo consiste en aprovechar diferencias bioquímicas entre estos organismos patógenos y el hospedador humano. El metabolismo del grupo hemo, un metabolito esencial en todos los organismos aeróbicos, constituye una de estas diferencias ya que los tripanosomátidos son auxótrofos para el hemo y necesitan tomarlo del hospedador.

En *Leishmania* spp., el hemo puede ser captado en forma de hemoglobina, que es endocitada tras unirse a su receptor, o en forma libre, a través de un mecanismo desconocido cuando se inició el trabajo. Por su parte, las formas sanguíneas de *T. brucei* solo pueden captarlo en forma de hemoglobina (unida a haptoglobina), que se internaliza también por endocitosis mediada por el receptor TbHpHbR.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es el estudio del mecanismo de rescate de hemo por protozoos parásitos tripanosomátidos, auxótrofos para este metabolito esencial, con el fin de identificar posibles nuevas dianas de acción terapéutica.

En este trabajo se muestra que la entrada de hemo a las formas promastigotas de *Leishmania* es mediada por un transportador específico y se ha identificado una proteína localizada en la membrana plasmática, LmFLVCRb, que contribuye a esta función. Este transportador podría ser una nueva diana terapéutica ya que la eliminación de un solo alelo del gen *LmFLVCRb* disminuye la virulencia del parásito en un modelo murino de leishmaniasis. Por otra parte, se muestra que tanto *Leishmania* spp. como *Trypanosoma brucei* rescatan el hemo proveniente de la hemoglobina endocitada a través de transportadores HRG (LmHR1 y

TbHRG) localizados en los compartimentos endolisosomales. Como estas proteínas son esenciales en ambos parásitos y presentan un bajo grado de similitud con su ortólogo humano, pueden suponer una nueva diana de actuación para la lucha contra estas enfermedades. De hecho, se ha puesto a punto un ensayo en levaduras que permite llevar a cabo un cribado de alto rendimiento dirigido a diana dentro de un contexto celular. Como prueba de concepto se ha cribado una colección de fármacos de reposición y se han identificado inhibidores de estos transportadores HRG con una actividad tripanocida y leishmanicida en el orden nanomolar.

I. Introducción.....	1
1. Leishmaniasis.....	1
2. Enfermedad del sueño.....	11
3. Enfermedad de Chagas.....	30
4. Particularidades celulares, bioquímicas y moleculares de la familia <i>Trypanosomatidae</i>	32
5. Homeostasis del grupo hemo.....	38
5.1. Papel esencial del hemo	39
5.2. Biosíntesis y degradación del hemo	41
5.3. Tráfico del grupo hemo en eucariotas	43
5.3.1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	43
5.3.2. Levaduras.....	46
5.3.3. Mamíferos	47
5.3.4. Tripanosomátidos.....	59
II. Objetivos	67
III. Materiales y métodos	69
1. Materiales.....	69
1.1. Líneas celulares y organismos utilizados	69
1.2. Plásmidos utilizados	70
1.3. Medios de cultivo	71
1.4. Tampones y medios usados con más frecuencia	72
1.5. Fármacos	75
1.6. Anticuerpos	76
1.7. Compuestos usados en los estudios de búsqueda de la fuerza motriz del transporte de porfirinas	76
1.8. Oligonucleótidos.....	77
2. Métodos	80
2.1. Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos.....	80
2.2. Cultivo y manipulación de bacterias.....	82
2.3. Cultivo y manipulación de levaduras.....	83
2.4. Cultivo y manipulación de <i>Leishmania</i> spp.	84

2.5. Cultivo y manipulación de <i>Trypanosoma brucei</i>	84
2.6. Cultivo y manipulación de células THP-1	85
2.7. Clonaje de los genes en los plásmidos de expresión para organismos tripanosomátidos y levaduras	86
2.8. Clonaje en pGEMT	89
2.9. Tecnología Gateway	90
2.10. Transformación de levaduras	92
2.11. Ensayos de crecimiento de levaduras (líquido y gotas)	93
2.12. Transfección de <i>Leishmania</i>	94
2.13. Transfección de formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i>	95
2.14. Transfección de formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i>	95
2.15. ARN interferente para <i>T. brucei</i>	96
2.16. Microscopía de fluorescencia	97
2.17. Análisis de expresión génica	98
2.18. Hibridación ADN-ADN (Southern Blot)	100
2.19. Detección de proteínas (Western Blot)	103
2.20. Preparación de ApoHb	104
2.21. Reconstitución de ApoHb con distintas PPIX	105
2.22. Preparación de suero depletado de hemo	106
2.23. Formación de hemo <i>de novo</i> a partir de PPIX y ApoHbPPIX.....	107
2.24. Cuantificación de niveles citosólicos de hemo en formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i>	108
2.25. Entrada de porfirinas en las formas promastigotes de <i>Leishmania</i> spp.....	108
2.26. Eflujo de porfirinas en las formas promastigotes de <i>Leishmania major</i>	109
2.27. Infección <i>in vitro</i> de macrófagos THP1	110
2.28. Infección <i>in vivo</i> de ratones y su análisis	110
2.29. Ensayos de precipitación con hemina-agarosa.....	110
2.30. Ensayos de actividad catalasa	111
2.31. Búsqueda de inhibidores de las proteínas TrypHRG.....	111
2.32. Ensayos en oocitos	115
2.33. Determinación de hemo por HPLC-MS/MS	118
2.34. Análisis estadísticos	119

IV. Resultados y discusión	121
Capítulo 1: Caracterización de la entrada de porfirinas en <i>Leishmania</i> spp.	121
Resultados	121
1. Caracterización de la entrada de hemo en las formas promastigotes de <i>Leishmania donovani</i>	121
2. Caracterización de la entrada de porfirinas en las formas promastigotes de <i>Leishmania major</i>	126
3. Caracterización del eflujo de porfirinas en las formas promastigotes de <i>L. major</i>	136
Discusión.....	138
Capítulo 2: Los parásitos tripanosomátidos rescatan el hemo proveniente de la hemoglobina endocitada a través de transportadores HRG endolisosomales	147
Resultados	147
1. El genoma de <i>Trypanosoma brucei</i> contiene un gen HRG poco conservado.....	147
2. TbHRG es esencial en las formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i>	150
3. TbHRG se localiza en el compartimento endolisosomal del parásito	151
4. TbHRG es un transportador de hemo	152
5. TbHRG transporta el hemo liberado de la digestión de la hemoglobina al citoplasma de las levaduras	153
6. La proteína TbHRG lisosomal aumenta los niveles citosólicos de hemo a partir de la hemoglobina endocitada en las formas sanguíneas de <i>T. brucei</i>	157
7. La proteína LmHR1 de <i>Leishmania major</i> complementa la deficiencia de TbHRG en las formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i>	158
8. La proteína LmHR1 localizada en la vacuola de las levaduras también rescata el hemo procedente de la hemoglobina endocitada en levaduras.....	160
9. La proteína LmHR1 lisosomal rescata el hemo de la hemoglobina endocitada en <i>L. major</i>	163
Discusión.....	170
Capítulo 3: Captación de hemo en <i>Leishmania</i> mediada por LmFLVCRb, un nuevo transportador de porfirinas requerido para la virulencia del parásito	177
Resultados	177
1. Análisis bioinformático de las proteínas FLVCR de parásitos tripanosomátidos	177
2. Análisis de la secuencia de LmFLVCRb	179
3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HsFLVCR2 y LmFLVCRb	181
4. Localización celular de la proteína LmFLVCRb en promastigotes de <i>L. major</i>	182

5. Generación de líneas de <i>L. major</i> con niveles alterados de LmFLVCRb.....	183
6. LmFLVCRb está implicada en la captación de porfirinas en <i>Leishmania</i>	185
7. Niveles intracelulares de hemo en parásitos con distintos grados de expresión de <i>LmFLVCRb</i>	186
8. La proteína LmFLVCRb interacciona con el grupo hemo	186
9. LmFLVCRb lisosomal no importa hemo procedente de la Hb endocitada	187
10. La disminución de la expresión de <i>LmFLVCRb</i> aumenta la expresión de <i>LmHR1</i>	189
11. La proteína LmFLVCRb no importa hemo cuando se expresa de forma heteróloga en levaduras.....	189
12. La proteína LmFLVCRb importa hemo cuando se expresa de forma heteróloga en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	191
13. Efecto de LmFLVCRb sobre la viabilidad del parásito	197
14. Virulencia de los parásitos <i>LmFLVCRb</i> ^{+/} en un modelo <i>in vivo</i>	198
Discusión	200
Capítulo 4: Identificación de inhibidores de transportadores TrypHRG con potente actividad tripanocida utilizando un cribado de alto rendimiento en levaduras	205
Resultados.....	205
1. Las proteínas TrypHRG como nuevas dianas terapéuticas	205
2. La expresión funcional de TrypHRG en levaduras auxótrofas para el hemo posibilita la búsqueda de inhibidores en este modelo en formato HTS	207
3. Identificación de “hits”	211
4. Actividad tripanocida y leishmanicida de los compuestos seleccionados.....	214
Discusión	216
V. Conclusiones	223
VI. Bibliografía.....	223
VII. Anexos	223

Abreviaturas

ABC	ATP Binding Cassette
ADNc	ADN complementario
ALA	Ácido δ -amino levulínico
APC	Célula presentadora de antígenos, del inglés <i>Antigen Presenting Cell</i>
ApoHb	Apohemoglobina, molécula de hemoglobina a la que se ha retirado el grupo hemo
ApoHbPPIX	Apohemoglobina-PPIX, molécula de hemoglobina a la que se ha retirado el grupo hemo y se ha sustituido por PPIX
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN guía
ARNm	ARN mensajero
ATF	Formas de <i>Trypanosoma brucei</i> presentes en el tejido adiposo, del inglés <i>Adipose Tissue Forms</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BCRP	Proteína resistente al cáncer de mama, del inglés <i>Breast Cancer Resistant Protein</i>
BSA	Albúmina bovina de suero
BSF	Formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i> , del inglés <i>Bloodstream Forms</i>
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
DAPI	4',6-diamidina-2-fenilindol dihidrocloro
DDM	Dodecilmaltósido
DIC	Contraste diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FLVCR	Receptor del virus de la leucemia felina, del inglés <i>Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor</i>
GA418	Geneticina
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HAT	Tripanosomiasis Africana Humana, del inglés <i>Human African Trypanosomiasis</i>
Hb	Hemoglobina
HBP	Proteína de unión al hemo , del inglés <i>Heme Binding Protein</i>
HCP1	Proteína transportadora de hemo, del inglés <i>Heme Carrier Protein</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad, del inglés <i>High Density Lipoprotein</i>
Hp	Haptoglobina
Hp-Hb	Complejo haptoglobina-hemoglobina
Hpr	Proteína relacionada con la haptoglobina, del inglés <i>Haptoglobin related</i>
Hpr-Hb	Complejo proteína relacionada con la haptoglobina-hemoglobina, del inglés <i>Haptoglobin related-Hemoglobin</i>

HRG	Genes de respuesta al hemo, del inglés <i>Heme Responsive Genes</i>
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50 % de crecimiento
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalacto-piranósido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
LC	Leishmaniasis cutánea
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
M	Molar
MFS	Superfamilia de proteínas transportadoras de membrana, del inglés <i>Major Facilitator Superfamily</i>
min	Minutos
MTT	Bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NO	Óxido nítrico
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés <i>Open Reading Frame</i>
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCF	Formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i> , del inglés <i>Procyclic Forms</i>
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chase Reaction</i>
PMA	Acetato de forbolmiristato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qRT-PCR	PCR para la cuantificación de la expresión génica relativa
RKA	Rotenona, KCN y Antimicina A
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	PCR acoplada a una reacción de transcripción inversa
SBF	Suero bovino fetal
SBFf	Suero bovino fetal filtrado (depletado de hemo)
SC	Medio de cultivo de levaduras, del inglés <i>Synthetic complete</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
SLC	Proteína transportadora de soluto, del inglés <i>Solute Carrier</i>
SSC	Tampón salino citrato sódico
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TbHpHbR	Receptor de <i>Trypanosoma brucei</i> para el complejo haptoglobina-hemoglobina
TE	Tampón Tris-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TLF	Factores líticos de tripanosomas, del inglés <i>Trypanolytic Factor</i>
TMD	Dominio transmembrana, del inglés <i>Transmembrane domain</i>
UTR	Región no codificante, del inglés <i>UnTranslated Region</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia adquirida
VSG	Glicoproteína de superficie variable, del inglés <i>Variant Surface Glycoprotein</i>
WT	Cepa silvestre, del inglés <i>Wild Type</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YPD/YPG	Extracto de levaduras peptona dextrosa, del inglés <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. Leishmaniasis

1.1. Generalidades

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades parasitarias, con una amplia diversidad clínica y epidemiológica, causada por protozoos parásitos intracelulares del género *Leishmania* transmitidos por la picadura de flebotomos infectados.

La enfermedad se conoce desde hace mucho tiempo, con varias descripciones primitivas de los síntomas encontradas en escritos antiguos que datan del año 2.500 a. C. (Akhoundi, Kuhls et al. 2016).

Según datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud), se estima que existe una incidencia total de aproximadamente 12 millones de casos de leishmaniasis en todo el mundo y que alrededor de 350 millones de personas habitan en zonas de riesgo de contraer la enfermedad (Alvar, Vélez et al. 2012). En total, los datos oficiales indican que son más de 58.000 casos de leishmaniasis visceral y más de 220.000 casos de leishmaniasis cutánea los que aparecerían cada año (Alvar, Vélez et al. 2012). Pero, teniendo en cuenta que las tasas de registro son insuficientes ya que sólo las dos terceras partes de los países afectados registran estos datos, podríamos decir que las verdaderas tasas de incidencia de la leishmaniasis pueden ser sustancialmente mayores. Aproximadamente entre 0.2 y 0.4 millones de casos de leishmaniasis visceral y entre 0.7 y 1.3 millones de casos de leishmaniasis cutánea se pueden producir cada año (Alvar, Vélez et al. 2012).

La distribución geográfica de la leishmaniasis está relacionada con la distribución del vector, sensible a climas fríos, siendo por tanto particularmente común en regiones tropicales y subtropicales. Hasta en un total de 98 países se ha descrito transmisión endémica de la leishmaniasis, encontrándose la mayoría de estos países en vías de desarrollo (Alvar, Vélez et al. 2012). Aunque es una enfermedad concentrada de forma mayoritaria en estos países dentro del sudeste asiático, este de África y Latinoamérica, también es una enfermedad endémica en distintos países de la cuenca mediterránea (Pace 2014). De tal forma que, según datos de la OMS, el 90% de los casos ocurre en seis países del Viejo Mundo (Afganistán, Argelia, Arabia Saudí, Irán, Sudán y Siria) y dos países del Nuevo Mundo (Brasil y Perú) (Von Stebut 2015).

Especialmente en los países de la cuenca mediterránea se está produciendo un marcado aumento en el número de infecciones (Alvar, Vélez et al. 2012, Okwor and Uzonna 2013, Pace 2014); la causa es presumiblemente el aumento de individuos inmunosuprimidos, debido a las infecciones con el virus de la inmunodeficiencia (VIH), a los trasplantes, a los agentes quimioterapéuticos y a las terapias biológicas recientemente introducidas para el tratamiento de condiciones inflamatorias crónicas (Olea and Pinilla 2013, Pace 2014, Von Stebut 2015). Además, los viajes internacionales han causado un aumento de casos de leishmaniasis en países no endémicos (Field, Gautret et al. 2010).

Por otra parte, supone un problema importante también la aparición de resistencias a los fármacos utilizados que se está desarrollando en muchos casos (más del 70% en algunas regiones de la India). De esta forma la leishmaniasis constituye actualmente un importante problema de salud pública a nivel mundial, mostrando una carga creciente en la última década (Akhoundi, Kuhls et al. 2016).

En España esta enfermedad fue descrita por primera vez por el médico granadino Fidel Fernández Martínez en los años 20. El agente etiológico de la leishmaniasis en la cuenca mediterránea es principalmente *Leishmania infantum* (Kaszak, Planellas et al. 2015), la especie con mayor distribución mundial denominada por algunos autores como *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. Esta especie puede producir leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea, como se detallará más adelante



Figura 1. Fotografías de los primeros casos de La imagen de la izquierda muestra un paciente con leishmaniasis visceral o kala-azar en España, y en la imagen de la derecha se puede observar el denominado Botón de Oriente en la mejilla de una niña (leishmaniasis cutánea). Fotografías de Fidel Fernández Martínez (1922), por cortesía de su hijo Fidel Fernández Rubio.

La enfermedad suele ser una zoonosis (enfermedad transmitida al hombre por los animales), siendo los animales vertebrados, como el perro, el hospedador natural, si bien el hombre puede ser infectado de forma accidental. Hay además una gran diversidad de animales que pueden ser considerados como animales reservorios, son los portadores asintomáticos, entre los que se encuentra la liebre, que fue precisamente el reservorio responsable del brote de leishmaniasis que afectó a la provincia de Madrid en 2009 (Molina, Jiménez et al. 2012). La leishmaniasis también puede ser una antroponosis (enfermedad transmitida de una persona a otra a través del insecto vector), como se ha descrito en la India (Desjeux 2004). La leishmaniasis canina es endémica en más de 70 países y afecta a 2.5 millones de perros (Kaszak, Planellas et al. 2015), siendo mortal en la mayoría de los casos cuando no reciben tratamiento y ocasionando un grave problema dentro del ámbito veterinario. Además, al ser considerado el principal reservorio de estos parásitos para el humano, esta alta prevalencia supone un riesgo para la salud humana. En España los perros con serología positiva para *L. infantum* se encuentran distribuidos por toda la geografía, pudiendo oscilar el porcentaje de prevalencia entre el 5 y el 34% en zonas como Andalucía (Suárez Rodríguez, Isidoro Fernández et al. 2012).

Entre las enfermedades parasitarias, la mortalidad por leishmaniasis es sólo superada por la malaria, y, en términos de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), es la tercera causa más común de morbilidad después de la malaria y la esquistosomiasis, siendo los niños menores de 15 años de edad los que sufren la mayoría de las cargas de la enfermedad (Pace 2014, Savoia 2015). Además, la coinfección con VIH, tanto para la leishmaniasis cutánea como para la leishmaniasis visceral, empeora significativamente el pronóstico para ambas infecciones (Olea and Pinilla 2013).

1.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La infección por *Leishmania* spp. puede ser asintomática o puede manifestarse de distintas formas. Estas manifestaciones clínicas pueden ser: leishmaniasis visceral con inflamación grave del hígado y del bazo, la forma más grave de la enfermedad y que puede ser letal si no es tratada; leishmaniasis cutánea con úlceras que cicatrizan espontáneamente, la forma más común; y leishmaniasis mucocutánea, debida a una diseminación linfática o hematogena del parásito desde una lesión cutánea (Savoia 2015).

La inoculación de los parásitos en la epidermis por parte del flebotomo genera una respuesta inflamatoria local, movilizándose los neutrófilos y los macrófagos que secretan quimioquinas mediadoras de inflamación (TNF α , IL-1 e IL-12) y desempeñan un papel crítico para el control del parásito y la respuesta patológica. Los parásitos son inoculados junto con la saliva del flebotomo, que contiene factores (como el vasodilatador maxadilan) que provocan una extravasación de sangre y aumentan la difusión de los parásitos en el punto de inoculación y la quimiotaxis de los macrófagos (Reddy, Li et al. 2008). Distintos estudios han demostrado que la inoculación de los parásitos produce respuestas diferentes en función de si va acompañada o no de la saliva del flebotomo, de tal forma que puede modular la respuesta inmune (Mbow, Bleyenbergh et al. 1998).

Los parásitos son captados en la epidermis por las células presentadoras de antígenos (APCs), como las células de Langerhans y los macrófagos, que tienen en su interior moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estas células se desplazan al ganglio linfático próximo donde presentan los antígenos a las células linfoides. Los antígenos pueden unirse a las moléculas CMH de clase I, siendo reconocidas por las células T del tipo CD8+ (citotóxicas, productoras de una citotoxina que provoca la lisis del parásito), o a las de clase II, siendo reconocidas en este caso por las células T del tipo CD4+ (Th o cooperadoras, muy importantes en la respuesta inmune) (Stuart, Brun et al. 2008).

La **leishmaniasis cutánea** es la manifestación menos severa de las producidas por especies del género *Leishmania*, y la más frecuente (ocurre en el 90% de los pacientes) (Von Stebut 2015). Se denomina como “botón de Oriente” la lesión que aparece tras la picadura del insecto vector (leishmaniasis cutánea localizada), y ocurre cuando la respuesta inmune queda reducida a los macrófagos infectados en la zona de la picadura.

Cuando los parásitos alcanzan las mucosas se produce una variedad de esta forma de enfermedad, la **leishmaniasis cutánea difusa**. Esta variedad es causada por *L. amazonensis*, en ella aparecen lesiones distantes del sitio de picadura y puede requerir de tratamiento para su curación (McGwire and Satoskar 2013).

Además dentro de la leishmaniasis cutánea podemos encontrar lesiones que curan de forma espontánea dentro de los 3-12 meses siguientes la infección dejando cicatrices profundas (serían las lesiones causadas por *L. major* y *L. braziliensis*) y lesiones que tardan

más de 18 meses en curarse (producidas por *L. tropica* y *L. braziliensis*), y que pueden evolucionar a **leishmaniasis mucocutánea** (LMC) (Stuart, Brun et al. 2008).

En la LMC, los parásitos se diseminan a partir del lugar de la picadura y aparecen lesiones con destrucción del cartílago que afectan a las mucosas de la nariz, la cavidad bucal y la región rinofaríngea. Estas lesiones de la leishmaniasis mucocutánea pueden aparecer en unos cuantos meses o a los años de la lesión primaria. La muerte de estos pacientes suele deberse a infecciones secundarias o malnutrición, debido en este último caso a la lesiones en el aparato digestivo (McGwire and Satoskar 2013). Décadas después de haberse curado las lesiones de la leishmaniasis cutánea puede haber recaídas, que es lo que se conoce como **leishmaniasis recurrente** (McGwire and Satoskar 2013)



WHO,

Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013.

La **leishmaniasis visceral** también se conoce como “kala-azar” (término hindú para “fiebre negra”, debido a que puede aparecer una pigmentación oscura en la piel (Von Stebut 2015) y aparece como resultado de la infección de los fagocitos dentro del sistema retículoendotelial debido a la diseminación de los parásitos, viéndose afectados órganos vitales como el bazo, el hígado o la médula ósea. Como consecuencia de la proliferación de los parásitos en los macrófagos aparece esplenomegalia, hepatomegalia y supresión de la médula ósea. Si no hay tratamiento, los pacientes desarrollan pancitopenia e inmunosupresión, siendo propensos a infecciones con otros microorganismos. Esta

I. Introducción

manifestación clínica aparece en la infección por *L. donovani* (regiones de India, Pakistán, China y África) y *L. infantum* (cuenca mediterránea y Nuevo Mundo).

Por otra parte, en individuos que han superado de forma adecuada la enfermedad y que pueden vivir de forma asintomática durante períodos largos de tiempo, pueden aparecer lesiones cutáneas conocidas como **leishmaniasis cutánea post kala-azar**, esto ocurre principalmente en pacientes infectados con *L. donovani* en la India y Sudán (McGwire and Satoskar 2013). Estos pacientes se consideran como un reservorio para la modalidad antroponótica de esta enfermedad, porque los parásitos quedan expuestos en la piel (Von Stebut 2015). En individuos con el sistema inmune deprimido (como es el caso de pacientes con VIH), se incrementa la severidad de la enfermedad (McGwire and Satoskar 2013).

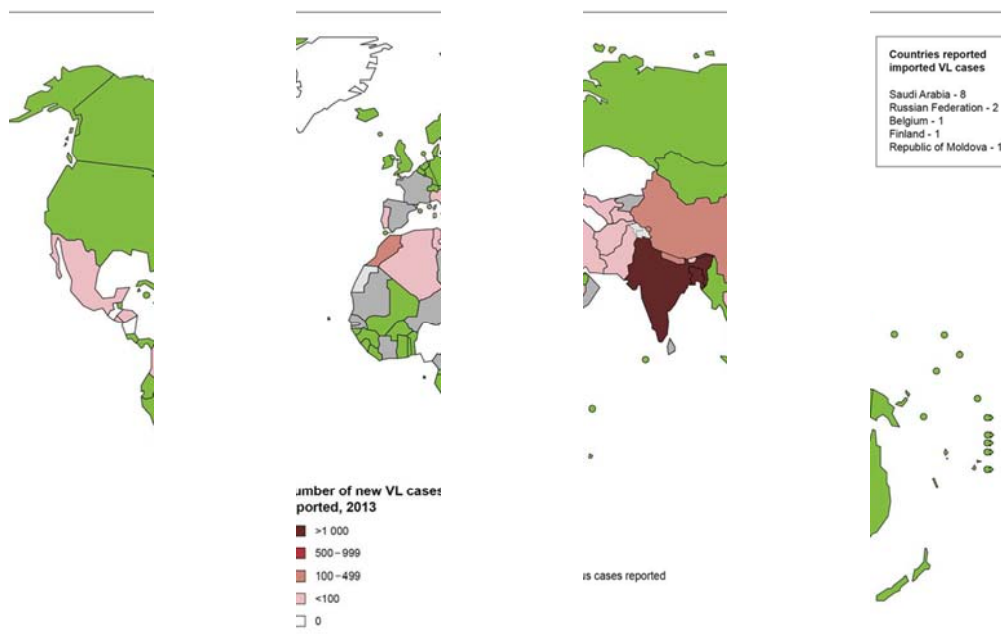


Figura 3. Endemismo de la leishmaniasis visceral. Tomado de Neglected tropical diseases, WHO, Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013.

Algunas especies como *L. major* producen sólo enfermedad cutánea, mientras que la infección con *L. donovani* origina enfermedad visceral. Por el contrario, especies como *L. infantum* pueden causar tanto enfermedad cutánea como enfermedad visceral (Pace 2014). Esta variabilidad de manifestaciones clínicas se debe por un lado a la especie infectiva dentro del género *Leishmania* (tabla 1) y a su adaptación evolutiva, ya que muestran afinidad por uno u otro órgano del hospedador (Pace 2014). Por otro lado, la forma clínica de la leishmaniasis que se desarrolla depende de la respuesta inmune del hospedador, donde juegan un papel fundamental las características genéticas del individuo (Pace 2014, Savoia 2015). En esta

respuesta inmune cobran especial importancia los acontecimientos inmunológicos tempranos que ocurren en la piel y en el ganglio linfático, condicionada a su vez por las características del parásito y del hospedador (Pace 2014).

Stebut

1.3. Agente etiológico: *Leishmania* spp.

Leishmania es un género de protozoos parásitos intracelulares y monoflagelados, que pertenece a la clase *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*. De este género se han descrito 53 especies, de las cuales se conoce que 31 son parásitos de mamíferos y 20 son patógenas para los seres humanos (Akhoundi, Kuhls et al. 2016).

El vector biológico de *Leishmania* spp. son las hembras de los flebotomos, pertenecientes al orden *Diptera*, familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo

(América). Hay más de 800 especies descritas (464 se encuentran en el Nuevo Mundo y 375 en el Viejo). Entre todas estas especies, sólo en 34 se ha comprobado que sean vectores que desempeñen un papel importante en la transmisión de la leishmaniasis (Geiger and Pissarra 2016).

En España hay dos especies de flebotomos, *P. perniciosus* y *P. ariasi*, que han demostrado ser vectores competentes para transmitir *L. infantum* (Suárez Rodríguez, Isidoro Fernández et al. 2012). También se ha descrito la garrapata como vector potencial de *Leishmania* spp., tanto en zonas endémicas de América como en la cuenca mediterránea (Dabaghmanesh, Asgari et al. 2016, Viol, Guerrero et al. 2016).

Los parásitos de este género se clasifican en dos subgéneros en función de la región del intestino del vector en que tiene lugar la presencia y la multiplicación de las formas parasitarias. En el caso de las especies de *Leishmania* subgénero *Viannia*, la multiplicación de las formas parasitarias tiene lugar principalmente en el intestino posterior y en el caso del subgénero *Leishmania*, en el intestino anterior o medio (Cuervo, Domont et al. 2010).

Las diferentes especies son indistinguibles morfológicamente, pero pueden ser diferenciadas mediante análisis de isoenzimas, métodos moleculares (análisis del ADN del núcleo y del kinetoplasto) o con anticuerpos monoclonales (revisado en (Schwarz, Loderstaedt et al. 2015) y (Banuls, Hide et al. 2007)).

El genoma de *Leishmania* está formado por 32.8 Mb y está organizado en 36 cromosomas relativamente pequeños (De Gaudenzi, Noe et al. 2011). Estos parásitos presentan una alta plasticidad génica que supone una clara ventaja adaptativa y que está

relacionada con la resistencia a fármacos. Pueden alterar el número de copias de genes individuales, grupos de genes o cromosomas (Sterkers, Lachaud et al. 2012).

Las especies de *Leishmania* colonizan dos hospedadores y este ciclo de vida digenético incluye dos formas distintas del parásito. La forma intracelular o **amastigote**, ovalada o redondeada e inmóvil, con un tamaño de 2-5 μm (Fig. 5), está presente en las células del sistema del retículo endotelial del hospedador vertebrado. El otro estadio está presente en el hospedador invertebrado, en el tracto intestinal de los flebotomos y sería la forma **promastigote**, que es extracelular, alargada (20 μm de longitud) y móvil, con un flagelo casi de igual tamaño que el cuerpo (Fig. 5).

Figura 5. Formas promastigote y amastigote del parásito. Tomado de www.shutterstock.com
Derechos de autor de la Imagen: Designua, IDENTIFICACIÓN de la Imagen: 278972486.

El ciclo se inicia cuando las hembras de los flebotomos, durante la ingesta de sangre que realizan para alimentarse y poder desarrollar sus huevos, inoculan con su picadura los parásitos en el estadio de promastigotes metacíclicos, que son altamente infectivos.

En el hospedador vertebrado, los parásitos son captados por los neutrófilos y las células presentadoras de antígenos, como las células de Langerhans y los macrófagos de la dermis, y se engloban en el interior de la **vacuola parasitófora**. Aquí se transforman en la forma amastigote y se dividen activamente mediante sucesivas divisiones binarias. La vacuola parasitófora, de carácter endolisosomal, presenta un bajo pH y es rica en aminoácidos, por lo que los amastigotes adaptan su metabolismo y nutrición (Stuart, Brun et al. 2008).

I. Introducción

La célula estalla tras la multiplicación de los amastigotes y estos quedan libres para invadir otros macrófagos vecinos, donde se repite la multiplicación de los parásitos. También pueden diseminarse a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas o ser arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en médula ósea, hígado y bazo principalmente (Carvalho, Cruz et al. 2009). Desde el torrente sanguíneo los parásitos pueden ser ingeridos de nuevo por las hembras de los flebotomos al ingerir macrófagos infectados presentes en la sangre. Una vez en el interior del tubo digestivo del vector, se diferencian a la forma promastigote en un mínimo de siete días, y se multiplican activamente. Los promastigotes metacíclicos se van a situar en la probóscide, desde donde pasarán al hospedador vertebrado, cerrando así el ciclo (Chang and Chang 1985).

:es
on
se
los
ira
a
la
en

1.4. Tratamiento de la leishmaniasis

Ya durante el siglo XX existía el objetivo de desarrollar una vacuna que cumpliera con los requisitos de seguridad, accesibilidad a las poblaciones en riesgo, capacidad de inducir la respuesta de las células T de larga duración específica de CD4 y CD8, eficacia contra especies de *Leishmania* cutánea y visceral, estabilidad a temperatura ambiente para lograr una distribución adecuada y con el potencial terapéutico y profiláctico adecuados (De Luca and Macedo 2016).

Se empezó con la inoculación de parásitos virulentos en zonas normalmente no visibles, en un proceso llamado “leishmanización”, proceso que se prohibió debido a la inmunosupresión y a la aparición de cicatrices que no curaban.

La primera generación de vacunas reemplazó los parásitos vivos por formas promastigotes muertas y se ensayó contra la leishmaniasis cutánea y la visceral, pero se observó una escasa protección contra el desarrollo de la enfermedad. De esta forma su uso quedó relegado como complemento a la terapia con fármacos, pero no como profiláctico. La segunda generación se basó en la utilización de subunidades o antígenos recombinantes de los parásitos, mientras que la tercera generación sería la basada en la utilización del ADN. Dentro de los antígenos que se han utilizado en las vacunas de ADN están las proteínas gp63, Hsp 70 o el receptor de la hemoglobina, que han desarrollado de manera eficaz inmunogenicidad y respuesta protectora en modelos animales (Guha, Gupta et al. 2013, Kumar and Engwerda 2014, Kaur, Kaur et al. 2016). A pesar de los numerosos esfuerzos que se están realizando para la identificación de un gran número de antígenos y los avances en esta tecnología, todavía no hay un candidato capaz de proporcionar en humanos el nivel de protección necesario para el control de la enfermedad debido a diferentes causas, siendo la principal la complejidad de la respuesta inmune celular de este parásito ((Pace 2014) y revisado en (De Luca and Macedo 2016)). Ninguno de los fármacos disponibles se considera ideal debido a que presentan una elevada toxicidad, necesitan de tratamientos de larga duración y originan reacciones adversas severas, que a menudo conducen a un abandono del tratamiento. Además, la mayoría de los fármacos más utilizados tienen una administración complicada que en muchos casos requiere hospitalización y a pesar de ello no consiguen eliminar completamente los parásitos de todos los individuos infectados (de Menezes, Guedes et al. 2015).

Los **antimoniales** son los fármacos más utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis. Se administran como sales orgánicas de antimonio pentavalente, en forma de estibogluconato sódico (Pentostam®) o antimoniato de meglumina (Glucantime®). El Sb^V se reduce a Sb^{III} (que es la forma más tóxica) debido a la acción de enzimas reductasas de los macrófagos y de las formas amastigotes de *Leishmania* (Shaked-Mishan, Ulrich et al. 2001), en un proceso favorecido por la presencia de tripanotión. La forma reducida de Sb^{III} causa la inhibición de procesos metabólicos esenciales y altera el equilibrio redox del parásito. Además, Sb^{III} compite con el Zn en la interacción de los ácidos nucleicos con las proteínas que presentan dedos de Zn, de tal forma que el ADN se fragmenta y se produce la muerte de los tripanosomátidos (Reguera, Morán et al. 2016).

Los fármacos antimoniales presentan cierta toxicidad debido a su acumulación en los tejidos, provocando efectos secundarios, como náuseas, dolor abdominal o mialgias, que en algunos casos podrían ser mortales, como arritmias cardíacas o pancreatitis acusada. Su administración es vía intravenosa, intramuscular o intralinfática, y el tratamiento puede alcanzar el mes de duración.

Además, en los últimos años se ha venido incrementando el número de casos de fallo terapéutico (más del 65 % de los casos en el estado de Bihar, donde se encuentra el 92 % de los casos de leishmaniasis visceral y el 45 % a nivel mundial) lo que ha llevado a la supresión de su empleo en algunas zonas de la India, (Murray, Berman et al. 2005). El fallo terapéutico suele ser debido a la aparición de parásitos resistentes al tratamiento. Dentro de estos mecanismos de resistencia se encuentra la sobreexpresión de distintos transportadores ABC y de enzimas involucradas en el metabolismo de tioles (Ashutosh, Sundar et al. 2007). Estos transportadores ABC están implicados en el secuestro y/o eflujo del fármaco conjugado a tioles por lo que disminuyen sus niveles intracelulares. Por otra parte, la proteína AQP1 media la entrada del antimonio al citosol (Gourbal, Sonuc et al. 2004), de tal forma que una reducción en la expresión de esta proteína también origina una resistencia al antimonio en estos parásitos (Marquis, Gourbal et al. 2005).

La **miltefosina** (hexadecilfosfocolina) es un fosfolípido sintético, de administración oral y tópica, que fue desarrollado en su origen como fármaco antitumoral oral. Como efectos secundarios puede producir intolerancia gastrointestinal (vómitos y diarreas), siendo este efecto secundario menos frecuente que la inducción de nefrotoxicidad y

hepatotoxicidad. Además es teratogéno, lo que impide su administración en mujeres embarazadas.

Es un fármaco efectivo contra la leishmaniasis visceral y contra la mayoría de las especies que producen leishmaniasis cutánea. Su larga vida media puede potenciar la aparición de resistencias cuando su uso sea prolongado (Sundar, Singh et al. 2012, Sundar and Singh 2016). Su mecanismo de acción no está demasiado claro aún, pero probablemente se relaciona con su actividad de detergente, por lo que alteran numerosos procesos celulares (Reguera, Morán et al. 2016). Su efectividad frente a *Leishmania* se basa en que es incorporado al parásito a través de un transportador específico del parásito (LMT). LMT forma, junto a una subunidad β reguladora, un complejo translocasa de fosfolípidos en la membrana plasmática que también es capaz de internalizar la miltefosina (Pérez-Victoria, Gamarro et al. 2003, Pérez-Victoria, Sánchez-Cañete et al. 2006).

Se han descrito dos posibles mecanismos de resistencia a la miltefosina *in vitro* en las formas promastigotes de *Leishmania* (Pérez-Victoria, Sánchez-Cañete et al. 2006). El primero que se describió se debe a un aumento en su eflujo, debido a una sobreexpresión de los transportadores ABCs como la proteína LPgp/LMDR1/LABCB4 (Pérez-Victoria, Pérez-Victoria et al. 2001, Pérez-Victoria, Cortés-Selva et al. 2006) o la proteína LABCG6 (Castanys-Muñoz, Pérez-Victoria et al. 2008). El segundo mecanismo aparece con mayor facilidad y consiste en la inactivación debido a mutaciones de una de las dos proteínas que forman el complejo de captación de miltefosina (Pérez-Victoria, Gamarro et al. 2003, Pérez-Victoria, Sánchez-Cañete et al. 2006, García-Sánchez, Sánchez-Cañete et al. 2014). Recientemente también se han descrito casos de resistencia clínica a miltefosina en la India (Srivastava, Mishra et al. 2017).

La **anfotericina B** es un antibiótico antifúngico de amplio espectro. Es eficaz en más del 90 % de los casos pero puede presentar como efectos secundarios una severa nefrotoxicidad, dolor de huesos, hipopotasemia, miocarditis y reacciones relacionadas con su administración, que es intravascular y que también requiere un período largo de hospitalización (20 días). Como alternativa se pueden utilizar formulaciones lipídicas como la Anfotericina B liposomal (AmBisome®), que requiere una única dosis y cuyos efectos secundarios son más leves, pero tiene un coste muy elevado lo que restringe su utilización en países en desarrollo (Sundar and Singh 2016).

La resistencia clínica a anfotericina B es poco común, debido a su elevada eficacia y una relativa vida media corta de 24 h (revisado en (van Griensven, Balasegaram et al. 2010)), pero también se ha descrito algún caso en la India (Srivastava, Prajapati et al. 2011). La anfotericina B es una molécula anfipática que se inserta en las membranas que contienen ergosterol, como la de los parásitos tripanosomátidos, originando una despolarización de la membrana que conducen a la muerte celular (Cohen 2016). Además, se produce un incremento de ROS por oxidación de la anfotericina B en el interior celular (Purkait, Kumar et al. 2012). En aislados clínicos de *L. donovani* se han encontrado formas resistentes a anfotericina B que habían incorporado colesterol exógeno a sus membranas, reduciendo de esta forma su contenido en ergosterol. En estas formas también se observó un incremento en la expresión de las proteínas de choque térmico y de las enzimas de la ruta de los tioles como mecanismo de respuesta al incremento de ROS (Purkait, Kumar et al. 2012, Brotherton, Bourassa et al. 2014). Por último, también la sobreexpresión de la proteína MDR1 está relacionada con un aumento en el eflujo de anfotericina B (Purkait, Kumar et al. 2012).

La **pentamidina** es una poliamina utilizada inicialmente en el tratamiento de la neumonía causada por *Pneumocystis carinii*. Puede provocar diabetes mellitus como consecuencia del daño que produce en el páncreas, además de hipotensión, taquicardias, náuseas y vómitos (Sundar and Singh 2016). Es de administración intramuscular pudiendo provocar también dolor en el lugar de la administración. Es un fármaco cada vez menos utilizado en monoterapia debido a la aparición de resistencias, además de ser eficaz sólo para algunas formas específicas de leishmaniasis cutánea, (revisado en (de Menezes, Guedes et al. 2015)). La proteína PRP1/ABCC7 es responsable *in vitro* de la aparición de resistencias frente a la pentamidina (Coelho, Messier et al. 2007).

La **paramomicina** es un antibiótico aminoglucosídico que es activo también frente a una gran variedad de patógenos, incluyendo las bacterias. Es de administración vía intramuscular para la leishmaniasis visceral y vía tópica para la leishmaniasis cutánea (de Menezes, Guedes et al. 2015). Como efectos secundarios puede provocar ototoxicidad y nefrotoxicidad y, de forma menos frecuente, hepatotoxicidad. Actúa bloqueando la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosómico 16s (McGwire and Satoskar 2013). Debido a su relativo bajo coste podría utilizarse como fármaco de primera elección, pero sólo en algunos casos ya que su eficacia varía entre y dentro de las regiones (de Menezes, Guedes et al. 2015).

In vitro se han generado cepas resistentes a paromomicina que mostraron un aumento en la expresión de la proteína fosfatasa 2A y de los transportadores ABC MDR1 y MRPA (Bhandari, Sundar et al. 2014), relacionados también con la resistencia a miltefosina y anfotericina B y a los fármacos antimoniales, respectivamente (Leprohon, Legare et al. 2006, Purkait, Kumar et al. 2012). En estos parásitos también se observó un incremento en la fluidez de la membrana lo que indicaba una alteración en la composición de la membrana de estos parásitos (Bhandari, Sundar et al. 2014).

El **alopurinol** es un análogo estructural de la hipoxantina, que inhibe las enzimas que llevan a cabo la interconversión de las purinas en *Leishmania*, de tal forma que afecta a la biosíntesis del ARN y por tanto a las proteínas del parásito (Reguera, Morán et al. 2016). Es un fármaco de administración oral que combinado con otros fármacos leishmanicidas potencia su efecto antiparasitario. Se utiliza frente a las leishmaniasis canina y humana en combinación con antimoniales y miltefosina (McGwire and Satoskar 2013, Reguera, Morán et al. 2016).

Los **azoles** son antifúngicos que inhiben la ruta de síntesis del ergosterol, que es el esterol predominante en las membranas de *Leishmania* spp., igual que ocurre en el caso de los hongos (Balaña-Fouce, Reguera et al. 1998). En este grupo encontramos por ejemplo el ketoconazol y el fluconazol que presentan actividad contra algunas especies que producen leishmaniasis cutánea (como *L. major* y *L. braziliensis*). Como efectos adversos presentan síntomas gastrointestinales y hepatotoxicidad, que deben ser vigilados debido a su importancia (Eiras, Kirkman et al. 2015).

Además de seguir investigando nuevos fármacos también se trabaja en el desarrollo de nuevas fórmulas de administración de los fármacos ya en uso. Como comentábamos para el caso de la anfotericina B, el uso de formulaciones lipídicas presenta una eficacia excelente y menos toxicidad, pero su elevado coste es un factor limitante para su utilización. También se está investigando la administración de los fármacos utilizando nanopartículas, que son reconocidas como cuerpos extraños y fagocitadas por los macrófagos que también albergan los parásitos, lo que lleva a una liberación dirigida del fármaco (Sundar and Singh 2016). Entre los fármacos candidatos a ser administrados con nanopartículas podemos citar la anfotericina B (Sundar and Singh 2016) y la paramomicina (Heidari-Kharaji, Taheri et al. 2016).

La estrategia más recomendada actualmente por la OMS es el uso de **terapias combinadas**, utilizando fármacos de distinta estructura química. Con ello se pretende

conseguir una mayor eficacia terapéutica así como una reducción en la toxicidad y período de tratamiento, y una disminución de las probabilidades de adquisición de resistencias. La posibilidad de desarrollar resistencias gracias a la gran plasticidad cromosómica debería ser menor si el parásito tiene que enfrentarse continuamente a más de un fármaco (van Griensven, Balasegaram et al. 2010). Entre otras las combinaciones que se han utilizado en la India y que han logrado un 98% de tasa de curación, han sido: AmBisome® + miltefosina, AmBisome® + paramomicina y miltefosina + paramomicina (Barrett and Croft 2012). Frente a alguna de estas combinaciones de fármacos (anfotericina B + paramomicina, anfotericina B + miltefosina y miltefosina + paramomicina) se ha demostrado la posibilidad de generar *in vitro* líneas resistentes de *L. donovani* (García-Hernández, Manzano et al. 2012), que presentan además una mayor capacidad de supervivencia dentro del macrófago (García-Hernández, Gómez-Pérez et al. 2015). Por otra parte, también se han descrito resistencias cruzadas como respuesta al uso de terapias combinadas, en concreto a la utilización de anfotericina B + miltefosina, observándose *in vitro* la asociación entre mutaciones puntuales del transportador de miltefosina y la resistencia a anfotericina B (Fernández-Prada, Vincent et al. 2016).

Contra la leishmaniasis canina el protocolo más común llevado a cabo es la combinación de antimonio de meglumina administrado junto con alopurinol (Miro, Cardoso et al. 2008, Kaszak, Planellas et al. 2015). Por desgracia, incluso si los perros se recuperan clínicamente después del tratamiento, la eliminación de parásitos rara vez se logra y pueden recaer en la enfermedad (Kaszak, Planellas et al. 2015).

Frente a la leishmaniasis canina se han desarrollado algunas vacunas con resultados prometedores, como Leishmune®, Leishtec y CaniLeish®, que animan a la comunidad científica a seguir trabajando en el desarrollo de una vacuna para los humanos (Jain and Jain 2015, Reguera, Morán et al. 2016).

2. Enfermedad del sueño

2.1. Generalidades

La tripanosomiasis africana, también llamada enfermedad del sueño, es una enfermedad parasitaria causada por *Trypanosoma brucei* y transmitida por la picadura de la

mosca tsé-tsé infectada (género *Glossina*). La mosca tsé-tsé se encuentra en el África subsahariana pero sólo ciertas especies transmiten la enfermedad.

La enfermedad del sueño afecta a 36 países del África subsahariana. Las personas más expuestas al contagio de la enfermedad son los habitantes de zonas rurales que se dedican a la agricultura, la pesca, la ganadería o la caza, siendo normalmente zonas remotas con poco acceso a los servicios de salud adecuados (OMS).

Trypanosoma brucei brucei y otras especies (*T. vivax* y *T. congolense*) son patógenos para los animales y causan la enfermedad llamada Nagana. La presencia de la tripanosomiasis en los animales domésticos, particularmente en el ganado, es un obstáculo importante para el desarrollo económico de las zonas rurales afectadas. Además, tanto los animales domésticos como los salvajes pueden hospedar parásitos patógenos para el ser humano, especialmente *T. b. rhodesiense* (Steverding 2008).

En el ser humano *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* producen la enfermedad del sueño. Las estimaciones actuales determinan que el número real de casos es inferior a 20.000, pero la población expuesta al riesgo de esta enfermedad es de unos 65 millones de personas (OMS).

2.2. Fases clínicas de la enfermedad

La enfermedad del sueño es una enfermedad casi siempre mortal en ausencia de tratamiento, y supone una amenaza para millones de personas. El impacto de la enfermedad veterinaria Nagana puede ser igualmente devastador, dado que se pierde un gran número de ganado bovino, teniendo graves consecuencias para el sustento de los granjeros africanos e impidiendo el desarrollo de la agricultura.

La primera fase de la enfermedad sería la **fase aguda hemolinfática** que aparece entre pocos días y semanas siguientes a la infección y que presenta síntomas inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza, malestar, mialgia, linfadenopatía o chancro tripanosómico (Stuart, Brun et al. 2008). La multiplicación del parásito es rápidamente contrarrestada por la respuesta inmune del hospedador, pero la variación antigénica del parásito le ayuda a evadir el sistema inmune, produciéndose ondas de parasitemia (Stuart, Brun et al. 2008).

La segunda fase sería la **fase meningoencefálica**, debida a la penetración del parásito en el sistema nervioso central. Los parásitos cruzan la barrera hematoencefálica e invaden el líquido cefalorraquídeo. Esta fase se caracteriza por síntomas neuropsiquiátricos y patrones anormales del sueño, conduciendo finalmente al coma cerebral que lleva a la muerte en ausencia de tratamiento (Stuart, Brun et al. 2008).

La enfermedad en el humano puede adoptar dos formas en función del parásito causante:

a. **Infección crónica**, causada por *Trypanosoma brucei gambiense* en países de África occidental y central (Fig. 7). Esta forma representa en la actualidad más del 98 % de los casos notificados de enfermedad del sueño (Steverding 2010). Una persona puede estar infectada durante meses o incluso años sin presentar manifestaciones clínicas importantes. Cuando los síntomas aparecen es frecuente que la enfermedad esté ya muy avanzada, en la etapa de afección del sistema nervioso central.

b. **Infección aguda**, causada por *Trypanosoma brucei rhodesiense*, en África oriental y del sur (Fig. 8). Hoy en día esta forma representa menos del 2 % de los casos notificados (Steverding 2010). Los primeros signos y síntomas se observan a las pocas semanas o a los pocos meses después de la infección. La enfermedad evoluciona rápidamente y afecta al sistema nervioso central.

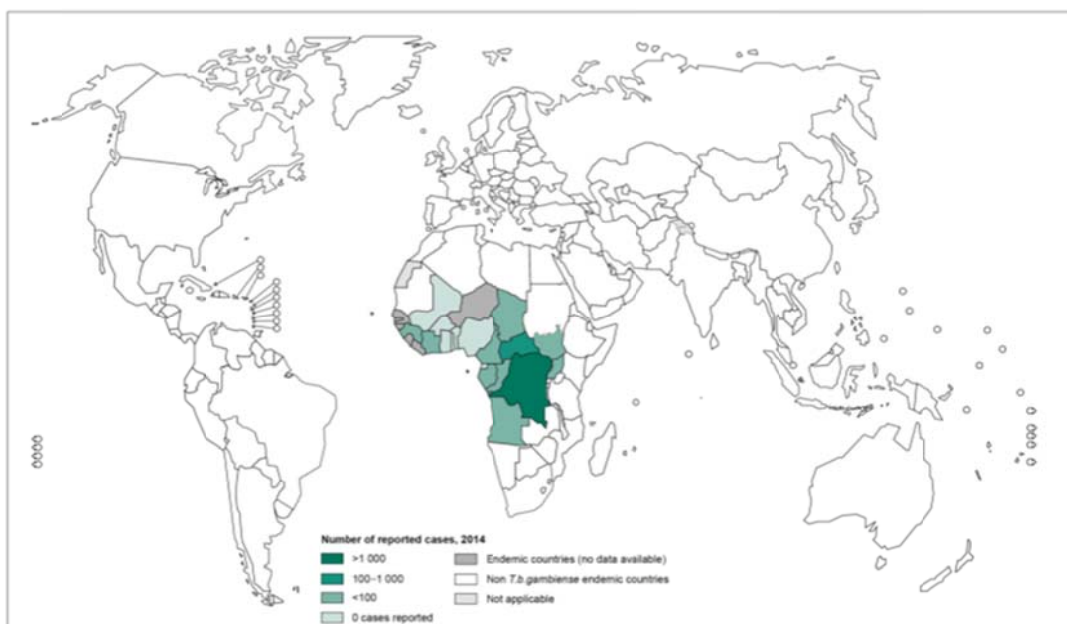


Figura 7. Distribución de la tripanosomiasis africana humana causada por *T.b. gambiense*. Tomado de Neglected tropical diseases, WHO, Human African trypanosomiasis. Annual country reports, 2014.



Figura 8. Distribución de la tripanosomiasis africana humana causada por *T.b. rhodesiense*. Tomado de Neglected tropical diseases, WHO, Human African trypanosomiasis. Annual country reports, 2014.

La separación geográfica clásica de las dos formas coincide aproximadamente con el Gran Valle del Rift (Franco, Simarro et al. 2014), siendo prevalentes las dos formas de la enfermedad sólo en Uganda, pero en zonas separadas (Picozzi, Fevre et al. 2005).

En ausencia de tratamiento los pacientes normalmente fallecen en el plazo de seis meses cuando la infección es debida a *T. b. rhodesiense*, o a lo largo de los 3 años siguientes si la enfermedad es causada por *T. b. gambiense* (revisado en (Schwarz, Loderstaedt et al. 2015)).

2.3. Agente etiológico de la enfermedad del sueño: *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei es un protozoo parásito extracelular monoflagelado que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*. Su genoma tiene 26 Mb organizados en 11 cromosomas grandes (De Gaudenzi, Noe et al. 2011).

El vector biológico de *T. brucei* son las moscas tsé-tsé pertenecientes al orden *Diptera*, suborden *Cyclorhapha*, familia *Glossinidae*, que incluye sólo al género *Glossina*. Este género incluye 23 especies y se subdivide generalmente en tres subgéneros (*Austenina*, *Namorhina* y *Glossina*), que corresponden más o menos a los distintos grupos de especies encontrados en diferentes entornos ecológicos (Geiger and Pissarra 2016).



Las diferentes subespecies de *T. brucei* colonizan dos hospedadores y este ciclo de vida digenético incluye formas distintas del parásito.

La mosca tsé-tsé inocular en el hospedador mamífero los **tripomastigotes metacíclicos** infectivos de *T. brucei* cuando hace su ingesta de sangre. Estos tripomastigotes metacíclicos se diferencian a **tripomastigotes de la forma sanguínea alargada** (long slender) y comienzan a replicarse en la sangre.

Entre 6 y 10 días posteriores a la infección, los parásitos comienzan a diseminarse y replicarse por todo el cuerpo a través del sistema circulatorio, pudiendo alcanzar también el sistema nervioso al traspasar la barrera hematoencefálica. En el pico de parasitemia, algunos tripomastigotes alargados se diferencian a **tripomastigotes de la forma sanguínea redondeada** (stumpy), no replicativa y adaptada para sobrevivir en la mosca tsé-tsé.

Estas formas pueden ser ingeridas de nuevo por una mosca tsé-tsé y transformarse a **tripomastigotes procíclicos**, la forma replicativa no infectiva. Estas formas se dividen mediante fisión binaria, colonizan el intestino medio del insecto y migran hacia las glándulas salivales de la mosca donde rápidamente se transforman en **epimastigotes**, quedando adheridos por el flagelo a la pared de las glándulas.

Los epimastigotes continúan replicándose y finalmente se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que serán transmitidos por la mosca al hospedador mamífero, completándose así el ciclo (Cuervo, Domont et al. 2010).

de vida de *Trypanosoma brucei*. Durante el proceso de alimentación de la mosca tsé-tsé, los tripomastigotes metacíclicos son inoculados en el torrente sanguíneo del hospedador donde se transforman al estadio tripomastigote proliferativo (slender) (2) y de alta densidad de parásitos, se diferencian a la forma no proliferativa y más débil (umpy) (3). El ciclo se cierra cuando estos tripomastigotes son ingeridos por una nueva mosca (4) durante la ingesta de sangre y en su intestino se transforman a tripomastigotes que se dividen mediante fisión binaria y en las glándulas salivales se transforman a tripomastigotes y luego a tripomastigotes metacíclicos (5), que son las formas infectivas que reinician el ciclo de nuevo. Tomado de (Cuervo, Domont et al. 2010).

Recientemente se ha descrito que los tripomastigotes sanguíneos pueden alcanzar el tejido adiposo. Estos parásitos ATF (formas presentes en el tejido adiposo) se han adaptado a este nicho y pueden utilizar los ácidos grasos como fuente de carbono, lo que podría explicar la pérdida de peso que se produce en estos pacientes (Trindade, Rijo-Ferreira et al. 2016).

También se ha descrito de forma reciente la importancia de la piel como reservorio para estos parásitos. En la piel existen cantidades sustanciales de tripanosomas que pueden transmitirse a la mosca tsé-tsé (Caljon, Van Reet et al. 2016), incluso en pacientes en los que la parasitemia no es detectable (Capewell, Cren-Travaille et al. 2016).

Estos parásitos están menos expuestos al sistema inmune en la piel o en la grasa, y estas poblaciones podrían mantener la infección por tripanosomas. De esta forma, la mosca tsé-tsé podría reinfectarse con tripomastigotes (Fig. 11), incluso de individuos asintomáticos.

Este hallazgo podría explicar por qué la enfermedad del sueño ha persistido en algunas áreas a pesar del tratamiento y la vigilancia (Casas-Sánchez and Acosta-Serrano 2016)

Las diferentes etapas del ciclo de vida de los parásitos requieren cambios en su metabolismo con el fin de adaptarse a cada hospedador. Estos cambios metabólicos reflejan principalmente la disponibilidad de nutrientes en cada entorno específico. Así, las formas sanguíneas que disponen de grandes cantidades de glucosa del hospedador, utilizan la glucólisis aeróbica dentro del glicosoma para generar energía, y en cambio carecen de una mitocondria plenamente funcional ya que no tienen citocromos, por lo que no llevan a cabo la fosforilación oxidativa. Por su parte, en el insecto vector la glucosa está disponible sólo tras la ingesta de sangre y las formas procíclicas son capaces de utilizar como fuente de energía aminoácidos como la prolina o la treonina, a través del ciclo de Krebs en la mitocondria (Daniels, Gull et al. 2010, Szoor, Haanstra et al. 2014, Trindade, Rijo-Ferreira et al. 2016).

La diferenciación de formas sanguíneas a formas procíclicas también va acompañada de un cambio en la composición de la cubierta celular. En las formas sanguíneas la cubierta

está formada por las proteínas VSG, glicoproteínas de superficie variable que desempeñan un papel importante en la evasión del sistema inmune, mientras que en las formas procíclicas la cubierta celular está formada por prociclinas.

2.4. Respuesta inmune del hospedador y mecanismos de evasión del parásito

Los parásitos necesitan evadir el sistema inmune del hospedador y éste, a su vez, necesita desarrollar una respuesta inmune hacia el parásito. Este equilibrio se encuentra en continua evolución por parte de ambos (Pays and Vanhollebeke 2008).

Entre los mecanismos de defensa desarrollados por *T. brucei* para evadir el sistema inmune del hospedador al que se encuentra expuesto por tratarse de un parásito extracelular, destaca la **variación antigénica**, que consiste en el cambio frecuente de las proteínas de la superficie celular (VSGs) (Pays, Vanhollebeke et al. 2006). Además, las VSGs forman una capa de glicoproteínas muy compacta que impide a los anticuerpos alcanzar los determinantes antigénicos interiores de la membrana, de tal forma que sólo tienen acceso a los expuestos en el exterior.

En el genoma de *T. brucei* se pueden identificar alrededor de 1.000 genes y pseudogenes VSG, pero sólo una glicoproteína se va a expresar en un determinado momento. Esta glicoproteína va a ser reconocida por el sistema inmune del hospedador, que va a producir anticuerpos que neutralizan los parásitos que estén expresando esta glicoproteína en concreto. Mientras tanto, un pequeño porcentaje de parásitos cambia las glicoproteínas de superficie por una versión con una región antigénica diferente. Esta nueva región antigénica no va a ser reconocida por los anticuerpos circulantes y esta población sobrevivirá hasta que se desarrollen nuevos anticuerpos frente a ellos (Fig. 9)(Pays, Vanhollebeke et al. 2006, Horn and McCulloch 2010).

Figura 12. Esquema que muestra los distintos genes VSG y como su expresión secuencial da lugar a distintas olas de parasitemia en el individuo. Fuente: Departamento de Farmacia UCM.

Gracias a esta estrategia del cambio de VSG el parásito puede llevar a cabo una infección controlada evitando la muerte del hospedador. No hay un crecimiento descontrolado de la población parasitaria, sino que se mantiene un número tolerable de parásitos en el torrente sanguíneo (Pays and Nolan 1998).

Por su parte, los humanos y otros primates han desarrollado un sistema particular de inmunidad innata contra los tripanosomas africanos, y sólo dos clones de *Trypanosoma brucei* (*T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*) pueden resistir esta defensa y causar la enfermedad del sueño. De esta manera, la especie *T. b. brucei* sólo va a infectar mamíferos no primates produciendo Nagana (Widener, Nielsen et al. 2007).

En el suero de estos primates se han identificado dos complejos diferentes que se han denominado Factores Líticos de Tripanosomas (TLF). TLF-1 es la fracción más densa de las partículas lipoproteicas de alta densidad (conocida como fracción 3 ó HDL₃) y contiene un núcleo lipídico con una capa externa hidrofílica de fosfolípidos, colesterol y distintas apolipoproteínas, como apolipoproteína L1 (ApoL1). TLF-2 es un complejo distinto, pobre en lípidos pero contiene IgM como componente principal, junto con ApoL1 y unas pocas proteínas adicionales. A pesar de estas diferencias, ambos complejos contienen proteínas específicas de primates: proteína relacionada con la haptoglobina (Hpr) y apolipoproteína L1 (ApoL1) (Pays, Vanhollebeke et al. 2014). Después de cierta controversia respecto al papel de cada proteína en la tripanolisis, ahora se acepta que Hpr está involucrada en la entrada de TLF-1 al parásito y ApoL1 es la toxina tripanolítica de ambos complejos (Vanhollebeke, Nielsen et al. 2007). De esta forma, los principales protagonistas de esta inmunidad son ApoL1 (apolipoproteína específica de primates) y Hpr (proteína relacionada con la haptoglobina) (Vanhollebeke and Pays 2010).

Las formas sanguíneas de *T. brucei* adquieren hemo al internalizar la hemoglobina unida a la haptoglobina a través del receptor TbHpHbR (Tb927.6.440), que es un receptor de superficie específico (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008) (Fig. 13). Este receptor no discrimina entre Hp y Hpr, y de esta forma internaliza también TLF-1 (HDL-Hpr-ApoL1).

Por tanto, el mecanismo de entrada de TLF-1 (ApoL1 -HDL₃-HprHb) es por endocitosis mediada por el receptor TbHpHbR. En el lisosoma ApoL1 se disocia del complejo y se localiza en la membrana lisosomal, mientras Hpr y Hb se degradan liberando hemo que sale del

lisosoma por un mecanismo desconocido y se incorpora a las hemoproteínas de la forma sanguínea (Fig. 14) (Vanhollebeke and Pays 2010).

Figura 13. Gráfico del receptor para el complejo Haptoglobina-Hemoglobina, responsable de la entrada del complejo HpHb (izqda). Este receptor también es el responsable de la susceptibilidad al sistema inmune humano al mediar la captación del complejo HprHb asociado a partículas TLF-1. HpHbR se expresa exclusivamente en el bolsillo flagelar del parásito como indica el recuadro negro. Tomado de (Stodkilde, Torvund-Jensen et al. 2014).

La proteína Hpr también se encuentra en TLF-2, pero mecanismo de entrada de TLF-2 no se conoce. La hipótesis no probada de entrada de TLF-2, es que IgM (componente principal de TLF-2) se une de forma inespecífica a las VSG, de tal forma que el reciclaje de la cubierta de VSG a través del bolsillo flagelar conduce a TLF-2 al compartimento endocítico del parásito, liberando también ApoL1 (Fig. 14) (Pays, Vanhollebeke et al. 2014).

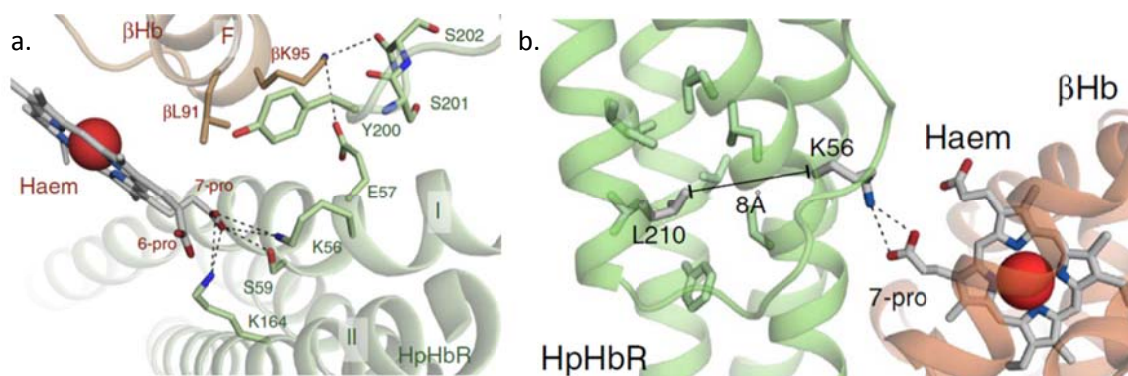
ApoL1 forma poros en la membrana del lisosoma por donde entran iones cloruro desde el citoplasma, acompañados de moléculas de agua, que conducen a un aumento controlado del volumen del lisosoma para mantener la ósmosis. Al bajar la concentración de iones cloruro del citoplasma, hay una entrada desde el exterior por los canales de la membrana plasmática. Este proceso conduce a la muerte del parásito (Vanhollebeke and Pays 2010).

Los dos clones de *T. brucei* que producen la enfermedad del sueño en el humano y en algunos primates (*T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*), han desarrollado distintos mecanismos para resistir este proceso de lisis (Pays and Vanhollebeke 2008, Vanhollebeke and Pays 2010).

Trypanosoma brucei rhodesiense sería un clon de *T. brucei* que expresa la proteína SRA, una versión truncada del antígeno de superficie variable (VSG)(Pays, Vanhollebeke et al. 2006). En el lisosoma SRA interacciona con el factor tripanolítico ApoL1, neutralizándolo (Vanhamme, Paturiaux-Hanocq et al. 2003).

En el África Occidental es muy frecuente la aparición de mutaciones en ApoL1 que, aunque provocan una enfermedad renal, evitan la neutralización mediada por SRA, y permite a los humanos resistir la infección por *T. b. rhodesiense* (Genovese, Friedman et al. 2010, Uzureau, Uzureau et al. 2013).

Trypanosoma brucei gambiense es también resistente al suero humano conteniendo ApoL1, aunque no presenta la proteína SRA (Pays, Vanhollebeke et al. 2006). Dentro de esta subespecie se distinguen dos subgrupos. En el subgrupo 1 la proteína TbHpHbR tiene niveles de expresión reducidos (Kieft, Capewell et al. 2010) y presenta una mutación que disminuye la afinidad al complejo HpHb (Fig. 15) (Stodkilde, Torvund-Jensen et al. 2014), lo que disminuye la entrada de TLF-1 y confiere resistencia al suero de los primates. En el subgrupo 2 la resistencia es independiente de mutaciones en TbHpHbR (Symula, Beadell et al. 2012).



Por otra parte, *T. b. gambiense* subgrupo 1 expresa la proteína TgsGP, una versión truncada de VSG (Capewell, Clucas et al. 2013, Capewell, Cooper et al. 2015). que se localiza en el compartimento endocítico. TgsGP no está relacionada con la proteína SRA de *T. b. rhodesiense*, aunque ambas sean proteínas VSG modificadas, y confiere resistencia a ApoL1 en la membrana reduciendo la fluidez lipídica y aumentando la curvatura de la membrana (Uzureau, Uzureau et al. 2013). Esta proteína TgsGP puede producir también resistencia a TLF-2 (Lecordier, Uzureau et al. 2014).

Respecto al subgrupo 2 de *T. b. gambiense*, se ha visto que muestra un fenotipo variable en cuanto a la resistencia por la lisis de ApoL1, pero tanto los organismos resistentes como los sensibles internalizan TLF-1. Esto indicaría que la resistencia de este subgrupo está

relacionada con una capacidad de neutralizar los efectos de ApoL1, sin intentar evitar su internalización como hace el subgrupo 1 de esta misma subespecie. Sin embargo, en los dos subgrupos la resistencia a ApoL1 podría basarse en el mismo mecanismo y, aparte de lo citado para el subgrupo 1, implicar una proteína inhibitoria similar a SRA (Capewell, Veitch et al. 2011).

2.5. Tratamiento para la enfermedad del sueño

En el caso de *T. brucei*, el fenómeno de variación antigénica que presentan estos parásitos y que se acaba de describir hace muy difícil el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad. Además, hasta la fecha no se ha encontrado un fármaco efectivo frente a las dos subespecies de *T. brucei* ni frente a las dos fases de la enfermedad.

Para la primera fase de la enfermedad se utiliza **pentamidina** y **suramina**, que no son fármacos efectivos en la fase neurológica al no cruzar la barrera hematoencefálica ((Stuart, Brun et al. 2008) y revisado en (Munday, Settimo et al. 2015)). La pentamidina se utiliza cuando la enfermedad del sueño es causada por *T. b. gambiense* y la suramina cuando la enfermedad la origina la infección por *T. b. rhodesiense*. Ambos fármacos tienen

administración parenteral (intramuscular la pentamidina e intravascular la suramina), pero la eficacia es alta y los efectos secundarios son moderados, aunque algo más fuertes para la suramina (Stuart, Brun et al. 2008). El gen *TbAT1*, que codifica el transportador P2, confiere resistencia a la pentamidina (Barrett, Vincent et al. 2011).

Para la segunda fase de la enfermedad el fármaco más utilizado fue durante mucho tiempo el **melarsoprol**, derivado del arsénico, y que actualmente es el único disponible para la enfermedad producida por *T. b. rhodesiense* (Barrett and Croft 2012). Es un fármaco muy tóxico: entre los numerosos efectos secundarios severos destaca la encefalopatía, que puede llegar a matar al 5-10% de los pacientes, dependiendo de la especie infectiva, debido probablemente a la lisis rápida de grandes cantidades de parásitos en el cerebro y sujeto a la aparición de resistencias en los parásitos que pueden llegar a involucrar transportadores ABC (la proteína TbMRPA) y otros transportadores (*TbAT1*, *Trypanosoma brucei* adenosina transporter 1, y HAPT1, high-affinity pentamidine transporter) (Gehrig and Efferth 2008, Barrett, Vincent et al. 2011). Este fármaco puede tratar la fase neurológica de la enfermedad independientemente de la subespecie de *T. brucei* causante de la infección (revisado en (Munday, Settimo et al. 2015)).

Para la fase meningoencefálica de la enfermedad producida por *T. b. gambiense* y como alternativa al melarsoprol (Gehrig and Efferth 2008, Barrett and Croft 2012), se utiliza la **eflornitina**, que es un inhibidor de la ornitina descarboxilasa, la primera enzima de la síntesis de poliaminas y que puede utilizarse en monoterapia o en terapia de combinación con nifurtimox (Steverding 2010). Es efectiva sólo frente a parásitos de *T. b. gambiense*, tiene un elevado costo y requiere procedimientos de administración logísticamente difíciles, especialmente en zonas rurales, ya que necesita cuatro infusiones intravenosas diarias durante 14 días (Stuart, Brun et al. 2008). Es efectiva sólo frente a *T. b. gambiense* porque la enzima ornitina descarboxilasa de este subespecie tiene una vida muy larga ($t_{1/2}=18-19$ h), en contraste con la enzima de *T. b. rhodesiense*, que está sometida a un recambio mucho más rápido ($t_{1/2}=4.3$ h) (Steverding 2010).

Debido a la facilidad de inducir resistencias a la eflornitina en el laboratorio y a la existencia de informes anecdóticos de los fracasos de este tratamiento, se han llevado a cabo ensayos clínicos para evaluar la eficacia de combinaciones de eflornitina, melarsoprol y el fármaco oral **nifurtimox** (que se utiliza a menudo para tratar la enfermedad de Chagas y que tiene una eficacia limitada cuando se utiliza sólo en la enfermedad del sueño). El mecanismo

de acción del nifurtimox está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno que provocan daños en componentes celulares como el ADN, membranas lipídicas y proteínas (revisado en (Steверding 2010)). Después de varios ensayos en fase III, la **combinación de eflornitina y nifurtimox (NECT)** parece ser igual de segura y eficaz que el tratamiento con eflornitina solo, pero tiene la ventaja de que tanto la dosis como la duración del tratamiento se pueden reducir y parece ser menos propensa a inducir resistencia (Priotto, Kasparian et al. 2009, Munday, Settimo et al. 2015), especialmente para la fase tardía de la enfermedad provocada por *T. b. gambiense* (Steверding 2010).

3. Enfermedad de Chagas

3.1. Generalidades

Hay otra forma de tripanosomiasis que se da principalmente en los países latinoamericanos, y que se denomina tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. El organismo causante de la enfermedad de Chagas pertenece a otra especie del género *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*).

Es una enfermedad potencialmente mortal y se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, y hasta 100 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad. La enfermedad de Chagas se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de la parte continental de América Latina, distribuyéndose desde México hasta Sudamérica. Debido a la movilidad de la población latinoamericana, se han descrito casos de la enfermedad de Chagas en el resto del mundo, de tal forma que en el continente europeo, por ejemplo, son ya alrededor de 100.000 los casos estimados (OMS).

La infección tiene distintas vías de transmisión aparte de la producida por el vector. Estas vías son la transfusión sanguínea, la transmisión congénita de la madre infectada a su hijo durante el embarazo y el trasplante de órganos (Coura 2007).

3.2. Fases clínicas de la enfermedad

La enfermedad de Chagas transcurre en dos fases que se pueden diferenciar de forma clara. Una **fase inicial aguda** que comienza con una lesión cutánea y donde podría aparecer un síndrome febril inespecífico después de un período de incubación de una a dos semanas.. La mortalidad en esta fase es baja (0.25-0.5 %) y estaría asociada a complicaciones cardíacas.

Durante esta fase los parásitos circulan por la sangre y se presenta un proceso inflamatorio diseminado.

Tras esta fase, que puede durar aproximadamente unas 8 semanas, se puede pasar a una **fase crónica asintomática**, de duración indeterminada donde la enfermedad logra pasar inadvertida. Un 10-30% de estos pacientes evolucionan a la **fase crónica sintomática**, donde aparecen trastornos cardíacos y alteraciones digestivas, neurológicas o mixtas (Coura 2007). La destrucción progresiva del músculo cardíaco puede ocasionar, con el paso de los años, muerte súbita o insuficiencia cardíaca.

3.3. Agente etiológico de la enfermedad de Chagas: *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo parásito intracelular que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*.

El vector biológico de *T. cruzi* es la vinchuca (*Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* principalmente (Geiger and Pissarra 2016)), perteneciente al orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*. Los parásitos de la especie *Trypanosoma cruzi* colonizan dos hospedadores y este ciclo de vida digenético incluye formas distintas del parásito.



vho.int

Los **epimastigotes** proliferan en el insecto vector y se diferencian a la forma **tripomastigote metacíclico** en el intestino posterior del insecto. Cuando la chinche o vinchuca pica a un mamífero para ingerir su sangre, defeca simultáneamente sobre el mamífero. Las heces contienen tripomastigotes metacíclicos, que penetran en la piel cuando el mamífero se rasca en el sitio de la picadura. Los tripomastigotes metacíclicos invaden las células y se transforman a **amastigotes**, que pasan al torrente sanguíneo donde se diferencian a

tripomastigotes sanguíneos. Estos tripomastigotes se diseminan por el cuerpo del hospedador.

3.4. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Los fármacos útiles para el tratamiento específico del Mal de Chagas son el **benznidazol** y el **nifurtimox**. El benznidazol es el más eficaz de los dos y además presenta una mejor tolerancia. Este fármaco va a reducir la parasitemia pero no el avance clínico de la cardiomiopatía. La eficacia de estos fármacos disminuye a medida que transcurre más tiempo desde la infección, siendo más útil su administración durante la fase aguda (Bermúdez, Davies et al. 2016). Ambos fármacos están contraindicados en mujeres embarazadas y personas con insuficiencia renal o hepática. El nifurtimox, además, está contraindicado en personas con antecedentes de enfermedades neurológicas o trastornos psiquiátricos (Bermúdez, Davies et al. 2016).

4. Particularidades celulares, bioquímicas y moleculares de la familia *Trypanosomatidae*

Como acabamos de ver, la quimioterapia utilizada hoy en día tiene muchas limitaciones: son fármacos generalmente tóxicos y además se está produciendo un aumento en los casos de resistencia, lo que hace necesario y urgente el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Una aproximación racional para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas contra los parásitos tripanosomátidos consistiría en aprovechar las diferencias biológicas que tienen con el hospedador.

El nombre del orden *Kinetoplastida* lo da la presencia del **kinetoplasto**, que contiene grandes cantidades de ADN empaquetado de una única mitocondria y se localiza cercano al bolsillo flagelar. Este genoma representa el 30% del ADN celular total y está formado por numerosas copias de ADN circular, minicírculos (entre 0.5 y 2.5 kb) y maxicírculos (entre 20 y 40 kb). Los maxicírculos son, estructural y funcionalmente, análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores, codificando ARN ribosomales y proteínas involucradas en la cadena respiratoria y en la fosforilación oxidativa. Los minicírculos codifican para ARN guías que modifican los transcritos precursores derivados de los maxicírculos mediante la inserción o deleción de uridilato en los sitios precisos, a lo largo de un proceso de edición del ARN (Fenn and Matthews 2007, de Souza, Attias et al. 2009).

La mayoría de los ARN mensajeros mitocondriales necesitan de este proceso de **edición del ARN**, que es una modificación post-transcripcional que consiste en la inserción o deleción de residuos de uridinas en sitios específicos de los ARNm. De esta forma, el proceso de edición del ARN es esencial en los tripanosomátidos para el ensamblaje correcto de las proteínas involucradas en la cadena respiratoria y en la fosforilación oxidativa. Es un proceso mitocondrial donde las proteínas que participan son codificadas por el ADN del núcleo. Se forma un dúplex de 10-15 pb entre el ARNg y el ARNm, que es reconocido por el complejo de edición que actúa liberando la base a corregir en 3' del ARNm. A continuación, la enzima uridil transferasa terminal (TUTasa) añade residuos de uridina en el sitio de inserción o una exonucleasa específica los elimina en el sitio de deleción. Finalmente, una ligasa une el fragmento modificado al resto de la secuencia. Como resultado de todo ello, la información que poseía el ARNg es transferida al ARNm, generándose un ARNm maduro traducible. Un mismo ARNg puede dirigir la edición de múltiples sitios (Madison-Antenucci, Grams et al. 2002).

Estos protozoos presentan un **citoesqueleto** periférico de gran rigidez, formado por microtúbulos subpeliculares adosados a la membrana citoplasmática presentes en todo la superficie del organismo salvo en el bolsillo flagelar. Este bolsillo flagelar es el único sitio por donde se van a efectuar los procesos de endo y exocitosis. Además, toda la superficie de estos parásitos está recubierta por un glicocalix.

Todos los kinetoplastos son protozoos móviles que tienen un único **flagelo** que se origina cerca de una única mitocondria y que emana desde el bolsillo flagelar (Stuart, Brun et al. 2008).

Los tripanosomátidos poseen unos orgánulos celulares rodeados por una membrana única que contienen todas las enzimas necesarias para realizar la glucólisis y que se denominan **glicosomas**. Estos orgánulos son peroxisomas modificados para llevar a cabo en su interior la glucólisis (Stuart, Brun et al. 2008),(Michels, Hannaert et al. 2000). Son los equivalentes a los peroxisomas en el resto de organismos. El número de glicosomas y el área que ocupan en el citoplasma de los tripanosomátidos varía según la especie e incluso el estadio de la misma especie. Así por ejemplo, las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* tienen un gran número de glicosomas mientras que la mitocondria está muy poco desarrollada. En las formas procíclicas, por el contrario, la mitocondria está muy desarrollada y hay pocos glicosomas (de Souza 2002).

Otros orgánulos característicos de la familia *Trypanosomatidae* son los **acidocalcisomas**, que son orgánulos densos con pH ácido, relacionados con los lisosomas, en los que se acumulan grandes cantidades de fosfato, pirofosfato y polifosfato acomplejados con cationes (Ca^{++}). La regulación osmótica del calcio intracelular es crucial para la supervivencia del parásito y estos orgánulos suponen su principal fuente de almacenamiento. La señalización por iones Ca^{++} es importante para la invasión de la célula huésped por parte de los tripanosomátidos intracelulares (*Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*). La homeostasis del calcio es, por tanto, un proceso fundamental en el metabolismo en el que participan los acidocalcisomas (Docampo and Huang 2015). El número y tamaño de acidocalcisomas varía de especie a especie, y también dentro del estadio de desarrollo (López-Martín, Pérez-Victoria et al. 2008)

El **metabolismo de los nucleótidos** proporciona una gran fuente de dianas terapéuticas para muchas enfermedades ya que un reservorio equilibrado de

deoxirribonucleótidos (dNTPs) es esencial para la replicación del ADN y su reparación (Valente, Timm et al. 2016). En la mayoría de los organismos vivos, los dNTPs proceden de dos rutas, la síntesis *de novo* a partir de precursores metabólicos, y la ruta de reciclaje de purinas preformadas. En el caso de las purinas, estos organismos tripanosomátidos no pueden llevar a cabo su síntesis *de novo*, por lo que dependen totalmente del reciclaje de las purinas importadas del hospedador (el Kouni 2003). Sin embargo, sí pueden realizar la síntesis *de novo* de las pirimidinas (Timm, Bosch-Navarrete et al. 2015, Valente, Timm et al. 2016).

La reproducción de los tripanosomátidos es normalmente asexual, aunque se ha descrito **recombinación sexual** en *T. brucei* (Gibson 2015), inferido para *T. cruzi* (Messenger and Miles 2015), y que podría ocurrir en algunas especies de *Leishmania* (Calvo-Álvarez, Álvarez-Velilla et al. 2014, Rougeron, De Meeus et al. 2016). Se dividen mediante fisión binaria, durante la cual su núcleo no se somete a la disolución de la membrana ni hay condensación de los cromosomas (Stuart, Brun et al. 2008, De Gaudenzi, Noe et al. 2011).

La **transcripción génica** de los genes que codifican proteínas en tripanosomátidos la lleva a cabo la ARN polimerasa II. Sólo los genes que codifican las proteínas VSG y prociclinas en *Trypanosoma brucei* son transcritos por la ARN polimerasa I (Daniels, Gull et al. 2010). En cualquier caso, el genoma de los tripanosomas está organizado en unidades de transcripción policistrónicas (precuroras de hasta 100 marcos abiertos de lectura) donde genes no relacionados funcionalmente son transcritos como una unidad que será luego procesada en distintas unidades de ARNm monocistrónicos. La maduración de este ARNm inicial se realiza mediante un “trans-splicing” por adición en el extremo 5’ de cada cistrón de una secuencia de 39 nucleótidos (miniexón o “spliced leader”), una caperuza hipermetilada importante para la traducción a proteínas y una poliadenilación en el extremo 3’ del gen anterior (Palenchar and Bellofatto 2006, De Gaudenzi, Noe et al. 2011). Una vez traducidas las proteínas, ocurren una serie de modificaciones post-traduccionales.

Los tripanosomátidos tienen también tres **ARN polimerasas**, como el resto de organismos eucariotas, pero la función que llevan a cabo es distinta. La ARN polimerasa I transcribe los ARN ribosomales (como ocurre en la mayoría de los eucariotas); además, en *T. brucei*, transcribe los genes que codifican para las proteínas de superficie, las VSGs en las formas sanguíneas y las prociclinas en las formas procíclicas (Pays 2005, Daniels, Gull et al. 2010). La ARN polimerasa II es la encargada de transcribir el resto de ARN mensajeros y pequeños ARNs no codificantes y la ARN pol III se hace cargo de los ARN de transferencia y

también todos los ARN nucleares pequeños. No se han encontrado promotores para el ARN polimerasa II, implicada en la transcripción policistrónica de la inmensa mayoría de los genes (Daniels, Gull et al. 2010, Padilla-Mejía, Florencio-Martínez et al. 2015).

La **regulación de la expresión génica** en tripanosomátidos se realiza, principalmente, de forma post-transcripcional. Hay distintos procesos importantes que pueden estar sometidos a esta regulación y que pueden ser la elongación, la traducción, y la estabilidad del ARNm y de la proteína. La estabilidad de los ARN mensajeros puede venir dada por señales que aparecen dentro de las regiones 3' no traducidas (regiones intergénicas) (De Gaudenzi, Noe et al. 2011).

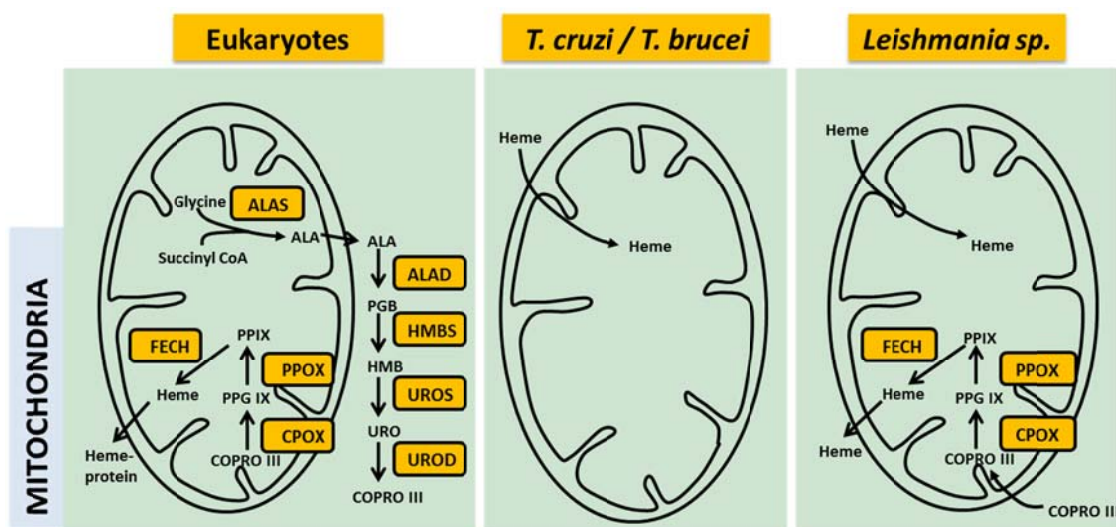
Los parásitos tripanosomátidos poseen un único sistema redox basado en el **tripanotion** (T(SH)₂), que aquí es el principal tiol y que sustituye al glutatión (GSH). El tripanotion es sintetizado por la unión de dos moléculas GSH a la espermidina y sustituye al sistema GSH, que está presente en la mayoría de los organismos, en el mantenimiento de la homeostasis redox y la detoxificación de los xenobióticos (Fairlamb, Blackburn et al. 1985, Krauth-Siegel and Comini 2008, Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016).

El esteroil principal de los tripanosomátidos es el **ergosterol** y no el colesterol como ocurre en las células de mamíferos. Dentro de la ruta de biosíntesis de los esteroides hay reacciones que son comunes en todos los eucariotas, mientras que otras de estas reacciones son exclusivas de cada organismo (Pérez-Moreno, Sealey-Cardona et al. 2012). Por ello, las enzimas que catalizan estas reacciones exclusivas de tripanosomátidos y que son esenciales para ellos, como la enzima lanosterol 14- α desmetilasa (CYP51) de la superfamilia de proteínas citocromo p450, podrían ser utilizadas como dianas farmacológicas (de Souza and Rodrigues 2009, Shang, Li et al. 2014, McCall, El Aroussi et al. 2015, Dauchy, Bonhivers et al. 2016).

Otra diferencia bioquímica que presentan con el hospedador es su **auxotrofia para el hemo**. Son organismos incapaces de sintetizar el grupo hemo, que es un componente esencial y que deben tomar por tanto del hospedador.

El hemo es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas y es esencial para la mayoría de las células existentes, ya que es indispensable para la biogénesis de los citocromos y otras enzimas que desempeñan importantes funciones biológicas (Kořený, Lukes et al. 2010). El hemo es sintetizado a través de una ruta biosintética de siete pasos muy conservada en los tres dominios de vida (Kořený, Lukes et al. 2010, Kořený, Oborník et al.

2013) (Fig. 15). Sin embargo, los tripanosomátidos son de los pocos organismos aeróbicos que, aún dependiendo de la fosforilación oxidativa, son incapaces de sintetizar el hemo requerido para el transporte de electrones en los complejos respiratorios, por lo que necesitan obtener esta molécula a partir de fuentes exógenas. Esta auxotrofia de hemo se debe a la pérdida de la vía completa de su síntesis (*Trypanosoma* spp.) (Dutta, Furuyama et al. 2008), aunque *Leishmania* spp. poseen las tres enzimas que catalizan las tres últimas reacciones de la ruta de biosíntesis del hemo (CPOX, PPOX y FECH), readquiridas por transferencia horizontal desde γ -proteobacterias (Opperdoes and Coombs 2007, Kořený, Lukes et al. 2010, Alves, Voegtly et al. 2011, Tripodi, Menendez Bravo et al. 2011).



En nuestro laboratorio se ha confirmado la funcionalidad de estas enzimas de *Leishmania* mediante ensayos de complementación funcional en modelos de bacterias Δ FECH y Δ PPOX y levaduras Δ CPOX (L.M. Orrego y JM Pérez-Victoria, resultados no publicados). Al ser de origen procarionta, estas tres enzimas no guardan semejanza con las correspondientes enzimas humanas, de tal forma que en el caso de ser esenciales, podrían constituir atractivas dianas terapéuticas. De hecho, ya hace más de 80 años la Dra. Marguerite Lwoff citó que “ El talón de Aquiles de estos tripanosomátidos es esta dependencia absoluta de hemo exógeno” (Lwoff 1933).

Por otra parte, a pesar de haber sido sugerida la presencia de actividad hemo oxigenasa en algunos organismos tripanosomátidos (Srivastava, Sharma et al. 1997, Cupello, Souza et al. 2014) no se ha encontrado la enzima que pudiera ser responsable de esta actividad.

5. Homeostasis del grupo hemo

La molécula de hemo está formada por un átomo de hierro y un anillo de porfirina. Las porfirinas son anillos heterocíclicos orgánicos, formados por cuatro subunidades pirrónicas unidas por cuatro puentes de metino. Un átomo de nitrógeno de cada pirrol es el que coordina el átomo de hierro en el centro del anillo tetrapirrónico (Barupala, Dzul et al. 2016).

El anillo tetrapirrónico (protoporfirina IX) es característico de una familia de compuestos que incluye las clorofilas, las clorinas, las corrinas y las bilinas (Panek and O'Brian 2002). La molécula parental de hemo, conocido como hemo b, puede sufrir distintas modificaciones en las cadenas laterales hasta en ocho posiciones (carbonos 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 y 18), mostrados en la figura 17, particularmente grupos metilo, vinilo y propionilo. Estas modificaciones dan lugar a la aparición de los distintos tipos de hemo que se encuentran en la naturaleza y que participan en procesos bioquímicos vitales (Barupala, Dzul et al. 2016).

A pesar de ser una molécula esencial al participar en distintas rutas metabólicas, el hemo en su forma libre es altamente citotóxico debido a su actividad peroxidasa de las

membranas lipídicas y a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, muchos de los precursores del hemo y los productos de su catabolismo son también tóxicos (Ryter and Tyrrell 2000, Chiabrande, Vinchi et al. 2014). Además de los efectos tóxicos citados, también puede tener un efecto hemolítico alterando la conformación de las proteínas del citoesqueleto en los glóbulos rojos (Yuan, Fleming et al. 2013).

Debido a estas características, la homeostasis del hemo es muy importante y requiere de una regulación muy precisa de su metabolismo a nivel de síntesis, tráfico y degradación (Korolnek and Hamza 2014). Dadas las propiedades químicas y bioquímicas del hemo se necesita un sistema de transportadores y chaperonas para distribuirlo de forma específica y eficiente en las hemoproteínas que encontramos en distintos compartimentos celulares, a la vez que evitamos su toxicidad (Korolnek and Hamza 2014).

5.1. Papel esencial del hemo

a. Grupo prostético de hemoproteínas

El hemo funciona como grupo prostético de muchas proteínas, que se encuentran de forma ubicua en la naturaleza y que desempeñan una amplia variedad de funciones (Barupala, Dzul et al. 2016).

Como tal, debe unirse a hemoproteínas tanto solubles como unidas a las membranas; presentando, por tanto, una naturaleza anfipática que le permite funcionar en ambos medios. Está formado por un anillo porfirínico hidrofóbico que lo hace insoluble en soluciones acuosas y una parte hidrofílica formada por grupos propionato que se disponen hacia la superficie de la molécula (Korolnek and Hamza 2014).

Gracias a su capacidad de coordinar un átomo de hierro en el interior de su estructura, el hemo participa en reacciones de óxido-reducción catalizadas por hemoproteínas como los citocromos. Por esta razón, participa en multitud de procesos biológicos vitales entre los que se encuentra la fosforilación oxidativa en el transporte electrónico mitocondrial.

Otra de estas funciones es el transporte y almacenamiento de oxígeno al formar parte de las proteínas encargadas de este cometido como son la hemoglobina y la mioglobina. También forma parte como grupo prostético de muchas proteínas como catalasas, peroxidasas, etc. presentes en diversos organelos.

Dentro de estas funciones biológicas podemos nombrar la transferencia electrónica, el metabolismo de fármacos y esteroides, la transducción de señales o el procesamiento de ARN (Chiabrandó, Vinchi et al. 2014).

b. Mensajero celular

Además de funcionar como grupo prostético estable en las hemoproteínas, siendo un cofactor esencial para citocromos, oxidasas y demás proteínas de unión al oxígeno, el hemo puede realizar otro papel como mensajero celular. Esta función, como regulador biológico clave, la realiza estableciendo interacciones reversibles con una amplia variedad de proteínas, como uniones no covalentes. Por una parte, el hemo puede regular la expresión de los genes implicados en su biosíntesis y degradación o genes relacionados con su metabolismo y el metabolismo del hierro. La mayoría de estos genes son regulados vía elementos de respuesta al hemo (HREs) de tal forma que el hemo puede modular su expresión a nivel de la transcripción. Además, el hemo puede intervenir en procesos de estabilidad del ARNm, corte y empalme de ARN, síntesis de proteínas y modificaciones postranscripcionales (Chiabrandó, Mercurio et al. 2014).

El hemo también puede mediar la diferenciación y la proliferación de distintos tipos celulares o intervenir en distintos procesos biológicos como mensajero al actuar regulando el estado de fosforilación de los factores de iniciación de la traducción, en particular de eIF2 α (Padmanaban, Venkateswar et al. 1989). La fosforilación de eIF2 α ocurre por la activación de protein quinasas como respuesta al estrés celular. En eucariotas superiores favorece la expresión de genes implicados en esta respuesta. En *T. cruzi*, la deficiencia de hemo al consumirse la sangre ingerida por el insecto vector es una señal de diferenciación en estos parásitos. En este organismo el estado de fosforilación de eIF2 α depende de la actividad Tck2 (eIF2 α quinasa de *T. cruzi*), una quinasa regulada por la disponibilidad de hemo. El hemo se une al dominio catalítico de la quinasa inhibiendo su actividad. En ausencia de hemo la quinasa se encuentra activa y cataliza la fosforilación de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eIF2, con lo que disminuye la traducción proteica, permitiéndose sólo la expresión de proteínas específicas de tripomastigotes. Una deficiencia de hemo se traduce en una parada del ciclo celular y una inducción de la diferenciación de las formas proliferativas (epimastigotes) a formas infectivas no proliferativas en *T. cruzi* (tripomastigotes metacíclicos). Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior de la vinchuca, donde pueden darse estas condiciones

de deficiencia de hemo justo antes de la defecación del insecto y de una nueva ingesta, que es el momento en el que estas formas metacíclicas pasan al hospedador vertebrado (da Silva Augusto, Moretti et al. 2015).

Por otra parte, el hemo puede participar en los procesos de transducción de señales a través de su interacción con el NO, que es un radical libre que regula numerosos procesos biológicos (Vasudevan, Bovee et al. 2016). Los efectos del NO están determinados por diferentes reacciones químicas, como puede ser la unión del hemo a la enzima soluble guanilato ciclasa que, al activarse, produce el segundo mensajero GMPc (Thomas, Ridnour et al. 2008). Además, puede disminuir la concentración del NO en reacciones catalizadas por hemoproteínas como las peroxidasas (Thomas, Ridnour et al. 2008). También puede unirse directamente e inhibir la función de canales dependientes de Calcio, como los canales Slo1BK, que tienen un motivo de unión al hemo (Tang, Xu et al. 2003).

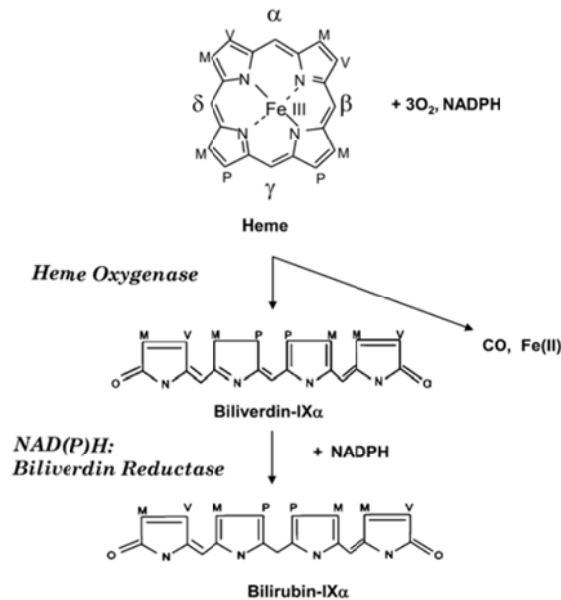
5.2. Biosíntesis y degradación del hemo

La ruta completa de biosíntesis del hemo está presente en la mayoría de los organismos y, aunque está muy conservada, los organismos pueden diferir en la síntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA), que es el primer precursor universal de los tetrapirroles (Kořený, Lukes et al. 2010). Con la excepción de α -proteobacteria, todos los procariotas y eucariotas fotosintéticos sintetizan ALA vía tres pasos consecutivos enzimáticos que comienzan en ácido glutámico, mientras que α -proteobacteria y la mayoría de eucariotas no fotosintéticos sintetizan ALA por condensación de glicina con succinil CoA utilizando la enzima ALA sintasa (Kořený, Lukes et al. 2010, van Griensven, Balasegaram et al. 2010).

El resto de la ruta de biosíntesis (de ALA a protohemo) se lleva a cabo por las mismas enzimas en todos los organismos (Kořený, Lukes et al. 2010). Los eucariotas difieren no sólo en los primeros precursores que utilizan para la síntesis del hemo sino también en la localización intracelular de los pasos enzimáticos individuales (Kořený, Lukes et al. 2010). De hecho, los eucariotas fotosintéticos sintetizan hemo exclusivamente en los cloroplastos, mientras que en la mayoría de los eucariotas heterótrofos la ruta se divide entre la mitocondria y el citosol (Kořený, Lukes et al. 2010).

La degradación del hemo tiene lugar por la actividad en una primera reacción de la enzima hemo oxigenasa, que es una enzima del retículo endoplasmático (Thomsen, Etzerodt et al. 2013) que, utilizando oxígeno y NADPH, forma el tetrapirrol lineal biliverdina. En esta reacción se libera el átomo de hierro y monóxido de carbono. La segunda enzima, biliverdina reductasa, cataliza la formación de la bilirrubina, utilizándose en esta reacción NADPH. La bilirrubina es insoluble y en los mamíferos se traslada al hígado unida a la albúmina. En el hígado, las cadenas laterales propionilo de la bilirrubina se conjugan con dos equivalentes de ácido glucurónico con la enzima UDP glucuronil transferasa. Esto la convierte en soluble y facilita su excreción con la bilis (Ryter and Tyrrell 2000, Taketani 2005). La degradación del

grupo hemo es fundamental para la protección de las células del estrés oxidativo inducido por él (Chiabrando, Vinchi et al. 2014).



El grupo hemo a / Fe. El ción de /erdina, por la luctasa. 2009).

5.3. Tráfico del grupo hemo en eucariotas

El hemo es una molécula lipofílica que se asocia con las membranas y los orgánulos celulares. Hace un tiempo se pensaba que las porfirinas hidrofóbicas podían atravesar las membranas biológicas por difusión; sin embargo, sus cadenas laterales carboxiladas introducen a la molécula cargas negativas que impiden su difusión a velocidades compatibles con su función biológica, aunque permiten su unión con proteínas de transporte. Por lo tanto, se requiere de un mecanismo de transporte dependiente de energía para mover estas cadenas laterales carboxiladas a través de la membrana plasmática (Krishnamurthy, Xie et al. 2007).

5.3.1. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que no sintetiza hemo *de novo* (Protchenko, Rodríguez-Suárez et al. 2006) pero su ingesta en la dieta suple esta auxotrofia para el hemo (Hamza 2006), y de hecho este hemo de la dieta también es una fuente de hierro cuando el hierro es limitante (Rao, Carta et al. 2005). Mediante estudios con análogos del hemo, se puso de manifiesto que en *C. elegans* existe un sistema de captación de hemo (Rao, Carta et al. 2005).

Para la identificación de los genes regulados de forma transcripcional por el hemo se utilizaron microarrays de ADN (Rajagopal, Rao et al. 2008, Severance, Rajagopal et al. 2010). Se analizó el ARNm de gusanos de fenotipo salvaje que habían crecido en presencia de distintas concentraciones de hemo: 4 μ M (baja), 20 μ M (óptima) y 500 μ M (elevada) (Rajagopal, Rao et al. 2008, Severance, Rajagopal et al. 2010). Los gusanos respondieron a la disponibilidad de hemo regulando distintos genes (Severance, Rajagopal et al. 2010, Sinclair and Hamza 2010). Hubo 288 genes cuya expresión se modificaba en función de la concentración de hemo del medio y que se denominaron Heme Responsive Genes (HRG). Entre ellos se identificó el transportador de hemo *hrg-4* (F36H1.5), que se sobreexpresaba más de 40 veces a bajas concentraciones de hemo (Rajagopal, Rao et al. 2008). En el genoma de *C. elegans* se encontraron tres genes parálogos de *hrg-4*: *hrg-1* (RO2E12.6), *hrg-5* (F36H1.9) y *hrg-6* (F36H1.10), con un 27 %, 39 % y 35 % de identidad en la secuencia de aminoácidos respectivamente (Rajagopal, Rao et al. 2008). La expresión de *hrg-1* y *hrg-4* es inducible y responde a una deficiencia de hemo, mientras que la expresión de *hrg-5* y *hrg-6* parece ser constitutiva y no está regulada por el hemo (Rajagopal, Rao et al. 2008). Los genes *hrg-4*, *hrg-5* y *hrg-6* son específicos de nematodos; mientras que el gen *hrg-1* tiene ortólogos en animales vertebrados con un 25 % de identidad en la secuencia proteica (Rajagopal, Rao et al. 2008).

La proteína **CeHRG-1** se localiza en orgánulos lisosomales y endosomales mientras que la proteína **CeHRG-4** se localiza en la membrana plasmática (Rajagopal, Rao et al. 2008). CeHRG-4 podría mediar la entrada de hemo en *C. elegans* en la membrana plasmática, mientras que CeHRG-1 podría desempeñar un papel en la regulación de hemo intracelular a través del compartimento endosomal (Rajagopal, Rao et al. 2008). Aunque la proteína CeHRG-1 se localiza de forma predominante en la membrana vacuolar, es significativa su capacidad para utilizar hemo exógeno (Yuan, Protchenko et al. 2012). De esta forma, es concebible que una porción de CeHRG-1 se dirija a la membrana plasmática para mediar la captación de hemo exógeno (Yuan, Protchenko et al. 2012), tal y como se ha descrito que puede ocurrir en células de mamífero (Rajagopal, Rao et al. 2008).

Las proteínas relacionadas con HRG-1 tienen una baja homología en cuanto a la secuencia pero están conservadas funcionalmente (Yuan, Protchenko et al. 2012). La captación celular de hemo por proteínas relacionadas con HRG-1 en gusanos y en humanos requiere la existencia de aminoácidos localizados estratégicamente que están conservados topológicamente en las distintas especies (Yuan, Protchenko et al. 2012).

Figura 23. Modelo propuesto para la función de las proteínas CeHRG en la homeostasis del hemo en células intestinales de *C. elegans*. CeHRG-4 media la entrada de hemo en la membrana plasmática; mientras que CeHRG-1 facilita la disponibilidad intracelular de hemo a través de un compartimento endolisosomal. Tomado de (Rajagopal, Rao et al. 2008).

El análisis de la secuencia y la topología de HRG-1 identificó cuatro dominios transmembrana y una señal conservada en el extremo carboxilo terminal que puede interactuar con el hemo (motivo FARKY en *C. elegans* y YAHRY en humanos) (Rajagopal, Rao et al. 2008, Yuan, Protchenko et al. 2012), además de una histidina en el segundo dominio transmembrana que está conservada en la mayoría de las especies analizadas (Yuan, Protchenko et al. 2012). La importancia de estos aminoácidos se estudió utilizando una cepa mutante para la síntesis del hemo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que no crece en presencia de bajas concentraciones de hemina salvo que exprese estas proteínas HRG (Protchenko, Shakoury-Elizeh et al. 2008).

De esta forma, se encontró que los residuos involucrados en la unión con el hemo deben estar localizados en las regiones exoplásmica, citoplásmica y transmembrana de las proteínas relacionadas con HRG-1. Una histidina del segundo lazo exoplásmico situado en el lado extracelular o luminal (dependiendo de la localización de la proteína) une el hemo y lo transfiere a una histidina (o tirosina en la posición equivalente en CeHRG-4) del segundo dominio transmembrana dentro del canal que forma la proteína. Por último, el hemo pasaría al lado citoplasmático facilitado por el motivo FARKY (o YAHRY en los humanos), localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Los motivos aromáticos y cargados positivamente de este motivo pueden servir como ligandos y estabilizar u orientar las cadenas laterales del ácido propiónico o vinilo del grupo hemo (Yuan, Protchenko et al. 2012).

Las otras proteínas HRG importantes para *C. elegans* serían CeHRG-2 y CeHRG-3. CeHRG-2 es una proteína de membrana que une hemo y que se localiza en el retículo endoplásmico y en la membrana plasmática apical de tejidos extraintestinales y facilita la utilización del hemo en la hipodermis (Chen, Samuel et al. 2012). CeHRG-3 es una proteína

secretada en el intestino que se encarga de llevar el hemo a los embriones durante el desarrollo y que es esencial en la formación de los cigotos (Chen, Samuel et al. 2011).

La proteína **ABCC5** (MRP5), perteneciente a la familia de los transportadores ABC, es esencial en *C. elegans*. Esta proteína es un transportador del grupo hemo que se localiza en la membrana plasmática y en compartimentos endolisosomales, y su función es la de exportar hemo. Hay tres parálogos de este gen en humanos y es un gen esencial para la eritropoiesis en el modelo del pez cebra (Korolnek, Zhang et al. 2014).

5.3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A diferencia de *Candida albicans*, *S. cerevisiae* crece muy mal en medios que contengan hemo como la única fuente de hierro, indicando que no pueden captar cantidades suficientes de hemo para suplir sus necesidades de hierro. Sin embargo, se ha sugerido la existencia de un sistema inducible de entrada del hemo (Protchenko, Rodríguez-Suárez et al. 2006, Protchenko, Shakoury-Elizeh et al. 2008).

Así, en condiciones de cultivo donde se había observado un aumento de la entrada de hemo (depleción de ALA e hipoxia) se realizó un estudio con microarrays de levaduras $\Delta hem 1$ (mutantes para la biosíntesis del hemo en el primer paso) que permitió identificar **PUG1** (Protoporphyrin Uptake Gene 1) como una proteína con un papel importante en el transporte inducible de porfirinas y hemo en estas levaduras. Esta proteína se localiza en la membrana

plasmática y podría tener un papel importante en la acumulación intracelular de hemo (Protchenko, Shakoury-Elizeh et al. 2008).

5.3.3. Mamíferos

Los mamíferos disponen de varios sistemas para prevenir la toxicidad extracelular de hemo, como puede ser la presencia de proteínas con afinidad al hemo y la hemoglobina que son liberadas en la hemolisis. La hemolisis intravascular es un fenómeno fisiológico que se puede acelerar en diversas situaciones patológicas, como una enfermedad autoinmune o infecciosa, y supone la liberación de hemoglobina y hemo al plasma. La proteína haptoglobina captura esta hemoglobina liberada y este complejo se dirige a los macrófagos del sistema reticuloendotelial, donde es reconocido por el receptor **CD163** que media su endocitosis (Kristiansen, Graversen et al. 2001, Thomsen, Etzerodt et al. 2013). En el interior de los macrófagos la hemoglobina es digerida. Por su parte, la hemopexina (glicoproteína plasmática con elevada afinidad por el hemo) captura el hemo del plasma y este complejo hemo-hemopexina es internalizado también por los macrófagos en una endocitosis mediada por el receptor **CD91** (Hvidberg, Maniecki et al. 2005, Thomsen, Etzerodt et al. 2013)..

En el interior de las células el hemo se une a proteínas solubles citosólicas de unión al hemo, como pueden ser **HBP23** (Iwahara, Satoh et al. 1995), **p22HBP** (Blackmon, Dailey et al. 2002) y **SOUL** (Fortunato, Sordino et al. 2016), que podrían intervenir en el tráfico de hemo desde la mitocondria al resto de orgánulos celulares donde va a formar parte de las hemoproteínas. El hemo también es transportado al retículo endoplásmico, donde tiene lugar su degradación por la actividad de la enzima hemo oxigenasa (Taketani 2005).

En la membrana hay distintas proteínas encargadas del transporte de hemo, entre las que están la proteína **HsHRG1** y proteínas transportadoras pertenecientes a las familias ABC y FLVCR.

El transportador humano **HsHRG1** (*SLC48A1*) es el ortólogo de **CeHRG1**, descrito por primera vez en *C. elegans*. A nivel de ARNm se expresa en el cerebro, en el riñón, el corazón y el músculo esquelético. También se expresa, pero de forma más moderada, en el hígado, el pulmón, la placenta y el intestino delgado (Rajagopal, Rao et al. 2008). A nivel celular, se ha localizado en compartimentos ácidos (endosomas y lisosomas) (Kořený, Oborník et al. 2013) y en la membrana plasmática de algunas células polarizadas (Yanatori, Tabuchi et al. 2010).

La afinidad de HsHRG1 por el hemo disminuye con el aumento del pH (Rajagopal, Rao et al. 2008), lo que podría indicar una función en microambientes de pH ácido, como los endolisosomas, importando el hemo desde el lumen de estos orgánulos al citoplasma. La direccionalidad de la captación de hemo en la membrana plasmática sería la misma que cuando HRG1 se localiza en un compartimento vesicular e importaría el hemo desde el espacio exoplásmico al citoplasma (Hamza and Dailey 2012).

De hecho, HsHRG1 es esencial para la homeostasis del hierro y el reciclaje del hemo en los macrófagos del sistema reticuloendotelial durante la eritropoiesis (Delaby, Rondeau et al. 2012, White, Yuan et al. 2013). Los globulos rojos senescentes son reconocidos por los macrófagos, que los fagocitan dando lugar a compartimentos especiales llamados eritrofagosomas. En estos orgánulos, la hemoglobina es digerida y el hemo liberado probablemente sale al citoplasma a través de la proteína HRG1, que se localiza en la membrana de los eritrofagosoma. Una vez en el citoplasma el hemo puede ser degradado por la enzima hemo oxigenasa o exportado fuera de la célula por proteínas exportadoras de hemo, como FLVCR1 (Delaby, Rondeau et al. 2012) y ABCG2 (Krishnamurthy, Xie et al. 2007).

Proteínas ABC

Las proteínas ABC constituyen una de las superfamilias de proteínas más grandes, estando presentes en todos los organismos y participando en procesos fisiológicos muy diversos. Se describieron por primera vez en bacterias, relacionándolas con la entrada de nutrientes en un sistema de transporte dependiente directamente de la hidrólisis de ATP. Las proteínas de esta familia contienen dominios de unión a nucleótidos muy conservados a lo largo de la evolución, que son las secuencias Walker A y Walker B. Esta familia incluye proteínas tanto importadoras como exportadoras de moléculas (revisado en (Theodoulou and Kerr 2015)).

Estructuralmente poseen dos dominios funcionales característicos. Un dominio transmembrana (TMD) hidrofóbico, que está incluido en la membrana lipídica y el dominio funcional (NBD) hidrofílico y citosólico, de unión a nucleótidos. Al dominio funcional se une el ATP aportando la energía necesaria para el cambio conformacional que va a producir el transporte (Zolnerciks, Andress et al. 2011).

La proteína **ABCG2 (BCRP)** es un miembro de la familia de los transportadores ABC, también denominado BCRP por haberse encontrado que confería resistencia a fármacos en células de cáncer de mama (Latunde-Dada, Simpson et al. 2006). Concretamente, pertenece a la familia G de los transportadores ABC, y sólo formando un homodímero es funcional. El papel de ABCG2 en el tráfico de porfirinas se descubrió por el desarrollo de fototoxicidad en la piel en ratones *Abcg2^{-/-}* debido a la acumulación de Feoforbida A, que es una molécula de estructura parecida a las protoporfirinas (Latunde-Dada, Simpson et al. 2006). Su función es la de exportar hemo de las células y está implicada en la regulación de los niveles endógenos de hemo en el enterocito (Latunde-Dada, Simpson et al. 2006).

ABCG2 se expresa en diferentes tejidos y aumenta su expresión en condiciones de hipoxia; el oxígeno es necesario para la degradación del grupo hemo de tal forma que la ausencia de hemo conlleva una acumulación de hemo en el citosol que debe ser exportado por ABCG2 (Krishnamurthy, Ross et al. 2004).

ABCG2 se localiza en la membrana plasmática (Krishnamurthy, Xie et al. 2007) y además de hemo exporta otras porfirinas, como Coproporfirina y PPIX (Krishnamurthy and Schuetz 2005). Así, cuando las células eritroides sobreexpresan ABCG2 tienen niveles reducidos de PPIX (Krishnamurthy and Schuetz 2005)

Por otra parte, en un primer momento se identificó a **ABCB6** como la proteína mitocondrial transportadora responsable de la entrada del coproporfirinógeno III durante la síntesis del hemo que tiene lugar en el interior de la mitocondria (Krishnamurthy, Du et al. 2006), pero estudios más recientes la localizan únicamente en la membrana plasmática y los lisosomas (Kiss, Brozik et al. 2012). De esta forma, ya no sería una proteína esencial para la eritropoiesis ni para la síntesis del hemo, como lo demuestra la existencia de personas sin el gen **ABCB6** que no muestran ninguna patología (Helias, Saison et al. 2012, Koszarska, Kucsma et al. 2014). De hecho, el grupo sanguíneo poco común LAN- es debido a la ausencia del **ABCB6** humano, que también se expresa en la membrana plasmática de los eritrocitos (Helias, Saison et al. 2012, Peyrard 2013) Además, se han generado ratones con el gen **ABCB6** noqueado que no muestran ningún fenotipo aparente (Ulrich, Lynch et al. 2012).

Hay otras proteínas ABC mitocondriales relacionadas también con la síntesis del hemo, como **ABCB7** y **ABCB10**. **ABCB7** sería un transportador ABC mitocondrial que interacciona con la enzima ferroquelatasa, habiendo sido descrita su esencialidad para la eritropoiesis. Su función no estaría relacionada con el transporte de PPIX, sino con la biogénesis de los cluster Fe-S citosólicos. **ABCB7** es un ortólogo funcional de la proteína de levaduras *Atm1p* (Burke and Ardehali 2007), que es un transportador ABC mitocondrial que participa en el transporte de los cluster Fe-S de la mitocondria al citosol (Severance and Hamza 2009). **ABCB10** se localiza en la membrana mitocondrial interna y también interacciona con la ferroquelatasa. Sus niveles de expresión son mayores en la médula ósea y durante la eritropoiesis (revisado en (Severance and Hamza 2009)). Se ha descrito la existencia de un complejo enzimático dinámico en la membrana mitocondrial interna formado por las enzimas ferroquelatasa, protoporfirinógeno oxidasa y ALA sintasa 2, que podrían estar acompañadas por las proteínas transportadoras de membrana **ABCB7** y **ABCB10** (Medlock, Shiferaw et al. 2015). Estas proteínas ABC podrían ser de esta forma esenciales para la síntesis del hemo al formar parte de este complejo, aunque no estén relacionadas de forma directa con el transporte del hemo o sus intermediarios.

Por último, dentro de la familia ABC, están las proteínas parálogas de **ABCC5** (Korolnek, Zhang et al.), descrita en *C. elegans* y que exporta hemo del citosol al medio extracelular y del citosol al lumen de orgánulos implicados en la secreción, desde los que podría incorporarse a hemoproteínas o secretarse al exterior, y que serían (**ABCC5/MRP5**, **ABCC11/MRP 8** y **ABCC12/MRP9**) (Korolnek, Zhang et al. 2014).

Superfamilia MFS

La superfamilia de proteínas MFS (Major Facilitator Superfamily) representa la familia de transportadores secundarios más grande y desempeña un papel crucial en multitud de procesos biológicos (Pao, Paulsen et al. 1998). Es una superfamilia de transportadores que están presentes en todos los organismos y está compuesta por 58 familias distintas con más de 15.000 miembros secuenciados (Law, Maloney et al. 2008). Las proteínas que forman esta superfamilia comparten relativamente poca homología de secuencia, pero presentan una elevada similitud en cuanto a estructura.

Se trata de permeasas de transporte activo secundario que transportan un amplio espectro de sustratos, incluyendo iones orgánicos e inorgánicos, nucleósidos, aminoácidos, péptidos pequeños y lípidos. Permiten el paso de estas moléculas a través de las membranas vía difusión facilitada, simporte o antiporte (Yan 2015). De esta forma pueden mostrar tres mecanismos cinéticos distintos: uniportadores, que transportan un único tipo de sustrato y que están activados únicamente por el gradiente de sustrato; simportadores, que translocan dos o más sustratos en la misma dirección de forma simultánea, haciendo uso del gradiente electroquímico de uno de los sustratos como fuerza impulsora; y antiportadores, que transportan dos o más sustratos pero en direcciones opuestas (Law, Maloney et al. 2008).

Todos los transportadores MFS poseen una estructura común formada por dos dominios (carboxilo y amino), cada uno formado a su vez por seis dominios transmembrana consecutivos. Dentro de cada dominio, los seis dominios transmembrana están organizados en un par de repeticiones invertidas 3+3. Los correspondientes dominios transmembrana de cada repetición desempeñan un papel funcional y estructural similar. En cada uno de estos grupos de repeticiones hay una hélice transmembrana que está posicionada en el centro del transportador y estas hélices constituyen de forma conjunta la ruta de transporte. La gran mayoría de los residuos identificados para la unión del sustrato y del cotransporte acoplado se localizan en estas cuatro hélices, que formarían la cavidad donde se une el sustrato (Yan 2015).

El mecanismo de translocación de sustrato propuesto sería el de “Rocker-Switch”. Es un movimiento oscilante entre los dos dominios, impulsado por la unión del sustrato y el movimiento de iones que exponen alternadamente el dominio de unión de sustrato al citoplasma y al periplasma (Law, Maloney et al. 2008).

Son proteínas que translocan gran diversidad de sustratos debido a cambios en sólo unos pocos residuos en el sitio de unión al sustrato y en la ruta de translocación. La formación y ruptura de enlaces entre los residuos del transportador y los sustratos están involucrados en cambios conformacionales de la proteína durante el transporte (Law, Maloney et al. 2008).

Pertenecientes a esta familia encontramos las proteínas FLVCR y HCP1.

Transportadores FLVCR

En los seres humanos se ha descrito la existencia de dos transportadores en este grupo: FLVCR1 (con dos isoformas: FLVCR1a y FLVCR1b), y FLVCR2. El nombre de este grupo de transportadores de hemo procede de “Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor”; pertenecen a la familia de transportadores SLC49, miembros de la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily) (Khan and Quigley 2013).

Se han identificado dos isoformas para FLVCR1: FLVCR1a, que es un transportador localizado en la membrana plasmática y FLVCR1b, situado en la membrana mitocondrial. Estas dos isoformas se generan por la existencia de dos sitios diferentes de transcripción. La isoforma FLVCR1b corresponde a una versión truncada de la isoforma FLVCR1a, y está

formada por seis dominios transmembrana (Chiabrandó, Marro et al. 2012). Para desempeñar su actividad transportadora probablemente tendrá que dimerizar (Chiabrandó, Mercurio et al. 2014).

La primera proteína estudiada de esta familia fue **FLVCR1a**. El virus FeLV (virus de la leucemia felina) causa displasia de células rojas en los gatos, y por consiguiente una anemia fuerte, a través de la interacción con su receptor de superficie celular (FLVCR). FLVCR1a fue identificado en un cribado funcional de una librería de ADNc de células T felinas como el gen que confería susceptibilidad a FeLV en una línea celular resistente identificada previamente (Tailor, Willett et al. 1999, Quigley, Burns et al. 2000).

FLVCR1a exporta hemo citoplasmático y es necesario para el desarrollo de células eritroides al protegerlas de la toxicidad del hemo (Quigley, Yang et al. 2004). Su expresión aumenta cuando aumenta la síntesis del hemo y disminuye cuando aumenta la síntesis de globina y la hemoglobinizaci3n (Severance and Hamza 2009). Al sobreexpresar la proteína FLVCR1a en células NRK disminuía el contenido celular de hemo y al medir el eflujo (con ZnMP y Fe⁵⁵ hemo), éste aumentaba en estas células transfectadas con FLVCR (Quigley, Yang et al. 2004).

La salida de hemo mediada por FLVCR1a depende de la disponibilidad y aidez de las proteínas de unió3n a hemo extracelulares, como la albúmina o la hemopexina. Concretamente, la hemopexina interacciona físicamente con el transportador FLVCR1a. De esta forma, FLVCR1a no puede funcionar como un transportador bidireccional dependiente de gradiente, al contrario de lo que ocurre con otros MFS (Yang, Philips et al. 2010). Por otra parte, FLVCR1a también exporta otras porfirinas, como coproporfirina y PPIX (Yang, Philips et al. 2010), igual que ocurre con ABCG2 (Krishnamurthy, Ross et al. 2004).

Es una proteína esencial cuya ausencia en embriones de rat3n (genotipo *Flvcr^{-/-}*) produce la muerte de estos por defectos en la producci3n de células rojas, presentando sus hígados una tonalidad pálida. La supresi3n de este gen produce un bloqueo en las células en estadio proeritroblasto y aparece un exceso de hemo intracelular, igual que en otros modelos en los que la síntesis de hemo o la expresi3n de globina está desregulada (Keel, Doty et al. 2008).

FLVCR1a aumenta su expresi3n en condiciones de hipoxia, lo que podría deberse a que en estas condiciones las células prefieran exportar el exceso de hemo a utilizar oxígeno

para degradarlo en la reacción catalizada por la enzima hemo oxigenasa (Khan and Quigley 2011).

En segundo lugar, la isoforma **FLVCR1b** tiene una localización mitocondrial y se ha propuesto como la proteína responsable de la salida del hemo desde la mitocondria al citosol. La sobreexpresión de FLVCR1b en células HeLa conlleva una acumulación del hemo intracelular. Este incremento de hemo intracelular conllevaba una fuerte inducción de la actividad de la enzima hemo oxigenasa, responsable de la degradación del hemo a nivel citosólico. Así mismo, esta sobreexpresión muestra un incremento en la actividad de enzimas de la biosíntesis del hemo, como *Alas1* y *Cpox*, tal y como demuestran los análisis de RT-PCR (Chiabrandó, Marro et al. 2012). Ello ocurre porque la sobreexpresión de FLVCR1b supone un descenso de los niveles de hemo mitocondriales, de tal forma que desaparece el efecto inhibitorio que ejerce el hemo sobre las enzimas de su biosíntesis (Chiabrandó, Mercurio et al. 2014).

Por otra parte, la supresión de la isoforma FLVCR1b conduce a una acumulación de hemo en el interior de la mitocondria. Se compararon los niveles de hemo en células que perdían FLVCR1a con células que perdían FLVCR1a y FLVCR1b. La pérdida de FLVCR1a, que es la isoforma localizada en la membrana plasmática, no conlleva un incremento de hemo intracelular porque se activa la hemo oxigenasa. Sin embargo, células que perdían ambas isoformas mostraron un incremento de hemo intracelular. En esta condición no había una activación de la enzima hemo oxigenasa, implicando que la sobrecarga de hemo no ocurría a nivel citosólico sino en otro compartimento intracelular (Chiabrandó, Marro et al. 2012).

Figura 27. Isoformas de FLVCR1. Representación esquemática del gen FLVCR1. Las isoformas FLVCR1a y FLVCR1b se originan en dos sitios de inicio de la transcripción alternativos. Tomado de (Chiabrandó, Marro et al. 2012).

Para confirmar estos resultados, se midieron niveles de hemo a nivel citosólico y a nivel mitocondrial. Sólo cuando las células perdían ambas isoformas se observaba un incremento de los niveles mitocondriales de hemo. No obstante, los niveles citosólicos no estaban alterados lo que podría indicar que la biosíntesis del hemo estaba bloqueada. El bloqueo de esta ruta aparece por el incremento en los niveles de hemo mitocondriales (Chiabrandó, Marro et al. 2012).

FLVCR2 es una proteína de superficie relacionada por homología y por topología de membrana con FLVCR1 (comparte un 52 % de identidad) (Fig. 29), pero que no funciona como receptor para FeLV (Brown, Fung et al. 2006).

Los análisis de expresión de la proteína FLVCR2 mediante qRT-PCR en tejidos hematopoiéticos y no hematopoiéticos, revelan que FLVCR2 está presente en una amplia variedad de tejidos humanos, incluyendo el hígado, la placenta, el cerebro y el riñón y se localiza en la membrana plasmática (Duffy, Shing et al. 2010).

Dada la similitud que presentaba con FLVCR1, lo primero que se estudió fue si se unía al grupo hemo. Al igual que ocurría con FLVCR1 (Duffy, Shing et al. 2010) y ABCG2 (Krishnamurthy, Ross et al. 2004), FLVCR2 se une a hemo: la proteína HsFLVCR2 precipitaba con hemina agarosa y esta precipitación era inhibida en presencia de hemo libre (Duffy, Shing et al. 2010). Habiéndose descrito que la proteína HsFLVCR2 no funcionaba como receptor para FeLV, pero que sí interaccionaba con hemo, se analizó si esta proteína estaba implicada en la salida de hemo, como ocurría con HsFLVCR1. Sin embargo, HsFLVCR2 no funcionaba como proteína exportadora de hemo (Quigley, Yang et al. 2004).

Figura 29. Alineamiento de secuencias de las proteínas humanas FLVCR1 y FLVCR2, que muestra los 12 dominios transmembrana presentes en las dos proteínas. Los asteriscos indican posibles sitios de glicosilación. Tomado de (Brown, Fung et al. 2006).

Estudios de citometría con ZnMP con células CHO transfectadas con HsFLVCR1 y HsFLVCR2 revelaron que, en las células que sobreexpresaban HsFLVCR2, se veía incrementada la entrada de ZnMP (Duffy, Shing et al. 2010). De igual modo, las células que sobreexpresaban HsFLVCR2 eran más sensibles a la toxicidad del hemo, lo que venía a confirmar que la sobreexpresión de esta proteína aumentaba la captación de hemo (Duffy, Shing et al. 2010).

Se utilizó el modelo experimental de expresión heteróloga de proteínas transportadoras de membrana en oocitos de rana *Xenopus laevis*. Los oocitos se inyectaron con ARNc de HsFLVCR2 o con tampón TE (oocitos control) e incubados con hemo [^{55}Fe]. Se midió la captación de hemo en estos oocitos y era más de dos veces mayor que en los oocitos control (2.46 pmol hemo/hora respecto a 1.1 pmoles/hora) (Duffy, Shing et al. 2010).

Basándose en estas observaciones se describió que la función de la proteína FLVCR2 era la de importar hemo a la célula desde el espacio extracelular.

Se realizaron ensayos de expresión heteróloga de esta proteína en una línea mutante de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* auxótrofa para el hemo ($\Delta hem1$). Aunque se localizaba en la membrana plasmática, esta proteína no funcionaba como transportadora de hemo ya que las levaduras mutantes no lograban crecer ni siquiera a 10 μ M de hemo. En las condiciones de este ensayo, FLVCR2 no mediaba la entrada del hemo del medio extracelular al interior (Yuan, Protchenko et al. 2012). Sin embargo, HsHRG1 sí era capaz de rescatar el defecto de crecimiento de estas levaduras mutantes en presencia de bajas concentraciones de hemo (Huynh, Yuan et al. 2012).

Finalmente, se han descrito distintas mutaciones en FLVCR2 relacionadas con el síndrome de Fowler, que es un desorden vascular en el cerebro. Esta es una enfermedad de las denominadas como “raras”, de baja incidencia en la población (Duffy, Shing et al. 2010, Chiabrand, Vinchi et al. 2014). También se denomina síndrome de hidrocefalia/hidrancefalia debido a vasculopatía cerebral glomeruloide proliferativa. Es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva (Meyer, Ricketts et al. 2010).

HCP1/PCFT

Es una proteína formada por 459 aminoácidos, con una masa molecular de 50 kDa, formada por entre 9-12 dominios transmembrana, que pertenece a la familia SLC46 de los MFS (Chiabrand, Vinchi et al. 2014). En un principio se propuso que era responsable de la captación intestinal del hemo (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005) aunque su papel fisiológico más relevante parece ser el simporte de folato y protones, (Chiabrand, Vinchi et al. 2014).

Su localización está regulada por un mecanismo postraduccional en respuesta a cambios en el almacenamiento de hierro: se localiza en la membrana plasmática cuando hay deficiencia de hierro y en el citoplasma en condiciones normales (Latunde-Dada, Simpson et al. 2006). En ratones con deficiencia de hierro, HCP1 se localiza en la membrana plasmática y, cuando estos ratones son alimentados con una dosis alta de hierro, esta proteína se redistribuye de la membrana plasmática de las células del duodeno al citoplasma (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005). Este mecanismo de regulación evita la acumulación de hierro y hemo, ambos tóxicos en exceso para las células (Krishnamurthy, Xie et al. 2007). Por tanto, esta proteína presenta una doble localización: en membrana plasmática (Yanatori, Tabuchi et al. 2010), y en vesículas subcelulares, como lisosomas o endosomas (Chiabrand, Vinchi et al.

2014). Esto puede deberse a que HCP1 no sólo capta hemo del exterior sino que también puede facilitar la incorporación de hemo al citoplasma, cuando este hemo es incorporado unido a las proteínas de unión a hemo en el plasma, como la albúmina (Krishnamurthy, Xie et al. 2007), o de hemo derivado de la hemoglobina degradada en el endosoma (Chiabrando, Vinchi et al. 2014). La entrada de hemo mediada por HCP1 es dependiente de temperatura, saturable (Latunde-Dada, Takeuchi et al. 2006) y abolida por siRNA de HCP1 y antisuero HCP1 (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005).

Es una proteína altamente conservada entre diferentes especies (90 % de similitud entre humano y rata o ratón), aunque no hemos encontrado homólogos en tripanosomátidos, y que presenta homología con transportadores de complejos de tetraciclina con metales en bacterias (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005, Chiabrand, Vinchi et al. 2014).

5.3.4. Tripanosomátidos

Como se describió anteriormente, los parásitos tripanosomátidos son auxótrofos para el hemo por lo que deben rescatarlo del hospedador.

5.3.4.1. *Leishmania* spp.

Las formas promastigotes de *Leishmania* spp. pueden obtener hemo *in vitro* a través de dos rutas independientes: la primera ruta sería la endocitosis mediada por receptor de la hemoglobina seguida de una liberación del hemo en el lisosoma (Krishnamurthy, Vikram et al. 2005), y la segunda el transporte directo del hemo a través de la membrana (Chang and Chang 1985, Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011, Huynh, Yuan et al. 2012).

La hemoglobina es internalizada por una endocitosis mediada por receptor. Se ha descrito que este receptor es una hexoquinasa de 46 kDa que se localiza en el bolsillo flagelar (Krishnamurthy, Vikram et al. 2005), y que no interacciona con hemina, globina ni mioglobina (Sengupta, Tripathi et al. 1999). La endocitosis de la hemoglobina es dependiente de clatrina (Agarwal, Rastogi et al. 2013) y van a participar también las proteínas Rab5, de lisosomas tempranos (Singh, Tandon et al. 2003), y Rab7, de endosomas tardíos (Singh, Tandon et al. 2003, Patel, Singh et al. 2008). En estos compartimentos la hemoglobina es digerida y libera hemo, que se importaría al citoplasma por un mecanismo desconocido. La digestión de esta hemoglobina endocitada puede ser inhibida por el aumento de la concentración intracelular de hemo (Sengupta, Tripathi et al. 1999). El tráfico del hemo liberado a la mitocondria requiere del transportador intracelular LABCG5 (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011).

Las formas promastigotes de *Leishmania* también pueden obtener hemo de un suplemento exógeno de hemina libre (Chang and Chang 1985) por transporte directo al citosol del parásito a través de un transportador específico (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011), como sugerían los estudios que mostraban la unión específica de hemo a

L. amazonensis (Galbraith and McElrath 1988) o *L. infantum* (Carvalho, Cruz et al. 2009). Uno de los objetivos principales de esta tesis ha sido la identificación de este transportador.

Durante el transcurso del trabajo de esta tesis, el laboratorio de Norma Andrews propuso que la proteína LHR1 era la responsable de la entrada de hemo en los parásitos de *Leishmania amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012). **LHR1** pertenece a la familia HRG (Heme Response Genes) de transportadores de hemo, descritos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (Rajagopal, Rao et al. 2008).

Esta proteína parece ser esencial para la virulencia de estos parásitos: los amastigotes con una copia noqueada del gen son defectivos en el desarrollo de lesiones cutáneas, fenotipo que es revertido en su mayor parte por complementación génica, y las infecciones de ratones por parásitos LHR1/ Δ Lhr1 mostraban una menor carga parasitaria a las nueve semanas de la infección (Miguel, Flannery et al. 2013). Esta proteína también parece ser esencial para la viabilidad de los parásitos al no haberse podido noquear las dos copias del gen y generar parásitos viables con este genotipo (Huynh, Yuan et al. 2012, Miguel, Flannery et al. 2013).

Por otra parte, el estudio de mutantes para un solo alelo del gen mostró que estos mutantes tuvieron una replicación deficiente y una reducción de la invasión de los macrófagos en un medio deficiente para el hemo. Este resultado puso de manifiesto la importancia de la absorción del hemo para la replicación y la infectividad del parásito (Miguel, Flannery et al. 2013).

La proteína LHR1 de *Leishmania* spp. se localiza en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares ácidos, tanto en las formas promastigotes como en las formas amastigotes. Cuando se sobreexpresa la proteína LHR1 aumenta la captación de hemo, sobretudo si el ensayo se realizaba después de una incubación en un medio deficiente de hemo. En estas condiciones de cultivo, los niveles de ARNm de LHR1 se incrementan, lo que podría reforzar la idea de la implicación de esta proteína en la homeostasis del hemo. Cuando se delecta un alelo de este gen, el contenido de hemo total en los parásitos se reduce y se inhibe la captación de un análogo del hemo (Huynh, Yuan et al. 2012).

Como se ha descrito para el estudio de los transportadores HRG en *C. elegans*, se utilizó aquí la misma cepa mutante para la síntesis del hemo de la levadura *S. cerevisiae* que no crece en condiciones de depleción de hemo. En estas levaduras mutantes se transfectó la

proteína LHR1, y se observó que, además de expresarse en la membrana plasmática de estas levaduras, rescataba su crecimiento en presencia de bajas concentraciones de hemo (Huynh, Yuan et al. 2012).

En las formas amastigotes no se conoce si la fuente de hemo es el hemo libre o el hemo procedente de la lisis de la hemoglobina. Los amastigotes de *Leishmania* viven en la vacuola parasitófora del interior del macrófago. En esta vacuola las hemoproteínas se van a lisar debido a la bajada de pH y a la existencia de proteasas, de tal forma que la hemoglobina va a liberar hemo que puede penetrar en los amastigotes. De manera interesante, a pH ácido, como el que hay en el interior de la vacuola parasitófora, la afinidad de los promastigotes por el hemo aumenta 5 veces al disminuir el pH de 7.4 a 5.4 (Galbraith and McElrath 1988). Por otra parte, fármacos (xantonas nitrogenadas) que quelan el hemo en la vacuola parasitófora, matan a los amastigotes intracelulares (pero no a los axénicos) sin entrar en contacto siquiera con los fármacos (Kelly, Ignatushchenko et al. 2003), impidiéndoles el acceso al hemo. Esto pondría de manifiesto que el hemo de la vacuola parasitófora es esencial para la supervivencia de las formas amastigotes de *Leishmania* spp. Por otra parte, las formas amastigotes van a utilizar el hemo y la hemoglobina de la vacuola parasitófora como fuente de hierro para sus requerimientos nutricionales (Carvalho, Cruz et al. 2009), como se ha descrito también en otros parásitos de vertebrados como *Trichomonas vaginalis* (Alderete, Nguyen et al. 2004, Vieira Pde, Silva et al. 2015).

Independientemente de cuál sea la forma en la que el hemo entra al interior del parásito, este metabolito debe llegar a los distintos orgánulos donde se necesita una vez que ha alcanzado el citosol. Lo más probable es que lo haga unido a proteínas citosólicas para evitar su toxicidad. Uno de los destinos principales es la mitocondria, donde el hemo debe incorporarse a los citocromos de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna. El mecanismo de entrada de hemo a la mitocondria continúa siendo desconocido.

Por otra parte se ha sugerido que los amastigotes intracelulares podrían tomar coproporfirinógeno, un precursor del hemo del macrófago. Éste se convertiría en hemo en la mitocondria del parásito (Akilov, Kosaka et al. 2007, Kořený, Lukes et al. 2010) gracias a la adquisición de las enzimas CPOX, PPOX y FeCh, por transferencia horizontal desde proteobacterias (Kořený, Lukes et al. 2010) . De esta forma, el hemo sintetizado en la mitocondria debería ser exportado al citosol a través de un mecanismo también desconocido (Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016).

En esta biogénesis del hemo mitocondrial a partir de los precursores del hospedador podría estar indirectamente implicado el transportador LmABCB₃, de la familia de los transportadores ABC, que desempeña un papel esencial en la maduración de los clusters Fe/S citosólicos (Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016).

Hasta este momento, LHR1 era el único importador de hemo descrito en *Leishmania* spp.. Sin embargo, *Leishmania* spp. contiene cuatro genes FLVCR aún no descritos y que son ortólogos del transportador humano del hemo FLVCR2. Durante el desarrollo de este trabajo se va a estudiar la posible implicación que puedan tener estos transportadores FLVCR de *Leishmania* spp. en el tráfico del hemo desde el exterior al citoplasma celular. También estudiaremos el mecanismo de salida del hemo procedente de la hemoglobina endocitada, desde el lisosoma hasta el citosol.

5.3.4.2. Género *Trypanosoma*

Los parásitos del género *Trypanosoma* también son organismos auxótrofos para el hemo, pero en este caso, y a diferencia de lo que ocurre en las especies del género *Leishmania*, carecen de todas las enzimas de la ruta de biosíntesis del hemo (Dutta, Furuyama et al. 2008).

5.3.4.2.1. *Trypanosoma cruzi*

La fuente de hemo para *T. cruzi* puede ser hemo en forma libre o hemoglobina. La adición de hemo al medio de cultivo incrementaba la proliferación de epimastigotes de una forma dosis dependiente, mientras que cuando el medio se suplementaba con hemoglobina, se potenciaba el crecimiento a los tres días en la fase logarítmica (Lara, Sant'Anna et al. 2007). Para comparar la cinética de entrada de ambas y el estudio de su tráfico intracelular se utilizó PdMP (Paladio-mesoporfirina) como análogo fluorescente del hemo y hemoglobina unida a Rodamina, observándose que la internalización del hemo era mucho más rápida que la internalización de hemoglobina. Los experimentos de unión mostraron que los parásitos acumulaban PdMP en la región posterior de la célula, que corresponde a los reservosomas, mientras que la Hemoglobina-Rodamina se quedaba en la región anterior (Lara, Sant'Anna et al. 2007). De esta forma se vio que en las formas epimastigotes de *T. cruzi* la internalización del hemo y la hemoglobina tienen lugar a través de rutas o mecanismos diferentes (Lara, Sant'Anna et al. 2007).

Utilizando diferentes inhibidores específicos de los transportadores ABC (Ciclosporina A, Indometacina y Verapamilo) se vio que la captación de hemo disminuía de forma significativa por lo que se sugirió que la entrada de hemo al parásito era mediada por un transportador ABC (Lara, Sant'Anna et al. 2007).

Sin embargo, tras describir la proteína LHR1 como responsable de la entrada del hemo en *Leishmania* spp., se identificó en 2016 una proteína en *T. cruzi* con un 55 % de similitud al LHR1 de *Leishmania* spp. y un 40 % con CeHRG-4. Esta proteína se denominó TcTHE, está localizada en el bolsillo flagelar, donde tiene lugar el transporte de los nutrientes, y podría desempeñar un papel en la entrada de hemo en este organismo. Para estudiar el transporte de hemo en los diferentes estadios de *T. cruzi* se utilizaron también distintos análogos fluorescentes del hemo y se observó, de esta forma, que hay un transportador exclusivo del hemo que puede discriminar entre compuestos relacionados estructuralmente y que solamente las formas replicativas podrían tomar hemo (Merli, Pagura et al. 2016).

Para confirmar el papel de la proteína TcTHE en el transporte de hemo, se realizó el ensayo descrito para otras proteínas HRG de rescate de crecimiento de levaduras mutantes para la síntesis de hemo. La proteína TcTHE se localizaba en la membrana plasmática de estas levaduras y capacitaba a estas levaduras $\Delta hem1$ para crecer a bajas concentraciones de hemo

(Merli, Pagura et al. 2016), tal y como ocurría para LHR1 (Huynh, Yuan et al. 2012), CeHRG1 y CeHRG4 (Yuan, Protchenko et al. 2012).

5.3.4.2.2. *Trypanosoma brucei*

La única fuente de hemo en las formas sanguíneas de *T. brucei* es la hemoglobina, que entra en el interior celular por endocitosis, acompañada a la proteína haptoglobina. En efecto, cuando se llevaron a cabo estudios de captación tanto de hemo libre como del complejo Haptoglobina-Hemoglobina, usando hemo-¹⁴C, se observó que: i) las formas sanguíneas no eran capaces de captar hemo libre no era internalizado, que sí acumulaba eficientemente en las formas procíclicas; ii) las formas sanguíneas, pero no las procíclicas, acumulaban Haptoglobina-Hemoglobina. (Fig. 33) (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008).

La endocitosis del complejo haptoglobina-hemoglobina está mediado por el receptor **TbHpHbR**, específico del estadio sanguíneo, presente de 200 a 400 copias por célula y localizado en el bolsillo flagelar (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). Este receptor está presente también en *T. brucei* subespecie *gambiense* y *T. brucei* subespecie *rhodesiense*, pero ausente en los kinetoplastos relacionados *T. cruzi* y *Leishmania*; siendo específica, por tanto, de parásitos con ciclo de vida extracelular (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). TbHpHbR está implicado en la resistencia que presentan los primates a ser infectados por los parásitos de *T. brucei brucei*, como se ha descrito anteriormente en la introducción de este trabajo.

El receptor TbHpHbR dirige por tanto el rescate de hemo del hospedador, dentro del complejo Haptoglobina-Hemoglobina (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008), para ser

incorporado a las hemoproteínas del parásito. Aunque las formas sanguíneas de *T.brucei* no expresan citocromos de la cadena respiratoria, contienen hemoproteínas tales como citocromos P450 y b5 (Pays and Vanhollebeke 2009) o CYP51 (Lepesheva, Park et al. 2010), y la captación de hemoglobina por este receptor podría satisfacer este requerimiento de hemo del parásito (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). De hecho, recientemente se ha demostrado la esencialidad de la hemoproteína CYP51 en las formas sanguíneas del parásito (Dauchy, Bonhivers et al. 2016). Sin embargo, es posible que exista un mecanismo adicional de rescate de hemo, ya que cuando se elimina el gen *TbHpHbR*, el crecimiento de los tripanosomas no se ve completamente comprometido tanto *in vitro* como *in vivo* (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008), (DeJesus, Kieft et al. 2013),

Las formas procíclicas de *T. brucei* necesitan incorporar hemo desde el hospedador, y aunque se ha descrito que lo toman como hemo libre (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008), hasta la fecha no se ha descrito el mecanismo implicado en su captación.

En este trabajo hemos caracterizado la proteína TbHRG , análogo de las proteínas HRG de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, en las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, y hemos estudiado su papel en la homeostasis del hemo en este organismo auxótrofo para este nutriente esencial.



II. Objetivos

El objetivo fundamental de esta tesis es el estudio del mecanismo de rescate de hemo por los protozoos parásitos *Leishmania* spp. y *Trypanosoma brucei*, auxótrofos para este metabolito esencial, con el fin de identificar posibles nuevas dianas de acción terapéutica.

Para ello, los objetivos específicos han sido:

- a) La caracterización del mecanismo de captación del grupo hemo en especies de *Leishmania* responsables de causar leishmaniasis cutánea (*L. major*) y visceral (*L. donovani*).
- b) La identificación y caracterización de transportadores de la membrana plasmática de *Leishmania* involucrados en la entrada de hemo.
- c) La caracterización del mecanismo de rescate de hemo en *Leishmania* y *T. brucei* a partir de la hemoglobina endocitada.
- d) La validación como diana terapéutica de las proteínas responsables de este tráfico de hemo tanto en *Leishmania* como en *T. brucei*. Para ello hemos estudiado el efecto de la bajada de expresión de los genes identificados tanto en la proliferación *in vitro* de los parásitos como en su capacidad para generar la enfermedad en modelos animales.
- e) El desarrollo de metodologías que faciliten el cribado de alto rendimiento de inhibidores de las dianas identificadas.
- f) Validar esta metodología realizando un estudio piloto con una pequeña librería y estudiar el efecto antiparasitario de los inhibidores de los transportadores de hemo identificados.



III. Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Líneas celulares y organismos utilizados

1.1.1. Bacterias

Se han utilizado distintas cepas de *Escherichia coli*:

E. coli DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* (GibcoBRL).

E. coli XL-10 Gold $\text{\textcircled{R}}$: Tet R Δ (*mcrA*) 183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA-1* *gyrA96* *relAL* *lac* The [F' *proAB* *lacI^q* Δ M15 Tn10 (Tet R) Amy Cam R] a (Agilent Technologies).

1.1.2. Levaduras

Se ha utilizado la cepa BY4742 de *Saccharomyces cerevisiae*:

Levaduras BY4742: MAT α ; *his3* Δ 1; *leu2* Δ 0; *lys2* Δ 0; *ura3* Δ 0.

Levaduras BY4742 Δ *hem1*: MAT α ; *his3* Δ 1; *leu2* Δ 0; *lys2* Δ 8; *ura3* Δ 0; *hem1* Δ ; LEU2.

Las levaduras Δ *hem1* fueron cedidas por el Dr. Ivan Hapala (IABG-SAS, Slovakia).

1.1.3. *Leishmania* spp.

Leishmania major (MHOM/IL/80/Friedlin).

Leishmania donovani (MHOM/ET/67/HU3).

1.1.4. *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei brucei forma sanguínea (BSF) monomórfica (S16) del clon 221a derivado de Lister 427, con resistencia a genética.

Trypanosoma brucei brucei forma procíclica cepa 449 con resistencia a fleomicina.

1.1.5. Células THP-1

Línea celular monocítica humana THP-1.

1.1.6. Ratones

Los ratones utilizados eran machos de la cepa C57BL/6, y se mantuvieron en las instalaciones del Animalario del IPBLN en condiciones libres de patógenos.

1.1.7. Oocitos

Para la obtención de los oocitos, se utilizaron ranas hembra de la especie *Xenopus laevis* (Regine Olig, Hamburgo, Alemania) preparadas para la producción espontánea de oocitos. Las ranas se mantuvieron en tanques con agua y condiciones controladas de pH, dureza, contenido en nitratos, nitritos y cloro, se alimentaron con pienso *Xenopus* XE40 (Mucedola, Milán, Italia) e hígado de rata y se manipularon según las especificaciones de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005).

1.2. Plásmidos utilizados

1.2.1. Plásmidos de clonaje

pGEM-T (Promega): es un vector que posee residuos de desoxitimidina en los extremos 3'. Diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR por una enzima polimerasa que añade una cola de residuos poli Alanina.

pENTR/D-TOPO (Invitrogen): es un vector que permite el clonaje de forma dirigida de productos de PCR entre dos sitios de recombinación concretos, utilizado en la tecnología Gateway.

1.2.2. Plásmidos de expresión en levaduras

pYESDEST52: vector de expresión inducible para levaduras, con un promotor Galactosa.

pDR: vector de expresión constitutiva para levaduras, que permite crear proteínas de fusión a GFP en el extremo carboxilo terminal.

1.2.3. Plásmidos de expresión en *Leishmania major*

Vectores pXG: vector de expresión constitutiva para *Leishmania* spp. (Strain B1288), presentando según el caso el gen de resistencia a la higromicina B (*hph*) o a geneticina (*G418*) (*neo*).

Vectores pXG-/GFP+: vector de expresión constitutiva para *Leishmania major* (strain B2863), que permite crear proteínas de fusión a GFP en el extremo carboxilo terminal. Este

vector posee el gen *neo*, que codifica la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a geneticina (G418)(Ha, Schwarz et al. 1996).

Los plásmidos de expresión en *Leishmania major* fueron cedidos por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University, St Louis, MO, U.S.A.).

1.2.4. Plásmidos de expresión en *Trypanosoma brucei*

P2T7BlueHygro: vector de expresión para *Trypanosoma brucei*, para el ARN interferente, y que confiere resistencia a higromicina B.

pLEW100: vector de expresión inducible para *Trypanosoma brucei*, inducible con doxociclina y que confiere resistencia al fármaco fleomicina.

pGR108: vector de expresión constitutiva para *Trypanosoma brucei*, y que confiere resistencia al fármaco puromicina.

1.2.5. Plásmido de expresión en oocitos

pcDNA 3.1. Hygro: plásmido recombinante utilizado como molde para la síntesis *in vitro* del ARNm de las proteínas LmFLVCRb y LmFLVCRbGFP para su expresión en los oocitos, confiere resistencia a higromicina B.

1.3. Medios de cultivo

1.3.1. Medios de cultivo para bacterias

Medio LB líquido: Bacto-Tripton 1 % (p/v), NaCl 1 % (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v) y ajustar a pH 7 con NaOH. Esterilizado en autoclave.

Medio LB agar: Bacto Agar al 1,5 % en LB líquido. Esterilizado en autoclave.

1.3.2. Medios de cultivo para levaduras.

Medio YPD/YPG líquido: Medio completo, compuesto por peptona 20 g/l, glucosa/galactosa 20 g/l y extracto de levadura 10 g/l. Esterilizado en autoclave.

Medio YPD/YPG sólido: Bacto Agar al 1,5 % en el medio YPD/YPG líquido. Esterilizado en autoclave.

Medio SC-Ura líquido: Medio mínimo, compuesto por Yeast Nitrogen Base without Aminoacids (Difco) 6,7 g/l, Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without Uracil (Sigma-Aldrich) 1,87 g/l, MES (Sigma-Aldrich) 3,9 g/l. Se ajusta con NaOH pH a 5,7. Tras su

III. Materiales y métodos

esterilización en autoclave se suplementa con glucosa al 2 % o galactosa al 2 % y rafinosa al 0,4 %. La solución de los azúcares se prepara 10x y se esteriliza por filtración.

Medio SC-Ura sólido: Bacto Agar al 1,5 % en el medio SC-Ura líquido. Esterilizado en autoclave.

1.3.3. Medios de cultivo para *Leishmania* spp.

RPMI modificado, suplementado con el 10 ó el 20 % de SBF (GIBCO) inactivado: medio de cultivo de las formas promastigotes de *L. major*.

M-199 modificado, suplementado con 40 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 100 µM adenosina (Sigma-Aldrich) y 10 % de SBF (GIBCO) inactivado: medio de cultivo de las formas promastigotes de *L. donovani*.

1.3.4. Medios de cultivo para *Trypanosoma brucei*

HMI-9 suplementado con el 10 % SBF: medio de cultivo de las formas sanguíneas de *T. brucei*.

SDM-79 suplementado con el 10 % SBF y 7,5 µg/ml hemina: medio de cultivo de las formas procíclicas de *T. brucei*.

1.3.5. Medios de cultivo para células THP-1

RPMi 1640 suplementado con 10 % SBF, 2 mM L-Glutamina, Penicilina/Estreptomicina: medio de cultivo de las células THP-1.

1.3.6. Medios de cultivo para los oocitos

Medio OR-2: 82,5 mM NaCl, 5 mM HEPES, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, pH 7,8.

Medio Barth: 88 mM NaCl, 15 mM HEPES, 2,4 mM NaHCO₃, 1 mM KCl, 0,3 mM Ca(NO₃)₂, 0,2 mM CaCl₂, 0,82 mM MgSO₄, sulfato de gentamicina (50 mg/l), mezcla de antibióticos y antimicótico al 1 %, pH 7,6.

1.3.7. Suplemento para los medios de cultivo

Suero bovino fetal (GIBCO): inactivado por calor durante 45 min a 56 °C.

Suero bovino fetal inactivado depletado de hemo: suero bovino fetal inactivado filtrado por columnas Amicon Ultra 10.000 MWCO (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland),

para seleccionar la fracción de bajo peso molecular del suero, tal y como se describe en (Carvalho, Cruz et al. 2009).

1.4. Tampones y medios usados con más frecuencia

1.4.1. Tampones para transfección de los parásitos

Tampón HBS: 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 7 mM Na₂HPO₄; 6 mM glucosa y 20 mM HEPES a pH 7,4. Utilizado para la transfección de las formas promastigotes de *Leishmania*.

Cytomix: 2 mM EGTA; 120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM fosfato potásico; pH 7,6; 25 mM HEPES; 5 mM MgCl₂; 0,5 % glucosa; 100 µg/ml BSA y 1 mM hipoxantina. Utilizado para la transfección de las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* (Clayton, Estévez et al. 2005).

ZPMF: 132 mM NaCl; 8 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 1,5 mM MgOAc₂; 0,09 mM CaCl₂; pH 7. Utilizado para la transfección de las formas procíclicas de *T. brucei* (Clayton, Estévez et al. 2005).

1.4.2. Soluciones para estudios funcionales en los parásitos

Tampón fosfato salino (PBS): 137mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; 10 mM Na₂HPO₄; pH 7,4.

Tampón HPMi glucosa: 132 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 0,5 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂; 5 mM glucosa y 20 mM HEPES a pH 7,25.

1.4.3. Soluciones para electroforesis de ADN

Tampón de carga: 0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % xileno cianol y 30 % glicerol.

Tampón TE: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA.

Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos (TAE 10X): 0,4 M Tris; 10 mM EDTA; ácido acético glacial 11,42 ml para 1 L.

1.4.4. Soluciones para electroforesis de proteínas

Laemmli 5x: 0,625 M Tris-HCl; pH 6,8; 10 % SDS (p/v); 40 % glicerol (p/v); 7,5 % β-mercaptoetanol (v/v); 1,5 % azul de bromofenol.

Acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad).

Tampón separador: 1,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 8,8.

Tampón concentrador: Tris-HCl 0,5 M; 0,4 % SDS; pH 6,8.

Tampón de electroforesis SDS-PAGE: 25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1 % SDS.

III. Materiales y métodos

Azul de Coomassie: Ácido acético glacial 10 %, metanol 50 % y 2 g/l de Coomassie Brilliant Blue (R-250).

1.4.5. Soluciones para Western Blot e inmunodetección

Tampón de transferencia en Western Blot: dependiendo de las características de las proteínas a detectar, vamos a utilizar uno u otro tampón.

Proteínas solubles: 25 mM Tris base, 192 mM glicina y 20 % metanol.

Proteínas de membrana o muy hidrofóbicas: 25 mM Tris base y 0,7 M glicina.

La eliminación de metanol en el tampón de transferencia para proteínas de membrana o muy hidrofóbicas, aumenta la eficiencia de la transferencia de estas pero disminuye la afinidad a la membrana de nitrocelulosa.

Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 5 % en PBS.

Solución de inmunodetección: BSA 0,1 %, Tween-20 0,1 % en PBS.

Solución de lavado: Tween 20 0,1 % en PBS.

Rojo de Ponceau: Rojo de Ponceau 0,5 % en agua.

1.4.6. Soluciones para Southern Blot

Solución de despurinización: 0,25 M HCl.

Solución de desnaturalización: 0,5 M NaOH y 1,5 M NaCl.

Solución de neutralización: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) y 1,5 M NaCl.

20X SSC: 3 M NaCl y 0,3 M citrato sódico, pH 7.

Solución de hibridación: DIG Easy Hyb Granules, preparado según las instrucciones del fabricante.

Tampón de lavado: Solución de ácido. maléico pH 7,5 y 0,3 % Tween 20.

Solución de bloqueo: 10 % de reactivo de bloqueo (10 g de Blocking Reagent (Roche) en 100 ml de solución de ácido maléico) y 90 % de solución de ácido maléico.

Solución de detección: 0,1 M Tris-HCl y 0,1 M NaCl, pH 9,5.

1.4.7. Soluciones para la precipitación con hemina-agarosa

Tampón de solubilización: 100 mM Kpi pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 %DDM; 1 mM DTT y cóctel inhibidor de proteasas 10 µl/ml.

Tampón de dilución: 100 mM Kpi pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM hidrosulfito sódico y 1 mM PMSF.

Tampón de lavado: 50 mM Ki pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100 y 1 mM DTT.

1.4.8. Soluciones para los ensayos de captación en oocitos

Medio de captación: 100 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂ y 10 mM HEPES.

1.5. Fármacos

Ampicilina: Antibiótico betalactámico (fue la primera penicilina semisintética). Se utilizó en una concentración de 100 µg/ml para la selección de bacterias competentes transformadas con los plásmidos que contengan el gen de la β-lactamasa.

Kanamicina: Antibiótico aminoglicosídico producido por *Streptomyces kanamyceticus*. Se utilizó en una concentración de 50 µg/ml para la selección de bacterias competentes transformadas con los plásmidos TOPO, que confiere resistencia a este fármaco.

Higromicina B: Antibiótico aminoglicosídico producido por *Streptomyces hygroscopicus* y que es un inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó como fármaco para la selección de parásitos transfectados con los vectores que contenían el gen *hyh*, que codifica una quinasa que inactiva el fármaco a través de la fosforilación del mismo. Estos vectores en esta tesis son pXGHygro (expresión de proteínas en *Leishmania* spp. en un rango de concentración de 10-500 µg/ml), p2T7Blue (ARN interferente en *T. brucei*, 2,5 µg/ml) y pcDNA 3.1. Hygro (expresión de proteínas en oocitos).

Geneticina (G418): Antibiótico aminoglicosídico producido por *Micromonospora rhodorangea* que actúa como inhibidor de la síntesis de proteínas a nivel de la elongación polipeptídica. Se utilizó para el cultivo de las formas sanguíneas de *T. brucei* (S16 2,5 µg/ml) y como fármaco para la selección de parásitos de *Leishmania* transfectados con los vectores que contenían el gen de la neomicina fosfotransferasa: pXGNeo y pXG GFP (el rango de concentración utilizado para la selección fue de 6-500 µg/ml).

Fleomicina: Antibiótico metalo-glucopeptido de la familia de las bleomicinas, aislado de una cepa de *Streptomyces verticillus*. Provoca roturas en la cadena de ácidos nucleicos y altera la membrana plasmática. Se utilizó para el cultivo de las formas procíclicas de *T. brucei* 449 (1 µg/ml) y para la selección de las formas sanguíneas de *T. brucei* transfectados con pLew100 (2,5 µg/ml), que contienen el gen *Sh ble*, que codifica una proteína con alta afinidad de unión a la fleomicina, provocando su inhibición.

Puromicina: Antibiótico aminonucleósido producido por *Streptomyces alboniger* que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al interrumpir de forma prematura la síntesis de la cadena polipeptídica. Se utilizó para la selección de parásitos de *Leishmania* transfectados

III. Materiales y métodos

con pLS6 (30 µg/ml) y parásitos de *T. brucei* transfectados con pGR108 (1 µg/ml). Estos dos vectores contienen el gen *pac*, que codifica la puromicina-N-acetil-transferasa.

Tetraciclina/Doxociclina: Se utilizó a una concentración de 1 µg/ml para la inducción de las proteínas clonadas en los plásmidos inducibles pLew100 (para las formas sanguíneas de *T. brucei*) y ARN interferente con el plásmido p2T7Blue (para las formas sanguíneas de *T. brucei*).

Gentamicina: Antibiótico aminoglucosídico utilizado para evitar la contaminación por bacterias en el cultivo de los oocitos extraídos de *Xenopus laevis* (50 µg/ml).

1.6. Anticuerpos

Anticuerpo policlonal anti- GFP de conejo: Molecular Probes (Invitrogen).

Anticuerpo anti- α -Tubulina: Thermo Scientific.

1.7. Compuestos usados en los estudios de búsqueda de la fuerza motriz del transporte de porfirinas

1.7.1. Depletors de energía

a) Inhibidores de la cadena respiratoria RKA (Rotenona, KCN y Antimicina A):

1. Rotenona (Sigma-Aldrich): Inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria, actúa sobre la NADH deshidrogenasa bloqueando la transferencia de electrones entre flavina y ubiquinona.

2. KCN (Sigma-Aldrich): Inhibidor del complejo IV de la cadena respiratoria, actúa sobre el hemo a₃ de la citocromooxidasa impidiendo su interacción con el oxígeno).

3. Antimicina A (Sigma-Aldrich): Inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria, bloquea la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c₁.

b) Inhibidor de la ATPsintasa FoF₁: Oligomicina A (Sigma-Aldrich). Se utilizó Oligomicina A como inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial unida a la membrana, bloquea el canal de protones (subunidad F_o) inhibiendo la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte electrónico.

1.7.2. Inhibidores de proteínas ABC

Ciclosporina A (Sigma-Aldrich): es un oligopéptido de 11 aminoácidos que se utiliza como inhibidor de varios transportadores ABC.

Verapamilo (Sigma-Aldrich): inhibidor de diversos transportadores ABC.

1.7.3. Ionóforos

FCCP (Sigma-Aldrich): ionóforo de H⁺.

Monensina (Sigma-Aldrich): ionóforo de Na⁺.

Valinomicina (Sigma-Aldrich): ionóforo de K⁺.

1.8. Oligonucleótidos

1.8.1. Oligonucleótidos para expresión en *T. brucei*

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
LmHR1	AAGCTTATGAACGATTTAGAGCGCAAGC	Cebador directo para clonar LmHR1 en pLew100 y pGR108
	GGATCCCTATTTGTATAGTTCATCCATGCC	Cebador inverso para clonar LmHR1 en pLew100 y pGR108
TbHRG	AAGCTTATGGCTCTTTCAGAGAAAGCGTG	Cebador directo para clonar TbHRG en pLew100 y pGR108
	GGATCCCTATTTGTATAGTTCATCCATGCC	Cebador inverso para clonar TbHRG en pLew100 y pGR108
	GCATTTAAATTGGGCGTTCCTTGTTCAGC	Cebador directo para clonar TbHRG en p3086
	GCGGATCCCAACATGCTCGTCTGAGGGC	Cebador inverso para clonar TbHRG en p3086
TbFLVCR	CCCGGGAAGCTTATGTGCCAACTTTAACTAC	Cebador directo para clonar TbFLVCR en pGR108
	GGAGATCTTC AGATATCTCT GACTCTCTCG TGTG	Cebador inverso para clonar TbFLVCR en pGR108
	GCATTTAAATGGAGGCACAAGCAGTCACTG	Cebador directo para clonar TbFLVCR en p3086
	GCGGATCCTCTGACTCTCTCGTGTGAGGC	Cebador inverso para clonar TbFLVCR en p3086

1.8.2. Oligonucleótidos para ARNinterferente

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
TbHRG	AGAGAAAGCGTGTCTCCGAA	Cebador directo para clonar LmHR1 en p2T7BlueHygro
	AAGGGGGAAGAAGACGGTAA	Cebador inverso para clonar LmHR1 en p2T7BlueHygro
TbFLVCR	TGCCCTGCGTTCTCAGTTCT	Cebador directo para clonar TbFLVCR en p2T7BlueHygro
	CTCGTCGGCAATTCAGTCCT	Cebador inverso para clonar TbFLVCR en p2T7BlueHygro

III. Materiales y métodos

1.8.3. Oligonucleótidos para expresión en levaduras

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
LmHR1	CACCATGAACGATTTAGAGCG	Cebador directo para clonar LmHR1 en pYESDEST52 y pDR
	CTATGCGCAGTTCTCCTTTGA	Cebador inverso para clonar LmHR1 en pYESDEST52
	TGCGCAGTTCTCCTTTGATAT	Cebador inverso para clonar LmHR1 pDR
LdonHR1	CACCATGAACGAGTTGGAGCGGAAG	Cebador directo para clonar LdonHR1 en pYESDEST52 y pDR
	CTATGCACAGTTGCGCTTTAACGTC	Cebador inverso para clonar LdonHR1 en pYESDEST52
	TGCACAGTTGCGCTTTAACGTCACC	Cebador inverso para clonar LdonHR1 pDR
TbHRG	CACCATGGCTCTTTAGAGAA	Cebador directo para clonar TbHRG en pYESDEST52 y pDR
	CTACAACATGCTCGTCYGAGG	Cebador inverso para clonar TbHRG en pYESDEST52
	CAACATGCTCGTCTGAGGGCC	Cebador inverso para clonar TbHRG pDR
LmFLVCRb	CACCATGCTAACCGGGTCTGCTGTTGTGC	Cebador directo para clonar LmFLVCRb en pYESDEST52 y pDR
	TTATAGAGTCGGGCGCTTGAAAACCTCAGAAGCGTTCC	Cebador inverso para clonar LmFLVCRb en pYESDEST52
	TAGAGTCGGGCGCTTGAAAACCTCAGAAGCGTT	Cebador inverso para clonar LmFLVCRb pDR

1.8.4. Oligonucleótidos para construcciones KO en *Leishmania*

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
LmHR1	<u>TCTAGAGATATCAAAGGAGA</u> ACTGCGCATAG	Cebador directo para clonar 5'UTR KO LmHR1
	CAAGGATTCTAGTGAAAAGGTGCATG	Cebador inverso para clonar 5'UTR KO LmHR1
	GACATTGTCCGGAAGTACGACTGA	Cebador directo para clonar 3'UTR KO LmHR1
	ATGAACGATTTAGAGCGCAAGCGGCATTTAAATTCTAGA	Cebador inverso para clonar 3'UTR KO LmHR1
FLVCRb	GTCGTTTCATCGGCGCACAC	Cebador directo para clonar 5'UTR KO LmFLVCRb
	<u>ATTTAAATGCAGACCCGGTTAGCAT</u>	Cebador inverso para clonar 5'UTRKO LmFLVCRb
	<u>ATTTAAATTCTAGACAAGCGCCGACTCTATAA</u>	Cebador directo para clonar 3'UTRKO LmFLVCRb
	ACGCATGAAT GGAGCGAGAC	Cebador inverso para clonar 3'UTRKO LmFLVCRb

1.8.5. Oligonucleótidos para confirmar transfecciones KO en *Leishmania*

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
LmHR1	GAGGCATGAGCACGATGAGG	Cebador directo para confirmar KO LmHR1
	CGTCACGATGTAGCTCCACTTC	Cebador inverso para confirmar KO LmHR1
FLVCRb	TCTTGTTGCGTGATGCGGGT	Cebador directo para confirmar KO LmFLVCRb
	CTCTGCAGTTGTCCGCCACA	Cebador inverso para confirmar KO LmFLVCRb
Secuencia Hyg	CACAGTTTGCCAGTGATACACATGG	Cebador inverso para confirmar secuencia higromicina

1.8.6. Oligonucleótidos para expresión en *Leishmania*

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
LmHR1	<u>AGATCTATGAACGATTTAGAGCGC</u>	Cebador directo para clonar LmHR1 en pXG y pXG/GFP+
	<u>GGATCCCTATTTAAATGCGCAGTTCTCCTTTGA</u>	Cebador inverso para clonar LmHR1 en pXG y pXG/GFP+
LmexHR1	GCCCATGGATGAACGATTTAGAGCGCAAGCGGC	Cebador directo para clonar LmHR1 en pVY107
	CCTGGCGTAGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGT	Cebador inverso para clonar LmHR1 en pVY107
LmFLVCRa	<u>ATCCCGGGATGCCACTCGACAGTAAAGAGC</u>	Cebador directo para clonar LmFLVCRa en pXG y pXG/GFP+
	<u>TAGGATCCTCAGATATCGGCCTTCTGACTTCTGTGGCG</u>	Cebador inverso para clonar LmFLVCRa en pXG y pXG/GFP+
LmFLVCRb	<u>AGCCCGGGATGCTAACC GGGTCTGCTG</u>	Cebador directo para clonar LmFLVCRb en pXG y pXG/GFP+
	<u>TCGGATCCTTAGATATCTAGAGTCGGGCGCTTGAAAAC</u>	Cebador inverso para clonar LmFLVCRb en pXG y pXG/GFP+
LmFLVCRc	<u>GCGATATCATGCAGGCGACGCTCATGAATG</u>	Cebador directo para clonar LmFLVCRc en pXG y pXG/GFP+
	<u>TAGATATCTCATTTAAAGCGGTGCCGCGTGACATCTCC</u>	Cebador inverso para clonar LmFLVCRc en pXG y pXG/GFP+
LmFLVCRd	<u>ATCCCGGGATGTGTGCATGTGTGGG</u>	Cebador directo para clonar LmFLVCRd en pXG y pXG/GFP+
	<u>TAGGATCCCTAGATATCACAGTCTTCTCGGCGTTTTG</u>	Cebador inverso para clonar LmFLVCRd en pXG y pXG/GFP+

Aparecen subrayadas las secuencias para las enzimas de restricción.

1.8.7. Oligonucleótidos para qRT-PCR

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Aplicación
LmHR1	GCTTACCTCTCGGGTGTGTT	Cebador directo para obtener ADNc LmHR1
	TTGTGGAATGACTGGCGTGT	Cebador inverso para obtener ADNc LmHR1
TbHRG	ACCCTGTCCGTGATGAACT	Cebador directo para obtener ADNc TbHRG
	TTGCCTCTCATGTCTTGC	Cebador inverso para obtener ADNc TbHRG
LmFLVCRb	TTTTGGTGCTGCCGATTGTG	Cebador directo para obtener ADNc LmFLVCRb
	ATCACCCCTTATCGTGTCCGC	Cebador inverso para obtener ADNc LmFLVCRb
Actina	GCTGTGAGTTGACACGGCTA	Cebador directo para obtener ADNc Actina
	CCAAGACGAGAAAATTTGAG	Cebador inverso para obtener ADNc Actina
Tubulina	AGGCAACGGGAGGTCGCTATG	Cebador directo para obtener ADNc Tubulina
	GGGATGGGATGATGGAGAAAG	Cebador inverso para obtener ADNc Tubulina
GAPDH	CTCACAAGCACATTGAAGCAGG	Cebador directo para obtener ADNc GAPDH
	AACTTCTCGTTCAGCACCTTTG	Cebador inverso para obtener ADNc GAPDH

2. Métodos

2.1. Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos

2.1.1. Proteínas HRG

Por una parte, se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas homólogas al transportador de hemo en *Leishmania* LHR1, en algunos organismos de interés como pueden ser otros tripanosomátidos, la proteína homóloga en humanos y las dos presentes en *Caenorhabditis elegans*, mediante el programa de alineamiento Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) utilizando los parámetros definidos por defecto (Sievers and Higgins 2014). Clustal Omega utiliza el algoritmo HAlign con su configuración por defecto como motor del alineamiento (Soding 2005).

Las secuencias se obtuvieron de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Además, con estas secuencias se realizaron análisis filogenéticos para conocer las relaciones de proximidad evolutiva que presentaban dichas proteínas HRG en los organismos estudiados.

Tabla 1. Especie, abreviatura y referencia de las secuencias génicas empleadas para realizar los alineamientos múltiples de secuencias de las proteínas HRG.

2.1.2. Familia FLVCR

Se realizó la búsqueda de proteínas homólogas en organismos kinetoplástidos a la proteína FLVCR2 humana (Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor), en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Se encontraron cuatro proteínas homólogas en *Leishmania major*, una en *Trypanosoma brucei* y una en *Trypanosoma cruzi*. Con estas secuencias se realizaron los distintos alineamientos mediante el programa de alineamiento Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) utilizando los parámetros definidos por defecto (Sievers and Higgins 2014). Clustal Omega utiliza el algoritmo HAlign con su configuración por defecto como motor del alineamiento (Soding 2005)(Soding 2005)(Soding 2005)(Soding 2005)(Soding 2005)(Soding 2005)(Soding 2005)(Soding 2005).

Como ocurría para las proteínas HRG, las secuencias de las distintas proteínas FLVCR se obtuvieron de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

III. Materiales y métodos

Además, con estas secuencias se realizaron análisis filogenéticos para conocer las relaciones de proximidad evolutiva que presentaban dichas proteínas FLVCR en los organismos estudiados.

Tabla 2. Especie, abreviatura y referencia de las secuencias génicas empleadas para realizar los alineamientos múltiples de secuencias de las proteínas FLVCR.

2.2. Cultivo y manipulación de bacterias

2.2.1. Cultivo *in vitro*

Las bacterias se cultivaron en medio LB líquido y sólido, este último obtenido por adición de 15 g/l de bactoagar al medio líquido. La esterilización se realizó mediante autoclavado (Autoclave Selecta mod. Presoclave 75 l) a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

Para la selección de transformantes, los medios de cultivo se suplementaron con distintos antibióticos: Ampicilina (100 µg/ml) y Kanamicina (50 µg/ml). En todos los casos los antibióticos se prepararon como soluciones concentradas en agua Milli-Q. Todas las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,8/0,2 µm (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan EE.UU.) y se adicionaron a los medios previamente autoclavados. La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en condiciones de esterilidad usando un mechero Bunsen.

Para cultivar las bacterias en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo previo en 3 ml de medio o se inoculó en medio fresco a una dilución 1/250 un precultivo. El cultivo de *E. coli* se incubó durante 16 h a 37 °C.

2.2.2. Criopreservación y congelación

Las células se tomaron en fase logarítmica de crecimiento y para congelarlas se añadieron 600 µl de una solución de glicerol estéril al 50 % a 900 µl de cultivo bacteriano. Las células se congelaron a -80 °C y para conservarlas por largos períodos de tiempo, los viales se guardaron en contenedores de nitrógeno líquido.

Para descongelarlas, se arrastró con una punta de pipeta parte del contenido del vial y se añadió a 3 ml de medio LB con Ampicilina, incubándose durante 16 h en agitación y a 37 °C.

2.3. Cultivo y manipulación de levaduras

2.3.1. Cultivo *in vitro*

Los medios utilizados para el cultivo de las células de levadura se esterilizaron mediante autoclavado a 1 atmósfera de presión y 120 °C, durante 20 min. No obstante, algunos componentes como azúcares, vitaminas, bases nitrogenadas y antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,2 µm, antes de ser adicionados a los medios previamente autoclavados. La preparación de medios sólidos se realizó mediante la adición de 20 g/l de bactoagar al medio líquido correspondiente previo al autoclavado.

2.3.2. Criopreservación y congelación

Se crecieron 300 µl de un cultivo de levaduras en 50 ml de medio correspondiente (YPD ó SC-Ura suplementado con glucosa y ALA) en un matraz estéril de 500 µl, durante 24 h a 28 °C. Para recoger las levaduras se centrifugó este cultivo a 3000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10-15 %. Los viales de congelación se guardaron a -80 °C o en contenedores de nitrógeno líquido para su mantenimiento durante períodos largos de tiempo.

Para su descongelación, se tomó con una torunda del vial guardado a -80 °C y se sembró en una placa de agar con el medio correspondiente. A los 3-4 días se hicieron visibles las colonias.

2.4. Cultivo y manipulación de *Leishmania* spp.

2.4.1. Cultivo *in vitro*

Las formas promastigotes de *Leishmania* spp. se cultivaron en medio RPMI modificado (para *L. major*) y M-199 modificado (para *L. donovani*). A este medio se le adicionaron los distintos fármacos para el cultivo de los parásitos transfectados con plásmidos que contenían dichas resistencias. Los parásitos de *Leishmania* spp. se cultivaron en frascos con tapa sin filtro en un incubador a 28 °C. Los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas cada dos días, midiendo de forma regular su densidad celular en un contador de células Coulter Counter modelo Z1, diluyendo 100 µl del cultivo de parásitos en 9,9 ml de medio isotón.

2.4.2. Criopreservación y congelación

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación (2500 rpm, durante 10 min y a 4 °C), y se resuspendieron en medio RPMi modificado suplementado con el 20 % SBF inactivado con 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Los viales de congelación se guardaron a -80 °C y en contenedores de nitrógeno líquido para su mantenimiento durante períodos largos de tiempo.

Para su descongelación se diluyó el contenido del vial congelado en medio RPMi modificado suplementado con el 20 % SBF inactivado atemperado.

2.5. Cultivo y manipulación de *Trypanosoma brucei*

2.5.1. Formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

2.5.1.1. Cultivo *in vitro*

Las formas sanguíneas de *T. brucei* se cultivaron en medio HMI-9 suplementado al 10 % con SBF inactivado, en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % CO₂ y en frascos con tapa con filtro. La densidad celular se midió regularmente en un contador de células Coulter Counter modelo Z1, diluyendo 500 µl del cultivo de parásitos en 9,5 ml de medio isotón, y los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas cada dos días, a una densidad celular inferior a 2x10⁶ parásitos por mililitro.

2.5.1.2. Criopreservación y congelación

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación (1000xg durante 10 min y a temperatura ambiente) y se resuspendieron en medio de cultivo HMI-9 suplementado con 10 % SBF inactivado con 10 % de glicerol. Las células se congelaron lentamente a -80 °C, y para su mantenimiento durante períodos largos de tiempo se trasladaron a contenedores de nitrógeno líquido. Se descongelaron diluyendo el contenido del vial congelado en medio HMI-9 suplementado con el 10 % suero bovino fetal inactivado atemperado.

2.5.2. Formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*

2.5.2.1. Cultivo *in vitro*

Las formas procíclicas de *T. brucei* se cultivaron en frascos con tapa sin filtro en medio SDM-79 suplementado al 10 % con suero bovino fetal inactivado y 7,5 µg/ml de hemina, en un incubador a 28 °C y concentraciones normales de oxígeno. Los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas cada dos días, midiendo de forma regular su densidad celular en un contador de células Coulter Counter modelo Z1, diluyendo 100 µl del cultivo de parásitos en 9,9 ml de medio isotón.

2.5.2.2. Criopreservación y congelación

Las células se recogieron durante su fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación durante 10 min a 2500 rpm a 4 °C y se resuspendieron en medio de cultivo SDM-79 suplementado con 10 % SBF inactivado y 7,5 µg/ml de hemina con 10 % de glicerol. Se mantuvieron en congeladores de -80 °C y se trasladaron a nitrógeno líquido para su almacenamiento durante largos períodos de tiempo.

Se descongelaron diluyendo el contenido del vial congelado en su medio habitual de cultivo atemperado.

2.6. Cultivo y manipulación de células THP-1

2.6.1. Cultivo *in vitro*

Las células se cultivaron en medio RPMi 1640 suplementado con 10 % SBF inactivado, 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % CO₂ y en frascos con tapa con filtro. Las células THP-1 se

diferenciaron a macrófagos con 20 ng de acetato de forbolmiristato (PMA) durante 48 h, dotándolas de capacidad de adherencia a la placa de cultivo (Sereno, Roy et al. 2001).

2.6.2. Criopreservación y congelación

Se hizo un recuento de las células en cámara de Neubauer, de tal forma que se tomaron 2,5 mill de células por vial de congelación. Se recogen las células mediante centrifugación durante 10 min a 1500 rpm a 25 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en medio de congelación preparado con SBF suplementado con DMSO al 10 %.

Para descongelarlas, se tomó el contenido de un vial y se añadió muy despacio a 10 ml de medio de cultivo atemperado. Al día siguiente, se centrifugó este cultivo y se resuspendió en 10 ml de medio nuevo. De esta forma se eliminó totalmente el DMSO que había en el medio de congelación.

2.7. Clonaje de los genes en los plásmidos de expresión para organismos tripanosomátidos y levaduras

Para este apartado se tuvieron en cuenta las indicaciones dadas por (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

2.7.1. Aislamiento de ADN genómico de *L. major*, *L. donovani* y *T. brucei*

El aislamiento de ADN genómico de estos organismos se realizó en el Servicio de Genómica del IPBLN, a partir de un cultivo en fase logarítmica de 50 millones de parásitos. Su concentración y pureza se determinó con NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

2.7.2. Diseño de los oligonucleótidos

Para cada clonaje se diseñaron los oligonucleótidos adecuados, teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones: a) tamaño de entre 20 a 25 nucleótidos; b) contenido en G+C ≤ 60 %; c) $T_m \approx 60$ °C y d) evitar contener en la medida de lo posible estructuras secundarias ni dímeros. Para el diseño del oligonucleótido se utilizó el programa Primer Designing Tool (BLAST) y para su análisis el programa Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies).

2.7.3. Amplificación del ADN (PCR)

A partir del ADN genómico de *L. major*, *L. donovani* o *T. brucei*, según corresponda en cada caso, se amplificaron los distintos genes utilizando los oligonucleótidos adecuados.

2.7.4. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se emplearon con las recomendaciones de la casa comercial. En concreto, se utilizaron enzimas de restricción de Roche y de Fermentas. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl empleando 1 U de enzima por µg de ADN a digerir, incubándose durante 2 h a la temperatura recomendada. Las enzimas se inactivaron de acuerdo con las condiciones recomendadas por la casa comercial.

Una vez realizada la digestión del fragmento de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de donde se purificó la banda correcta de tamaño mediante el kit Nucleospin®Gel PCR Clean-up (Macherey-Nagel). La cuantificación y pureza del ADN digerido se determinó con el NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

2.7.5. Tratamiento con fosfatasa alcalina

La enzima fosfatasa alcalina hidroliza el grupo fosfato en el extremo 5' del ADN. La reacción necesita este grupo fosfato, por lo que cuando se tratan los vectores de clonaje con esta enzima disminuye la posibilidad de religación de los vectores abiertos.

A la digestión con las enzimas de restricción del vector de clonaje, se añadió 1 U de enzima y se incubó durante 30 min a 37 °C.

2.7.6. Ligación del producto de PCR en los distintos plásmidos

Las reacciones de ligación de los fragmentos de ADN en los distintos plásmidos se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, procedente del bacteriófago T4. Para esta reacción se utilizó por lo general relaciones molares inserto : vector de 3:1, salvo en el caso de tratarse con insertos de tamaño parecido al del vector, donde se utilizó una relación de 1:1. Generalmente, la reacción se realizó durante una hora a temperatura ambiente ó 16 h a 4 °C.

La mezcla resultado de la ligación se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* competentes, en una relación inferior a 1:10 (volumen de ligación: volumen del cultivo de las bacterias).

2.7.7. Selección de los transformantes positivos

Las bacterias transformadas con los plásmidos clonados de forma correcta se seleccionaron en una placa de agar LB suplementada con Ampicilina (100 µg/ml) o Kanamicina (50 µg/ml), según la resistencia que presentase el plásmido donde se realizó el clonaje. Una vez seleccionadas las colonias que pudieran ser positivas, se aisló su ADN

III. Materiales y métodos

plasmídico, y se llevó a cabo un análisis con enzimas de restricción para posteriormente mandarlo al Servicio de Secuenciación del IPBLN. Allí se secuenciaron por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos o método de Sanger, con un secuenciador automático 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.7.8. Aislamiento de ADN plasmídico

Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos se cultivaron durante 16 h a 37 °C con una agitación de 230 rpm en 3 ml de medio LB suplementado con Ampicilina (100 µg/ml) o Kanamicina (50 µg/ml). Los plásmidos se aislaron con Plasmid DNA Mini Kit I, de Omega Bio-Tek, basado en una lisis alcalina de la pared bacteriana y una desnaturalización selectiva del ADN cromosómico con dodecilsulfato sódico (SDS o NaDS). Para la elución del ADN plasmídico se utilizaron 70 µl de agua Milli-Q®, que se pasaron dos veces por la columna para mejorar el rendimiento de la elución. La cuantificación y determinación de la pureza del ADN plasmídico se realizó con NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

2.7.9. Preparación de células competentes por choque térmico

La preparación de células competentes consiste en tratarlas para debilitar su pared y hacerlas susceptibles de ser transformadas, de introducir en ellas plásmidos.

Se sembró un inóculo de la cepa correspondiente en medio líquido LB, sin antibiótico, durante 16 h. De este cultivo se realizó una dilución 1/200 en medio líquido LB en un matraz y se incubó en agitación durante 37 °C hasta que alcanzó una DO a 600 nm de 0,375. Se llevaron las células a 4 °C durante 15 min, y se centrifugaron a 3000 rpm durante 7 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 1/5 del volumen del que se partía de volumen de Cl_2Mg 0,1 M frío, y se mantuvo esta suspensión a 4 °C durante 15-20 min. SE centrifugó de nuevo a 3000 rpm 7 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió ahora en 1/50 del volumen del que se partía de volumen de Cl_2Ca 0,1 M frío y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Al final, se añadió glicerol a la suspensión hasta tener una concentración final del 15 %, se mezcló bien y se hicieron alícuotas de 200 µl, que se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

2.7.10. Transformación de *E. coli*

Se partió de una alícuota de 200 µl de células competentes congeladas a las que se adicionó 1 µl de plásmido (1-10 ng de ADN) ó 5 µl mezcla de ligación. Las células se incubaron en hielo durante 20 min y luego se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 45 segundos. Seguidamente, se enfriaron en hielo durante 2 min y se añadieron 700 µl de medio

LB, incubándose el conjunto a 37 °C en agitación durante al menos una hora. Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de las células de 50 y 200 µl, que se sembraron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las células que contenían el plásmido. A las 14-16 h de cultivo a 37 °C aparecieron las colonias.

2.8. Clonaje en pGEMT

2.8.1. Clonaje en pGEMT

Para el clonaje de fragmentos de ADN y construcción de los plásmidos de expresión en los organismos tripanosomátidos se realizó previamente un clonaje en el plásmido pGEMT (pGEM®-T Easy Vector Systems, de Promega) (Fig. 1).

Se utilizó una enzima polimerasa Pfx50 con actividad a prueba de errores (Probe Reading). El programa de PCR era el adecuado para cada secuencia a amplificar, teniendo en cuenta la longitud del fragmento y la Tm de los oligonucleótidos diseñados para cada uno.

En este caso, una vez transformadas las bacterias con el plásmido resultante de la ligación, se puede diferenciar entre colonias azules y colonias blancas en presencia de IPTG y X-Gal. Este plásmido posee la secuencia del gen *lac z* de tal forma que aquellas colonias que sean de color blanco indican que ha habido una interrupción en el gen *lac z* y el clonaje ha ocurrido de forma correcta. También aparecerán colonias azules, donde el gen *lac z* se mantiene intacto y, por tanto, funcional. Este gen *lac z* codifica la enzima β-galactosidasa, que hidroliza X-gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble.

Una vez clonado el fragmento amplificado en este plásmido se mandó a secuenciar con los oligos T7 y Sp6.

2.8.2. Clonaje en los distintos plásmidos de expresión en parásitos

El fragmento de ADN digerido del vector pGEMT se añadió a un reacción de ligación con el vector linearizado, también digerido con los mismos enzimas o enzimas compatible. Con el producto de la ligación, se transformaron bacterias y se seleccionaron aquellas que contenían el plásmido correcto, tal y como se indica en un apartado anterior. Una vez comprobada cuál era la bacteria que contenía el plásmido correcto, éste se aisló y se preparó para la transformación de los parásitos, como se va detalla más adelante.

2.9. Tecnología Gateway

Para el clonaje de fragmentos de ADN y construcción de los plásmidos de expresión en levaduras se utilizó la Tecnología Gateway, la cual permite introducir el gen de interés de una manera sencilla en distintos sistemas de análisis funcional, manteniéndose la orientación y el marco de lectura con una alta eficacia y eliminándose la necesidad de secuenciaciones secundarias o de subclonaje después de haber introducido el gen en un vector de entrada. Esta tecnología está basada en las propiedades de integración y escisión del bacteriófago lambda en el genoma de *E. coli* por recombinación. En el sistema *Gateway*, las reacciones de integración y escisión se llevan a cabo *in vitro*, según se explica en la figura 2.

La reacción *attL* x *attR* está catalizada por la mezcla de enzimas *Gateway® LR Clonase™ II* (Invitrogen Cat. No.11791-019). La mezcla contiene, por un lado, las enzimas implicadas en la recombinación del bacteriófago lambda, la Integrasa (Kelly, Ignatushchenko

et al.) y la Escisionasa (Xis), y por otro lado, el Factor de Integración en el Hospedador (IHF) de *E. coli*.

2.9.1. Clonaje en vector TOPO

Para generar los vectores de entrada se utilizó pENTR/D-TOPO (Invitrogen), que permite el clonaje de forma dirigida de productos de PCR entre los sitios de recombinación attL1 y attL2 (Fig. 2). El vector linearizado tiene asociado de forma covalente una Topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, habiéndose añadido la secuencia GTGG a uno de los extremos 5' (Fig. 3). Este extremo permite la clonación de forma orientada de los productos de PCR generados, utilizando un cebador *forward* al que se ha añadido la secuencia CACC. El extremo GTGG del vector linearizado se une a las bases complementarias CACC del producto de PCR, permitiendo la ligación orientada por la Topoisomerasa I.

La clonación se realizó siguiendo las instrucciones especificadas en el pENTR/SD/D-TOPO® *Cloning Kit* (Invitrogen), que podrían resumirse del siguiente modo. Se tomaron 2 µL producto PCR, a los que se añadieron 0,5 µL de solución salina y 0,5 µL del vector TOPO. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

En este caso la selección de las bacterias transformantes se realizó en presencia de Kanamicina 50 µg/ml.

2.9.2. Clonaje en vector de expresión pYESDEST52 y pDR

Una vez clonado el gen de interés en el vector de entrada, se puede dirigir a diferentes vectores de destino mediante recombinación específica y así llevar a cabo diversos experimentos de análisis funcional y de expresión de proteínas. Para llevar a cabo la reacción de recombinación se siguieron las instrucciones de *Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix*

III. Materiales y métodos

(Invitrogen). La reacción es 1 h a temperatura ambiente y para parar la reacción se adicionó Proteinasa K. Con el producto de esta reacción se transformaban las células competentes. A partir de las colonias transformadas se llevó a cabo el aislamiento del plásmido por el método ya descrito (KIT E.Z.N.A.).

Los vectores de destino utilizados en los estudios de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* fueron dos: pYESDEST52 (de expresión inducible) y pDRccdBGFP (de expresión constitutiva), que permite su fusión a GFP en el extremo carboxilo terminal.

Para facilitar el clonaje, estos dos vectores presentan dos sitios de recombinación, *attR1* y *attR2*, flanqueando el gen de selección negativa *ccdB*, que posibilitan una eficiente recombinación con un gen clonado entre los sitios de recombinación *attL* en un *attL*-flanked Gateway® entry vector como D-TOPO.

El vector pYESDEST52 contiene el promotor *Gal1* de levadura que se induce por galactosa y se inhibe en presencia de glucosa, de manera que se produce la expresión de los genes en medio suplementado con galactosa.

Para poder identificar y purificar la proteína expresada en levadura, el vector pYESDEST52 permite la fusión del extremo C-terminal de la proteína codificada por el gen clonado con una secuencia que codifica un epítopo V5 y una secuencia de 6 histidinas. Dicho vector presenta un origen de replicación de alto número de copias en levadura. Como ya se mencionaba anteriormente, el vector pDRccdBGFP permite la fusión de la proteína a GFP en el carboxilo terminal, con lo que hemos podido hacer no sólo estudios de funcionalidad de las proteínas que hemos clonado, sino también estudios de localización en microscopio de fluorescencia de una forma directa.

Los ensayos funcionales realizados con las proteínas HRG se llevaron a cabo tanto con las proteínas clonadas en el plásmido inducible pYESDEST52 como con la proteínas clonada en el plásmido de expresión constitutiva pDR. Los resultados para ambos casos fueron los mismos.

Así mismo, estos vectores contienen un gen que codifica resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de las bacterias transformadas con la construcción y también el gen *URA3* para la selección auxotrófica en un medio mínimo sin uracilo de las levaduras transformadas.

2.10. Transformación de levaduras

Se realizó con el método del Acetato de Litio (Gietz and Woods 2006). Se cultivó un inóculo de 50 µl de levaduras en 3 ml de medio YPD líquido y se incubó durante toda la noche

a 30 °C. El cultivo se centrifugó durante 30 segundos a 15000xg, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 100 mM. La suspensión resultante se incubó 5 min a 30 °C, se centrifugó de nuevo y al sedimento se adicionaron 345 µl de una solución que contiene PEG3350 (polietilenglicol) al 35 % (p/v), 0,1 M LiAc y 3 mg/ml de ADNss de cadena sencilla de esperma de salmón. A continuación, se adicionaron 5 µl del plásmido, y el conjunto se agitó 1 min, incubándose a 42 °C durante 20 min. Tras centrifugar la mezcla a 15000xg durante 30 segundos, se obtiene un sedimento celular que se resuspendió en 300 µl de H₂O destilada estéril y se sembraron en medio SC sólido suplementado con los aminoácidos adecuados, incubándose a 28 °C durante 3 ó 4 días, hasta que se visualizaron colonias.

2.11. Ensayos de crecimiento de levaduras (líquido y gotas)

Estos ensayos se llevaron a cabo tal y como se describe en (Huynh, Yuan et al. 2012). Las levaduras son mantenidas en medio YPD +250 µM ALA (ácido δ-aminolevulínico) y se transforman por el método del Acetato de Litio. Los transformantes son seleccionados en placas SC-Ura+ 2 % p/v glucosa + 250 µM ALA.

Cuando se trataba de levaduras transformadas con el plásmido inducible pYESDEST52, se hizo una réplica en placas SC-Ura +2 % p/v rafinosa +250 µM ALA, y se cultivó durante 48 h (depleción de glucosa). De aquí se hizo una réplica en medio líquido SC-Ura+ 2 % p/v rafinosa durante 18 h para depletar de hemina los cultivos (no llevan ALA, van a crecer poco). El ensayo se realizó en medio SC-Ura +2 % p/v rafinosa + 0,4 % p/v galactosa, suplementado con ALA, hemina o hemoglobina.

Cuando se trataba de levaduras transformadas con el plásmido constitutivo pDR, se hizo una réplica en medio líquido SC-Ura+2 % p/v glucosa durante 18 h para depletar de hemina los cultivos (no llevan ALA, van a crecer poco). El ensayo se realizó en medio SC-Ura +2 % p/v glucosa, suplementado con ALA, hemina o hemoglobina.

Para el ensayo en gotas, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm y se diluyeron todos los cultivos a 0,2. Se hicieron diluciones seriadas en agua estéril a 1, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. De cada dilución se sembraron 10 µl en la placa. Cada placa de medio SC-Ura +2 % p/v rafinosa + 0,4 % p/v galactosa o SC-Ura +2 % p/v glucosa se suplementaba con una concentración concreta de ALA, hemina o hemoglobina.

El ensayo de crecimiento de levaduras en líquido se llevó a cabo de forma similar. Las células depletadas de hemo se resuspendieron en medio a una densidad óptica medida a 600 nm de 0,1 y se crecieron en presencia de las concentraciones indicadas de ALA, hemo o

III. Materiales y métodos

hemoglobina, en medio SC-Ura +2 % p/v rafinosa + 0,4 % p/v galactosa o SC-Ura +2 % p/v glucosa. Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos, poniendo un duplicado de cada condición. La densidad óptica a 600 nm fue leída a las 24 h de incubación a 28 °C.

2.12. Transfección de *Leishmania*

2.12.1. Plásmido episomal

Los parásitos se recogieron al final de la fase logarítmica, a una densidad entre 20-25 millones por mililitro a 2500 rpm durante 7 min y a una temperatura de 4 °C, se lavaron dos veces en HBS glucosa frío, y se resuspendieron hasta una concentración final de 40-100 mill/ml. Se incubaron 400 µl de parásitos en HBS con 30-45 µl del ADN (10 µg) en agua a 4 °C durante 10min. Se dio un choque eléctrico (450 voltios, R1, 500 µF) y se añadieron 600 µl de medio de cultivo con suero. Tras el choque se incubaron en hielo otros 10 min, y se pasó el contenido de la cubeta de electroporación a un frasco de cultivo más 4 ml (5 ml de volumen final) de medio de cultivo con suero.

A las 24 h, se realizaron diluciones 1:10 ó 1:5, tomando aproximadamente 400 µl del cultivo hasta 3-5ml de medio nuevo, y se añadió aquí el fármaco de selección. Se dejó creciendo y seleccionando durante 4-10 días. Si se iba a plaquear en medio sólido, se centrifugaban los parásitos electroporados ese día, se resuspendía en 1 ml de medio fresco y se plaqueaban 300 µl en una placa con el antibiótico de selección a igual o menor concentración que en medio líquido. Se esperó 6-18 días para la aparición de colonias. Cuando el cultivo líquido hubo crecido, se dobló la concentración de antibiótico con un pase 1:10. Se subió la concentración de higromicina o geneticina hasta un máximo de 0,2-0,5 mg/ml (Pérez-Victoria, Gamarro et al. 2003).

2.12.2. Generación del SKO (delección de un alelo)

La sustitución de los genes *LmHR1* o *LmFLVCRb* se llevó a cabo según lo descrito en (García-Sánchez, Sánchez-Cañete et al. 2014, Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016). Brevemente, las regiones “aguas arriba” y “aguas abajo” de cada gen se amplificaron por PCR usando como molde ADN genómico de *L. major* y los oligos indicados, y se clonaron en el vector pGEM-T (Promega). Entonces, el gen *hyg* (que confiere resistencia a la higromicina B) flanqueado por un fragmento de 248 pb de la región 5' no traducida (5'UTR) y un fragmento de 869 pb de la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *DHFR-TS* de *L. major*.

Los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica se transfectaron con 5-10 µg de las construcciones linearizadas de ADN, generadas por digestión con Apal y NotI, utilizando el sistema Nucleofactor de Amaxa (Lonza). Los parásitos transfectados se seleccionaron con 50 µg/ml de higromicina B, realizando diluciones seriadas de los cultivos y sembrando en placas de 96 pocillos. Se aumentó el volumen de aquellos pocillos en los que se observaron parásitos vivos, y para obtener clones aislados de estas poblaciones se sembraron en placas de medio sólido.

2.13. Transfección de formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

Los parásitos se recogieron a una densidad entre $1-2 \times 10^6$ por mililitro a 1000xg durante 10 min y a temperatura ambiente, se lavaron con Cytomix atemperado y se resuspendieron hasta una cantidad final de 60×10^6 por mililitro, incubando 100 µl de parásitos en Cytomix con 10 µg de ADN plasmídico linearizado (1 µg/µl). Se dio un choque eléctrico en Amaxa Nucleofector II programa X-001 y se pasó el contenido de la cubeta de electroporación a un frasco de cultivo con 13 ml, y de aquí se tomó 1 ml para un frasco de 11 ml de medio de cultivo con suero. Ambas diluciones se repartieron en placas de 24 pocillos, 500 µl de cada frasco por pocillo. A las 12-24 h, se añadieron 500 µl por pocillo de medio suplementado con suero y con el fármaco de selección a una concentración apropiada. En el caso de selección con puromicina se repitió esto los días 3 y 4 de la transfección, hasta que el pocillo quedó con 2 ml. Se dejó creciendo y seleccionando durante 5-7 días.

2.14. Transfección de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*

Los parásitos se recogieron a una densidad entre $4-8 \times 10^6$ por mililitro a 1000xg durante 10 min y a temperatura ambiente, se lavaron con ZPMF frío y resuspendieron hasta una concentración final de 60×10^6 por mililitro, incubando 100 µl de parásitos en ZPMF con 5-10 µg de ADN plasmídico linearizado (1 µg/µl). Se dio un choque eléctrico en Amaxa Nucleofector II programa X-014 y se pasó el contenido de la cubeta de electroporación a un frasco de cultivo con 4 ml. A las 12-24 h, se repartió en placa de 24 pocillos a razón de 1 ml por cada pocillo de la fila inicial. Al resto de los pocillos se añadieron 500 µl de medio condicionado con fármaco de selección a una concentración apropiada y se hicieron diluciones seriadas 1:1 partiendo del pocillo inicial. La placa se selló con parafilm y se dejó creciendo y seleccionando durante 10 días.

III. Materiales y métodos

Para preparar medio condicionado se centrifugó un cultivo de parásitos a una densidad de entre 6-9 millones por mililitro y se tomó el sobrenadante. El medio condicionado se puede mantener a 4 °C durante 48 h.

2.15. ARN interferente para *T. brucei*

El ARN interferente es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional, que se activa en muchos organismos eucariotas por ARN de doble cadena (Shi, Chamond et al. 2004). Con el objetivo de estudiar la esencialidad de las proteínas con las que estábamos trabajando, se utilizó esta tecnología (Clayton, Estévez et al. 2005). Desde que fue descrito en 1998 (Ngo, Tschudi et al. 1998), el ARNi es el método de elección para estudiar la función de los genes en *T. brucei*. El parásito *T. brucei*, a diferencia de *T. cruzi* y *Leishmania* spp. posee la maquinaria específica para llevar a cabo este mecanismo de modificación a nivel de ARNm (Shi, Chamond et al. 2004, Tschudi, Shi et al. 2012).

El diseño de los oligonucleótidos y la selección del fragmento a silenciar se realizó con el programa online RNAit (www.trypanofan.org). Se realizó una construcción del ARN de doble cadena de cada proteína a silenciar en el plásmido p2T7Blue Hygro, que es un plásmido inducible de expresión en *Trypanosoma brucei*.

TbHRG (Tb927.8.6010): Se realizó la amplificación mediante PCR de un fragmento de 456 pb, utilizando los oligonucleótidos indicados y clonándolo en el vector p2T7Blue, con resistencia a higromicina B e inducible con tetraciclina o doxociclina.

TbFLVCR (Tb10.3350): Se realizó la amplificación mediante PCR de un fragmento de 516 pb, utilizando los oligonucleótidos indicados y clonándolo en el vector p2T7Blue, con resistencia a higromicina B e inducible con tetraciclina o doxociclina.

Este plásmido posee dos promotores T7 en direcciones opuestas, entre los que se clona el fragmento de PCR. Estos promotores son inducibles por Tetraciclina, de tal forma que se puede inducir la transcripción del fragmento de ARN de doble cadena que silenciará el ARN m de nuestras proteínas en las células transfectadas.

El plásmido se transfectó de forma linealizada, tras digerirlo con NotI y tal y como se explicó anteriormente.

Para conocer si la interferencia de estas proteínas afectaba a la viabilidad de los parásitos se realizaron curvas de crecimiento en presencia o ausencia de Doxociclina, que es un derivado de la tetraciclina sintética y que se utiliza para la inducción de los promotores T7. También se hicieron estudios con microscopía de los parásitos cuando se realizaba la interferencia de ARN para ver si había efectos a nivel morfológico.

2.16. Microscopía de fluorescencia

Para conocer la localización de las distintas proteínas que hemos ido estudiando, se utilizó la construcción quimérica de cada proteína con fusión en Carboxilo terminal de la proteína verde fluorescente (GFP) y distintos marcadores conocidos de cada orgánulo celular.

En cada caso, se ha mostrado un parásito representativo de la población total de parásitos con un patrón de fluorescencia similar. El mapa de colocación muestra la intensidad de colocación entre nuestra proteína y la sonda empleada. El mapa de color representa los valores del índice de Correlación I_{corr} (que van entre -1 y +1). En estos mapas, valores correlacionados negativamente (entre -1 y 0) se muestran en colores azul-verde, mientras que los valores correlacionados positivamente (entre 0 y +1) aparecen en colores amarillo-rojo. El índice de correlación (I_{corr}) representa la fracción de píxeles correlacionados positivamente en las imágenes 3D. Los resultados muestran una imagen representativa de la proyección en Z.

2.16.1. Cultivo de levaduras para microscopía

El cultivo de levaduras se llevó a fase exponencial para la visualización de las levaduras en microscopio de fluorescencia. Para ello, del cultivo en sólido de las levaduras se hizo una réplica en cultivo líquido durante 16 h a 28 °C, y 200 rpm. Tras esas 16 h, se hizo una dilución de las levaduras a una DO_{600} de 0,4. Tras 3-4 h de cultivos las levaduras están en fase exponencial de crecimiento a una DO_{600} de unos 0,8-1, y en este momento se realizó la incubación con las distintas sondas. El marcaje de las sondas se llevó a cabo en medio mínimo

III. Materiales y métodos

(SC-Ura, suplementado con glucosa 2 % y 250 μM ALA). El medio completo (medio YPD) produce mucha autofluorescencia por lo que se evitó su uso para resuspender las levaduras que se van a visualizar en el microscopio de fluorescencia.

2.16.2. Cultivo de parásitos para microscopía

Los parásitos se cultivan a una densidad de 1×10^6 /ml durante 48 h, y en este momento se incubaron con las distintas sondas (estadio exponencial de crecimiento).

2.16.3. Sondas utilizadas

FM4-64 (Molecular Probes): marcador de membrana plasmática y bolsillo flagelar si se utiliza a 4 $^\circ\text{C}$ y de ruta endocítica si se utiliza a 28 $^\circ\text{C}$ (incubándose 30 min). Se ha utilizado a 2 μM para marcar 20×10^6 parásitos en 1 ml de PBS.

Rojo Dextrano Alexa 647: marcador de ruta endocítica o endosoma, utilizado en *T. brucei*. Se ha utilizado a 2,5 mg/ml para marcar 10×10^6 parásitos de la forma sanguínea de *T. brucei*.

LysoTracker Red DND-99: marcador de lisosomas. Se ha utilizado a 75 nM para 4×10^6 parásitos en 1 ml mantenidos en tampón HBS o PBS, incubándose durante 10 min a 28 $^\circ\text{C}$.

ApoHb-PPIX: Promastigotes de *L. major* expresando la proteína LmHR1 fusionada en su extremo carboxilo terminal a GFP se incubaron con 10 μM de ApoHb-PPIX (preparada tal y como se indica en esta misma sección de metodología, apartado 2.20) durante 60 min a 28 $^\circ\text{C}$ en medio HPMI glucosa.

Las células se lavaron dos veces en 500 μl de tampón salino fosfato frío (PBS), y se procesaron para observación microscópica. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio Olympus de epifluorescencia y Confocal Leica SP5 y los stacks ($n=40$) y deconvolucionadas usando Huygens Professional from Scientific Volume Imaging (<http://www.svi.nl>). Los análisis estadísticos de colocalización se realizaron en secciones 3D con el programa de colocalización de color de FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>).

2.17. Análisis de expresión génica

2.17.1. Aislamiento de ARN total de *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*

El ARN total de las cepas indicadas de *L. major* y *T. brucei* fue preparado utilizando el kit de aislamiento de ARN total (Roche Biochemicals), en el Servicio de Genómica del IPBLN, a partir de un cultivo en fase logarítmica de 50 millones de parásitos. La concentración y pureza

del ARN obtenido se determinó mediante espectrofotometría, en NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

2.17.2. Síntesis de ADN complementario

El ADN complementario fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total utilizando el kit de síntesis qSCRIPT™ cDNA (Quanta Biosciences, Inc.) según las recomendaciones del fabricante y siguiendo el protocolo que aparece en la tabla 4.

2.17.3. Amplificación del ADN complementario

El ADN complementario fue amplificado con las distintas parejas de oligonucleótidos para cada gen. Los genes de Actina, Tubulina y GAPDH se utilizaron como genes normalizadores, al tratarse de genes de expresión constitutiva. La PCR cuantitativa fue llevada a cabo con iTaq Universal SYBR Green Supermix en un termociclador BioRad CFX96.

Para confirmar la especificidad se controlaron los valores de T_m (melting temperature), y para eliminar la posibilidad de contaminaciones con ADN genómico se incluyeron controles en los que no se había añadido la reverso transcriptasa.

2.17.4. Análisis de los resultados

Los resultados mostrados en cada caso de la qRT-PCR son la media de tres experimentos independientes. La cantidad relativa de cada transcrito se calculó utilizando el Software CFX Manager, con el método $\Delta\Delta Cq$ (Livak and Schmittgen 2001). Los datos de los transcritos de los distintos genes se normalizaron con los genes constitutivos actina, tubulina, y GAPDH, siendo calculados como la diferencia en el umbral de los ciclos qPCR ($\Delta CT = CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen o genes de referencia}$). La expresión de cada gen se determinó como la diferencia entre los valores ΔCq ($\Delta\Delta Cq$), utilizando en cada caso su control. Como un ciclo de PCR representa 2 veces la diferencia en la abundancia del ADNc (generado a partir del ARNm por la enzima Reverso Transcriptasa), los cambios en la abundancia relativa se calcularon como $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.18. Hibridación ADN-ADN (Southern Blot)

2.18.1. Transferencia alcalina por capilaridad

La transferencia de ADN por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente se realizó siguiendo el protocolo de transferencia alcalina. Para ello, el ADN genómico (5 µg) previamente digerido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) a 60 V durante 150-200 min, en función de las bandas que queramos visualizar. La tinción con el bromuro de etidio se realizó tras la electroforesis, sumergiendo el gel durante 15 min en una solución de BrEt 0,25-0,5 µg/ml. Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, el gel se sumergió en la solución de despurinización (0,25 M HCl) durante 10-15 min hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y despurinarlo, lo que facilita la transferencia. La desnaturalización alcalina del ADN se realizó sumergiendo el gel en la solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M y 0,5 M NaOH) durante 15 min. Pasado este tiempo se renovó la solución y se dejó durante 15 min más.

Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada. Para neutralizar el ADN, el gel se sumergió en la solución de neutralización (0,5M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) durante 30 min. Pasado ese tiempo, se retiró la solución y se lavó el gel con agua destilada. Antes de realizar la transferencia, se humedeció una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta-Probe Blotting Membranes, BioRad) durante al menos 5 min en la solución SSC 10x (preparado a partir de una solución SSC 20x: 3 M NaCl, 0,3 M citrato sódico pH 7).

Sobre un cristal se construyó una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por: una pieza de papel Whatman cuyos extremos quedaban sumergidos en la solución de transferencia SSC 10x colocada en el reservorio inferior, seguida por el gel colocado en posición invertida (de esta manera tras la transferencia en la membrana quedará las muestras en el mismo orden en que cargamos el gel), la membrana de nylon, tres piezas de papel Whatman y sobre estas, varias capas de papel de filtro que hizo de absorbentes. Se cubrió con otro cristal y por último un peso de 0,5-1 kg comprobando que el sistema estuviese perfectamente horizontal, para dejar la transferencia durante toda la noche. De esta forma, la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido.

Finalizada la transferencia, se lavó la membrana con SSC 2x durante 10 min y se secó a temperatura ambiente sobre papel de filtro durante 15-30 min. Por último, el ADN se fijó a la membrana de nylon mediante crosslinking con UV por las dos caras ($\lambda=254$ nm -120 mJ/cm²).

Las membranas se conservaron secas entre papel de filtro a temperatura ambiente selladas en bolsa de plástico hasta su utilización.

2.18.2. Marcaje de la sonda con digoxigenina

Se utilizó un marcaje con digoxigenina acoplada a un dNTP, en este caso dUTP. El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el sistema comercial *DIG DNA Labelling and Detection Kit* (Roche). Las sondas de ADN se sintetizaron por PCR utilizando una mezcla de dNTPs que contiene DIG-11-dUTP (Roche), lo que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la enzima Taq-polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. Como ADN molde se utilizó 10 ng–3 µg de ADN genómico de cada una de las líneas de *Leishmania major*. Este ADN se desnaturalizó durante 10 min a 98-100 °C. Tras la desnaturalización se incubó en hielo (a 4 °C) durante 10 min, y se añadieron 2 µl de hexanucleótidos 10x, 2 µl DIG DNA Labeling Mix 10x y 1 µl de polimerasa Klenow. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 16 h. Esta reacción se detuvo añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8, 2 µl de LiCl 4 M y 60 µl de etanol absoluto, e incubando 30 min a -80 °C. En estas condiciones la sonda precipitó y se resuspendió en 50 µl de tampón TE.

La sonda marcada se utilizó diluida a una concentración de entre 5-25 ng/ml en solución de hibridación (*DIG Easy Hyb Granules*, Roche). Las sondas preparadas en solución de hibridación se conservaron a -20 °C pudiendo ser reutilizadas posteriormente.

2.18.3. Hibridación y lavados

El proceso de hibridación utilizando ADN homólogo como sonda se efectuó utilizando un horno de hibridación. La prehibridación de la membrana se realizó durante 2 h a 42 °C.

Mientras tanto, se desnaturalizó la sonda a 100 °C durante 10 min. Tras esta desnaturalización, se incubó la sonda 10 min en hielo, y se diluyó en la solución de hibridación.

Una vez concluida la prehibridación de la membrana, se retira esta solución de hibridación y se reemplaza por la solución de hibridación que contiene la sonda marcada y desnaturalizada, dejando incubar toda la noche a la temperatura de hibridación, con una velocidad de rotación de 30.

El rango de la temperatura de hibridación (Aslett, Aurrecoechea et al.) se calcula:

$$T_{hib} = T_m \text{ de la sonda} - (20 \text{ ó } 25)$$

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/l)$$

$$l = \text{longitud de la sonda en número de pares de bases}$$

Tras la hibridación se recuperó la sonda, y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que ésta se puede reutilizar 3-5 veces. En ese caso, es necesario desnaturalizarla a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de utilizarla de nuevo.

El lavado de la membrana se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 min cada uno en SSC 2x; SDS 0,1 % (p/v), a temperatura ambiente (horno de hibridación abierto con control de temperatura apagado y velocidad de rotación de 45), seguido de dos lavados de 15 min en SSC 0,1x y SDS 0,1 % (p/v) a $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en el horno de hibridación y manteniendo la velocidad de rotación en 45). Los lavados permiten retirar la sonda hibridada inespecíficamente.

2.18.4. Detección inmunológica

La detección con fosfatasa alcalina se realizó a temperatura ambiente. Esta reacción se realizó con el sistema *Detection Kit* (Roche), siguiendo el protocolo detallado por el fabricante con leves modificaciones. La detección de la sonda se basa en el uso de anticuerpos antidigoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima provoca la desfosforilación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) para dar lugar a un producto de color azul oscuro. La sal de azul de nitrotetrazolio (NBT) actúa como oxidante y también genera un color azul oscuro, de modo que se intensifica el color al producirse un precipitado azul insoluble, lo que hizo que la detección sea más sensible.

La membrana se lavó durante 3 min con tampón de lavado (solución de ácido maléico con 0,3 % Tween 20). Tras este lavado, la membrana se incubó primero durante 30 min en solución de bloqueo (Blocking Reagent de Roche, en solución de ácido maléico), para evitar la unión específica de los anticuerpos anti-digoxigenina a la membrana, y posteriormente otros 30 min con solución de anticuerpo (solución de bloqueo con antidigoxigenin-AP conjugate Fab fragments de Roche, en una dilución 1:10000). Tras la incubación con el anticuerpo, se lavó la membrana dos veces durante 15 min con tampón de lavado, y después se equilibró durante 5 min con la solución de detección (0,1 M Tris-HCl y 0,1 M NaCl, pH 9,5).

Para la visualización de las bandas, la membrana se incubó con la solución de detección suplementada con NBT/BCIP (Roche) en oscuridad hasta que aparecieron las bandas. Esta última reacción se paró lavando la membrana con agua destilada.

2.19. Detección de proteínas (Western Blot)

2.19.1. Transferencia a la membrana

Las proteínas recombinantes fusionadas a GFP se detectaron utilizando un anticuerpo policlonal anti- GFP de conejo (Molecular Probes, Invitrogen). Para ello, las proteínas se transfirieron a un soporte sólido a partir de un gel SDS-PAGE y posteriormente se inmunodetectaron por quimioluminiscencia.

El soporte sólido utilizado fueron membranas de difluoropolivinilideno (PVDF) que presentan un tamaño de poro de 0,45 μm y son capaces de retener proteínas de más de 10 kDa. Las incubaciones del gel y la membrana en las distintas soluciones empleadas en esta técnica se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

Como primer paso de esta técnica, el gel desnaturalizante de SDS, que contenía las proteínas a analizar fue incubado durante 30 min en solución de transferencia. Mientras tanto, la membrana de PVDF, de un tamaño ligeramente superior que el gel, fue sumergida en metanol absoluto durante 15 seg y posteriormente lavada durante 2 min con agua Milli-Q®. A continuación, la membrana fue incubada durante 5 min en la solución de transferencia. Posteriormente, sobre la placa correspondiente al polo positivo del dispositivo de transferencia, se depositó una pieza de papel "Extra Thick Blot Paper" del mismo tamaño que la membrana, previamente humedecida en la solución de transferencia. Sobre ellas se depositó la membrana de PVDF y, a continuación, se colocó el gel de SDS-PAGE, y sobre éste otra pieza de papel "Extra Thick Blot Paper" del mismo tamaño que la membrana, también humedecida en la solución de transferencia. Finalmente, se colocó la placa correspondiente al polo negativo del dispositivo de transferencia. La transferencia se realizó durante 45 min a 23 V.

A continuación, para comprobar la eficiencia de la transferencia, la membrana se incubó durante 5 min en la solución de transferencia y, seguidamente, se tiñó con la solución de Rojo Ponceau (5 %) y ácido acético (1 %) durante 1 min. Posteriormente, la membrana se lavó con agua Milli-Q® hasta visualizar las proteínas. Con un lápiz se pueden anotar sobre la membrana las posiciones de los pesos moleculares estándares. Inmediatamente, se destiñó la membrana utilizando una solución de 0,1 N NaOH. Posteriormente, la membrana se bloqueó con la solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C.

2.19.2. Detección inmunológica

Para detectar las proteínas fijadas a la membrana de PVDF, ésta se incubó durante 1 h en solución de inmunodetección con el anticuerpo Anti-GFP (anticuerpo primario). A continuación, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min en tampón de lavado y se incubó durante 1 h en solución de inmunodetección con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso. Tras esta última incubación, la membrana se lavó de nuevo 3 veces durante 10 min.

La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific).

2.20. Preparación de ApoHb

Una solución de hemoglobina bovina (Sigma-Aldric) al 1,6 % (p/V) en agua Milli-Q® se añadió gota a gota sobre 40 volúmenes de acetona ácida fría (4500 ml de acetona+12,66 ml de HCl 2N, guardado a -20 °C), mientras se agita vigorosamente. En estas condiciones, la globina se precipita y se separa del grupo hemo, que se mantiene soluble en la acetona. Tras una centrifugación a -20 °C a 3836xg durante 15 min, obtuvimos un sobrenadante de color rojizo donde quedaba el grupo hemo y un precipitado de la apohemoglobina sin grupo hemo, de color blanquecino. La acetona ácida se evaporó en presencia de nitrógeno líquido y el precipitado se resuspendió en agua Milli-Q®. Para comprobar que quedaba menos de un 10 % de hemo residual en la solución de apohemoglobina, se analizó el ratio de su absorbancia a $\lambda=405$ nm (absorbancia del grupo hemo) y a $\lambda=280$ nm (absorbancia de las proteínas). El ratio obtenido fue de 0,36, que equivale a un hemo residual de 7,5-8 % de acuerdo con (Ascoli, Fanelli et al. 1981). Como control se tomó este ratio de la solución de la Hemoglobina bovina preparada en agua Milli-Q®, que daba un valor de 4,15.

La suspensión de la ApoHb se dializó con agua, para terminar de eliminar la acetona ácida y el hemo que pueda quedar en esa suspensión, durante 24 h con 4 cambios de agua. Para la diálisis se utilizaron unos tubos de diálisis con un cut off de 8-10 kDa (Spectra/Por® Float-A-Lyzer®, ref G235067, BioTech Grade Cellulose Ester) con un volumen de 10 ml que se dializó frente a 5 l de agua Milli-Q® en cada cambio.

Tras la diálisis se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 3750xg, generándose un pequeño precipitado que correspondía a la ApoHb no disuelta y un sobrenadante, donde quedaba la ApoHb disuelta en agua Milli-Q®, que se guardó a 4 °C tras ser liofilizada, en alícuotas de 15 mg. La cuantificación de proteínas se realizó con el método Bradford (Bradford 1976).

La calidad de la preparación de Apohemoglobina se comprobó llevando a cabo una titulación de su capacidad de unir PPIX. Para ello, se añadieron concentraciones crecientes de PPIX sobre una cubeta con agua y otra con ApoHb, y se midió la absorbancia a $\lambda=405$ nm tras cada adición de porfirina. Como muestra la figura 6, en el caso de la cubeta sin proteína, la absorbancia aumenta linealmente en función de la cantidad de porfirina. En la cubeta con Apohemoglobina (100 μg), la misma cantidad de porfirina produce una mayor absorbancia como consecuencia de su acoplamiento en el sitio de unión de hemo en la hemoglobina. Cuando estos sitios se han completado, la adición de PPIX provoca el mismo aumento de absorbancia que el producido en la cubeta sin proteína. Los resultados mostraron que unos 3,75 μg de PPIX- Na_2 saturaron los sitios de unión a porfirina de 100 μg de ApoHb, lo que equivalía a unos 4 moles de porfirina por tetrámero de Hb, como esperábamos.

2.21. Reconstitución de ApoHb con distintas PPIX

2.21.1. Formación de Mg-PPIX-ApoHb

Para medir la entrada de hemoglobina, se preparó un análogo fluorescente de la hemoglobina sustituyendo el hemo por MgPPIX (Ascoli, Fanelli et al. 1981). Brevemente, Mg-PPIX-ApoHb se reconstituyó en condiciones aeróbicas mezclando en un exceso molar del 10 % de Mg-PPIX ($\lambda=409$ nm, $\epsilon = 218,2$ en HCl 2.7 N), respecto a apohemoglobina (ApoHb)

III. Materiales y métodos

preparada como se menciona en el apartado anterior. Después de incubarse esta mezcla durante 60 min a temperatura ambiente y agitación suave (tras los primeros 30 min se añadió tampón Kpi pH 6,3 de una solución 100 mM, de tal forma que quedase a 10 mM), se eliminó por centrifugación (8 min, 10000 rpm y temperatura ambiente) la proteína precipitada y la MgPPIX-ApoHb se separó de la MgPPIX no incorporada mediante filtración en gel en columnas PD-10 (GE Healthcare), equilibradas previamente con tampón kpi pH 6,3 10 mM, seguido de una cromatografía de afinidad en columnas de CM-Celulosa (Sigma-Aldrich) (preparadas en el laboratorio siguiendo las instrucciones del fabricante). Finalmente, el tampón de elución, tampón kpi 30 mM pH 7 en este caso, se cambió por PBS usando una nueva columna PD10.

La cuantificación de la ApoHb-PPIX se realizó con el método Bradford (Bradford 1976) utilizando una curva patrón de Hemoglobina.

2.21.1. Formación de PPIX-ApoHb

Para medir la formación de hemo *de novo*, se preparó un análogo fluorescente de la hemoglobina sustituyendo el hemo por PPIX (Ascoli, Fanelli et al. 1981). Se preparó una solución saturada de PPIX-Na en agua ($\lambda=408$ nm, $\epsilon=262$ en HCl 2.7 N), que se incubó con la apohemoglobina, manteniendo la relación 7 μ g de PPIX Na /100 μ g de ApoHb. La incubación se realizó durante 60 min en agitación suave a temperatura ambiente (tras los primeros 30 min se añadió tampón Kpi pH 6,3 de una solución 100 mM, de tal forma que quedase a 10 mM). Por centrifugación (8 min, 10000 rpm y temperatura ambiente) se eliminó la proteína precipitada y la PPIX-ApoHb (sobrenadante) se separó de de la PPIX-Na no incorporada mediante filtración en gel en columnas PD-10 (GE Healthcare), equilibradas previamente con tampón kpi pH 6,3 10 mM, y la elución se realizó en este mismo tampón. Este eluido se pasó por una columna de intercambio iónico (HiTrap™ CM, GE Healthcare) y esta nueva elución se realizó con tampón kpi 30 mM pH 7. Por último, para tener la ApoHbPPIX en tampón PBS se volvió a pasar por una nueva columna PD10 de exclusión molecular equilibrada con PBS.

La cuantificación de la ApoHb se realizó con el método Bradford (Bradford 1976) utilizando una curva patrón de Hemoglobina.

2.22. Preparación de suero depletado de hemo

El SBF depletado de hemo se preparó tal y como se describe en (Carvalho, Cruz et al. 2009). Brevemente, el suero inactivado se filtra en columnas Amicon Ultra 10.000 MWCO (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland), para seleccionar la fracción de bajo peso

molecular del suero (20min a 3000xg). La depleción de hemo en el suero se verificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (Huynh, Yuan et al. 2012). Este suero depletado de hemo permite un crecimiento normal de *L. major* cuando se le añade una fuente exógena de hemo (hemina o hemoglobina), tal y cómo se observa en la figura 7.

2.23. Formación de hemo *de novo* a partir de PPIX y ApoHbPPIX

La síntesis de hemo a partir de su precursor PPIX ó ApoHbPPIX se cuantificó tal y cómo se ha descrito previamente (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011, Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016) con algunas modificaciones. Brevemente, los parásitos se incubaron en medio de cultivo suplementado con 10 % suero bovino fetal inactivado depletado de hemo durante 16 h con o sin 0,5 μM de PPIX ó 0,125 μM ApoHbPPIX a 28 °C. Trascurrido este tiempo, los parásitos una vez lavados se lisaron con seis ciclos de congelación/descongelación con nitrógeno líquido y el hemo intracelular se midió con el kit Hemin Assay (Sigma-Aldrich) y se normalizó por cantidad de proteína. El hemo sintetizado *de novo* era la diferencia de los niveles de hemo medidos en parásitos incubados en la presencia o la ausencia de PPIX o ApoHbPPIX.

El ensayo de formación de hemo *de novo* a partir de PPIX y ApoHbPPIX se puede realizar en *Leishmania* porque a diferencia de los otros géneros de tripanosomátidos patógenos (*Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*), *Leishmania* spp posee el gen de la ferroquelatasa. Esta enzima cataliza la incorporación de hierro al precursor PPIX para sintetizar hemo, tal y como se indica en el siguiente esquema.

2.24. Cuantificación de niveles citosólicos de hemo en formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

Los niveles de hemo citosólicos en las formas sanguíneas de *T. brucei* se midieron después de realizar una lisis suave con los parásitos, tal y como se describe en (da Silva Augusto, Moretti et al. 2015). Brevemente, los parásitos (crecidos en medio HMI-9 suplementado con 10 % FBS como fuente de Haptoglobina-Hemoglobina) se lavaron con PBS y se lisaron con tres ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido y baño a 60 °C. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 14000g durante 10 min, y el hemo citosólico se midió con el Kit del Ensayo de la Hemina (Sigma-Aldrich), y se normalizó por cantidad de proteína con Bradford (Bradford 1976).

2.25. Entrada de porfirinas en las formas promastigotes de *Leishmania* spp.

Para evaluar la entrada de porfirinas en las formas promastigotes de *Leishmania*, los parásitos se tomaban al final de la fase exponencial y tras ser lavados con PBS se incubaron en medio HPMI durante 90 min a 28 °C para liberar de porfirinas el posible transportador de hemo.

En el caso de *L. major*, los parásitos (10×10^6) se incubaron durante 10 min a 28 °C con 10 μ M de ZnMP, y se lavaron con PBS suplementado con 5 % BSA para eliminar la porfirina adherida a la membrana plasmática. Para determinar la viabilidad, los parásitos se incubaron durante 5 min a 4 °C con 20 nM de sonda Sytox Green (Invitrogen, marcador de viabilidad).

Finalmente, los parásitos se fijaron con 2 % paraformaldehído en PBS. La fluorescencia intracelular podía ser medida por citometría de flujo (excitación a 405 nm y emisión entre 575 y 585 nm) utilizando el citómetro FACSaria Cell Sorter III (Beckton Dickinson, San Jose, CA), excitando con un láser violeta a 405 nm, o utilizando un espectrofluorímetro. En el caso del espectrofluorímetro los parásitos se lisaron con 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido y se resuspendieron en tampón fosfato 100 mM pH 8,3 suplementado con Triton X-100 al 1 %. La fluorescencia se midió en el espectrofluorímetro excitando a 402 nm y tomando la emisión de 550 nm a 600 nm. Esta fluorescencia se normalizó en función de la cantidad de proteína. Para ello, se tomó una alícuota del lisado de los parásitos previa a la adición de Triton X-100 y se realizó cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976).

En el caso de *L. donovani*, el protocolo fue el mismo pero la porfirina utilizada era MgPPIX medida con citómetro FACScalibur (Beckton-Dickinson, San Jose, CA), excitando con un láser de argón a 488 nm.

2.25.1 Entrada de ZnMP en presencia de distintos compuestos. Los ionóforos FCCP (H^+), Valinomicina (Potasio) y Monensina (Sodio) se añadieron a 10 μM , 200 μM y 50 μM , respectivamente, a la vez que la porfirina, como se describe en (dos Santos, Paes et al. 2009). Los depletores de energía (Oligomicina A (1 μM), KCN (400 μM), Antimicina A (0,5 μM) y Rotenona (10 μM) se añadieron 30 min antes de realizar el ensayo del transporte como se describe en (Silber, Rojas et al. 2006). Los inhibidores de transportadores ABC Ciclosporina A y Verapamilo se añadieron a 10 μM en el momento de realizar el ensayo de captación de porfirinas como se describe en (Lara, Sant'Anna et al. 2007).

2.25.2. Entrada de ZnMP en presencia de distintos iones. Se modificó la composición del medio HPMI glucosa para estudiar el posible efecto que pudieran tener los iones sobre la entrada de hemo.

2.26. Eflujo de porfirinas en las formas promastigotes de *Leishmania major*

Tras realizar el protocolo de incubación con ZnMP (10 μM durante 10 min a 28 °C), los parásitos se lavaron con PBS suplementado con 5 % BSA para eliminar la porfirina adherida a la membrana plasmática. A continuación, se resuspendieron en medio HPMI-glucosa a 28 °C y 4 °C. A cada tiempo analizado se tomó una alícuota, se volvieron a lavar con PBS suplementado con 5 % BSA, y se analizó el contenido intracelular de ZnMP de los parásitos

mediante citometría de flujo y el contenido de ZnMP que quedaba en el medio mediante espectrofluorimetría.

2.27. Infección *in vitro* de macrófagos THP1

La infección de macrófagos THP-1 con *Leishmania major* se llevó a cabo tal y como se describió anteriormente (Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016). Brevemente, los macrófagos THP-1 se infectaron a 35 °C con formas promastigotes en fase estacionaria de las distintas líneas de parásitos en un ratio 1:10. El exceso de parásitos que no había infectado las células era eliminado a las 24 h y los macrófagos se incubaron a los tiempos indicados a 37 °C y en una atmósfera con 5 % CO₂. Las células se fijaron luego y se tiñeron con DAPI y se observaron por microscopía de fluorescencia en campo amplio Olympus IX81. Los parásitos se cuantificaron utilizando el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) tal y como se ha descrito (Cavazzuti, Paglietti et al. 2008).

2.28. Infección *in vivo* de ratones y su análisis

El análisis de la infección *in vivo* se llevó a cabo tal y como se describe en (Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016) con algunas modificaciones. Brevemente, ratones macho de seis semanas de edad (Charles River Breeding Laboratories) se mantuvieron en las instalaciones del Animalario de nuestro Instituto en condiciones libres de patógenos. Los animales (siete por grupo) se infectaron de forma subcutánea en sus patas traseras izquierdas con un millón de promastigotes estacionarios de *Leishmania major* resuspendidos en PBS. La progresión de la enfermedad se determinó por el espesor de la inflamación y el área de la lesión de la almohadilla de la pata infectada usando un calibre Digimatic (Mitutoyo, Japan), y comparando estos valores con los de la pata no infectada.

2.29. Ensayos de precipitación de hemina-agarosa

Los ensayos de precipitación con hemina-agarosa se llevaron a cabo tal y como se describe en (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011), pero solubilizando las proteínas de membrana antes del ensayo de precipitación. Brevemente, 2 mg de proteínas de membrana de parásitos expresando LmFLVCRb-GFP, se obtuvieron como se describe en (Pérez-Victoria, Pérez-Victoria et al. 2011). Las proteínas de membrana se solubilizaron con Triton X-100 al 1 % durante 3 h a 4 °C. Después de la ultracentrifugación, las proteínas solubilizadas se diluyeron 10 veces con tampón de dilución (100 mM KPi pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT and 1 mM PMSF) para disminuir la concentración final de detergente a un 0,1 %. Las alícuotas de hemina

agarosa se equilibraron con tampón de dilución frío que contenía Triton X-100 al 0,1 % e incubadas con 30 µg de proteína solubilizada durante 30 min a 4 °C. Luego, se lavaron cuatro veces con tampón de lavado frío y se eluyeron con 20 µl de tampón Laemmli. La proteína de fusión FLVCRbGFP se detectó por Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal anti GFP. Cuando se indica, diferentes concentraciones de hemina se añadieron durante la incubación de las proteínas solubilizadas con la hemina agarosa.

2.30. Ensayos de actividad catalasa

La actividad de la catalasa se midió tal y como se describe en (Iwase et al, 2013) pero con algunas modificaciones para adaptarlo al uso de levaduras. Brevemente, las levaduras se cultivaron durante 24 h sin ácido δ -aminolevulínico para depletarlas de hemo y luego incubadas durante 16 h en ausencia o presencia de 0,5 µM de hemoglobina ó 2 µM de hemina. Las células se ajustaron a una DO_{600} de 5 en 1 ml de agua, y se les añadió 300 µl de Triton X-100 al 1 % y 300 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %. Las burbujas de oxígeno generadas por la actividad de la enzima catalasa quedan atrapadas por el detergente Triton X-100 y son observadas como espuma, cuya altura es proporcional a la actividad de la enzima.

Este ensayo de actividad catalasa se adaptó a placas de 96 pocillos con un volumen de 100 µl de cultivo para la búsqueda de inhibidores de las proteínas TrypHRG. Se discriminaron estos inhibidores añadiendo a cada pocillo 30 µl de peróxido de hidrógeno y 30 µl de Triton X-100 al 1 %. De esta forma, se visualizó espuma en aquellos pocillos donde no había habido inhibición de las proteínas TrypHRG, y podían identificarse de manera visual los pocillos donde se había añadido un compuesto con actividad inhibitoria.

2.31. Búsqueda de inhibidores de las proteínas TrypHRG

2.31.1. Cultivo de las levaduras en placas de 96 pocillos

El ensayo de los distintos compuestos que forman parte de la librería de reposición y los antioxidantes se realizó en placas de 96 pocillos (Nunc) a una concentración de 20 µM de estos compuestos para el cribado inicial. En cada pocillo se sembró 100 µl de cultivo de levaduras a una DO_{600} de 0.1 utilizando un dispensador Multidrop Combi de Thermo Scientific (MTX Lab Systems, Vienna, VA), y se añadió 1 µl de una solución 2 mM de los compuestos a ensayar.

A las 24 h de cultivo a 28 °C y 180 rpm, se midió la DO a 600 nm en un lector de placas Envision Multilabel Plate Reader, P.E..

2.31.2. Determinación del factor (Z)

El factor Z para cada ensayo se determinó por la siguiente fórmula (Zhang, Chung et al. 1999, González González and Sanz 2013), y se calculó para una concentración de 0,05 μ M de hemoglobina; y para las levaduras transfectadas con pDR-LmHR1, pDR-LdHR1 y pDR-TbHRG.

Siendo σ la desviación típica (σ_{c+} para los controles positivos y σ_{c-} para los controles negativos) y μ la media de los valores (μ_{c+} para los controles positivos y μ_{c-} para los controles negativos).

Se considera un buen ensayo cuando el valor $Z \geq 0,5$ (Zhang, Chung et al. 1999). Para la concentración de hemoglobina de 0,05 μ M el valor de Z era siempre $\geq 0,8$, para los tres tipos de levaduras. Para el ensayo de búsqueda de inhibidores se utilizó, por tanto, esta concentración.

2.31.3. Identificación de posibles candidatos y experimentos de dosis respuesta

Se hizo un primer ensayo con los compuestos de la librería de reposición (Neuron BioPh) y los antioxidantes (cedidos por el Dr. JC Morales) sobre la levadura transfectada con la proteína TbHRG (proteína HRG de *Trypanosoma brucei*).

Tras este primer ensayo, se realizó una selección de aquellos compuestos que habían producido una inhibición en el crecimiento de la levadura y una inhibición de la actividad catalasa. Con ellos se hizo un ensayo de dosis respuesta a 10 concentraciones distintas (factor de dilución 1:2) sobre las levaduras $\Delta hem1$ transfectadas con el plásmido vacío (en presencia de ALA) como control de toxicidad o conteniendo los genes que codificaban para las proteínas HRG de *T. brucei*, *L. major* y *L. donovani* (en presencia de 0.05 μM Hb). De esta forma se seleccionaron aquellos compuestos con actividad específica sobre las proteínas HRG.

El análisis de datos y cálculos de valores de IC₅₀ a partir de los datos brutos del ensayo se realizaron con el programa informático Genedata Screener Software (Genedata AG, Switzerland).

2.31.4. Cálculo de la concentración inhibitoria 50 en *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*

Para conocer la actividad leishmanicida o tripanocida que tenían estos compuestos, se realizaron ensayos de citotoxicidad de estos compuestos sobre estos parásitos, calculando la concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) de cada uno, definida como la concentración de fármaco que inhibe en un 50 % el crecimiento de los parásitos. Para el cálculo de la IC₅₀ se utilizó el programa SigmaPlot. La mayoría de los compuestos seleccionados se compraron y se prepararon a una concentración de 100 mM en DMSO.

2.31.4.1. Ensayos en *Leishmania*: MTT

Este método se utilizó para calcular la concentración inhibitoria en las formas promastigotes de *Leishmania major*.

Este método está basado en la capacidad de las deshidrogenasas de convertir el sustrato bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color púrpura. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas, y se cuantifica espectrofotométricamente tras solubilizar los cristales de formazán con SDS.

III. Materiales y métodos

Para realizar el ensayo, se sembraron 200.000 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 µl de RPMi suplementado al 10 % de SBF, en placa de 96 pocillos, y se incubó durante 72 h a 28 °C en presencia de distintas concentraciones de fármaco, por duplicado. A continuación, se añadieron 10 µl de MTT (preparado a 5 mg/ml en PBS) y se incubó durante 4 h en oscuridad a 28 °C para permitir la formación de los cristales. Finalmente, los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 50 µl de SDS al 20 % e incubando en oscuridad a 37 °C durante 4-16 h. La reducción de MTT se determinó leyendo la DO_{540} en un lector de ELISA.

2.31.4.2. Ensayos en *T. brucei*: Alamar Blue

Esta técnica se ha utilizado en esta tesis para el cálculo de la concentración inhibitoria en las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*.

Este método también se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de reducir la **resazurina** (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide), que es una sonda azul muy poco fluorescente a resorufina, que es de color rosa y fluorescente. La cantidad de resorufina formada es directamente proporcional al número de células y a su viabilidad (López-Martín, Pérez-Victoria et al. 2008).

Para realizar el ensayo, se sembraron 20.000 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 µl de HMI-9 suplementado con 10 % SBF, en placa de 96 pocillos, y se incubó durante 72 h a 37 °C en presencia de distintas concentraciones de fármaco, por duplicado. A continuación, se añadieron 20 µl de la solución de Resazurina (preparado a 0,11 mg/ml) y se incubó de 1 a 4 h en oscuridad a 37 °C para permitir la formación de los cristales. Finalmente, se añaden 50 µl de SDS al 3 % y se lee fluorescencia en un lector de placas Tecan®.

2.32. Ensayos en oocitos

Para los estudios funcionales de transportadores de membrana se utilizó el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis*. Previo a la realización de los experimentos, los oocitos se extrajeron y se seleccionaron para la microinyección del ARNm sintetizado *in vitro* de las proteínas objeto de estudio.

2.32.1. Extracción y selección de los oocitos

Las ranas se anestesiaron por inyección intramuscular de 0,1 ml de una solución de ketamina (Ketolar). El animal se colocó sobre hielo, y se abrió una pequeña incisión de aproximadamente 1 cm en un lateral de la parte inferior del abdomen. Se extrajeron los racimos de oocitos con unas pinzas delgadas, se cortaron y se introdujeron en medio OR-2. Una vez finalizada la extracción, se cerró la incisión del abdomen con sutura continua en la capa muscular y con dos puntos individuales en “U” en la piel.

Para disgregar los oocitos y eliminar la gelatina folicular, se incubaron a temperatura ambiente en una solución de colagenasa disuelta en medio OR- 2 (2 mg/ml). De todos los oocitos extraídos, se seleccionaron aquellos que se encontraron en el estadio 6 de maduración con ausencia de deformaciones, que son los que presentaban una región parda y otra amarillenta bien definidas. Los oocitos sanos seleccionados se incubaron a 18 °C en medio Barth hasta que se realizó la inyección del ARN. La viabilidad de los oocitos se chequeaba mediante el test de formazán.

Figura 10. Extracción de los oocitos de *Xenopus laevis*. Imagen de la rana en el momento de la extracción de los oocitos (izda). Fotografía de los oocitos extraídos tras la disgregación (dcha).

2.32.2. Síntesis del ARNm

Para la síntesis *in vitro* del ARNm de las proteínas LmFLVCRb y LmFLVCRb-GFP se utilizó el kit “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” (Ref: AM1345, Ambion™) partiendo de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1-LmFLVCRb y pcDNA3.1-LmFLVCRb-GFP.

El primer paso para la síntesis *in vitro* del ARNm a partir de ADN plasmídico es la linealización del plásmido recombinante en el extremo 3' de la secuencia codificante. Para la síntesis *in vitro* del ARN mensajero se utilizaron de 0,5 a 1 µg del ADN plasmídico linealizado, reacción llevada a cabo por la ARN polimerasa T7 y donde se transcribe la ORF del gen dando lugar a moléculas de ARNm con 7-metilguanosa en 5'. El kit añade una polimerasa poli (a) de *E. coli* para adicionar una cola de poli (A) haciéndolo más estable y mejorando su tasa de traducción en el oocito. Todo el material utilizado en este apartado estuvo libre de ARNasas.

2.32.3. Microinyección del ARNm en los oocitos

Los oocitos se inyectaron con microcapilares con el volumen necesario para conseguir en el interior del oocito la cantidad deseada de ARN cargado en el microinyector. El volumen de inyección se mantuvo constante entre los distintos grupos de oocitos y se ajustaron las diferencias de volumen con TE libre de ARNasas. Para la expresión del transportador de membrana, cada oocito se inyectó con 9-15 ng del ARNm sintetizado *in vitro*. Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 8, 24 ó 48 h.

2.32.4. Estudio de la localización de la proteína LmFLVCRb-GFP en los oocitos

A las 8, 24 ó 48 h después de inyectar el ARNm de la proteína LmFLVrb-GFP en los oocitos, grupos de tres oocitos se congelaron en medio OCT sobre nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se realizaron cortes de los oocitos de 5 µm en un criostato Leica Microsystems modelo 1900UV a una temperatura entre -20 °C y -15 °C y se colocaron en portaobjetos, que se guardaron a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras se fijaron en metanol frío durante 1 min y tras tres lavados de 15 min con PBS, se montaron para la visualización de la fluorescencia de la GFP en microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duerolab) con una cámara fotográfica y un sistema de análisis de imagen. Se utilizó un filtro de emisión de paso de banda estrecho (450 a 490 nm).

Asimismo, se visualizaron en un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica) perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

2.32.5. Estudios funcionales de los transportadores de membrana de los oocitos

Para el estudio de la proteína LmFLVCRb se utilizó la metodología descrita en (Briz, Serrano et al. 2002). Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 2 días, ya que en los experimentos previos de localización se había comprobado que la expresión de la proteína transportadora a las 48 h era la óptima. Antes de comenzar los experimentos, los oocitos se lavaron 3 veces con solución de captación sin sustrato y se separaron en grupos de 10 oocitos por condición experimental.

A continuación, se incubaron en grupos de 10 oocitos durante el tiempo estipulado, en un baño a 25 °C, con 100 µl de cada una de las soluciones de ensayo con 100 µM de hemina.

III. Materiales y métodos

En todos los casos, un grupo de oocitos no inyectados con el ARNm de LmFLVCRb se incubaron en paralelo y se utilizaron para determinar el transporte inespecífico (no dependiente de LmFLVCRb) del hemo a través de la membrana. La unión inespecífica a la membrana se determinó comparando el hemo de oocitos incubados sin sustrato y un tiempo de 0 min, en el cual se añadía la hemina y acto seguido se paraba la captación.

En los experimentos de eflujo, tras preincubar los oocitos durante 2 h con 100 μ M de hemina para observar la captación, se incubaron a 25 °C durante diferentes tiempos en un medio de captación con sodio, sin sustrato (Blázquez, Briz et al. 2012).

Para parar la captación, los oocitos se lavaron 4 veces sucesivas con solución de captación sin sustrato a 4 °C. Para finalizar se separaron los oocitos y se colocaron individualmente en tubos de plástico de 1,5 ml, retirando cuidadosamente todo el volumen del medio de lavado. Finalmente, se congelaron a -20 °C hasta que se procesaron para el análisis de la captación por HPLC-MS/MS.

La captación neta mediada por los transportadores de carga se calculó como la diferencia del contenido celular de los oocitos que expresaban el transportador menos el contenido encontrado en los oocitos controles (captación inespecífica) al final del período experimental.

2.33. Determinación de hemo por HPLC-MS/MS

Para el análisis de hemo, en el grupo del Dr. José Juan García Marín se puso a punto un método de cromatografía isocrático acoplado a un detector de masas, ambos de Agilent Technologies. El sistema se compone de un HPLC serie 1200 formado por una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (G12354A), un inyector de 20 μ l de capacidad (modelo G1328B) y un detector ultravioleta/visible (G1314B) de longitud de onda variable y programable.

Se utilizó una columna de fase reversa Zorbax C18, 30 mm x 2,1 mm, 3,5 μ m a 35 °C y de fase móvil una mezcla 75:25 metanol/agua (ambos con 5 mM de acetato amónico y 0,1 % ácido fórmico, pH 4,6). El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min.

El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica serie 6000 (G1948B). El sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (HP LP2065) con el software QTOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite el control del HPLC y del detector de masas. La determinación en el triple cuadrupolo se llevó a cabo en ionización positiva, con las siguientes condiciones de trabajo

para la fuente iónica: temperatura del gas (N₂) 350 °C, flujo del gas 8 ml/min, presión del nebulizador 30 psi y voltaje 2500 V.

Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica del ión precursor 616,2 m/z (ión molecular + H⁺) al ión producto 557 y 498 m/z, resultante de la ruptura de la molécula de hemo. Se realizaron rectas patrón con concentraciones de hemo entre 0,15 y 5 µM. El tiempo de retención del compuesto en este sistema fue de 1,05 min.

2.33.1. Procesamiento de los oocitos para medida de hemo por HPLC-MS/MS

A cada oocito se le añadieron 50 µl de una solución de budesonida 10 µM disuelta en agua (que servía como control interno) y se sonicaron en un baño a 4 °C durante 2 min a máxima potencia con un equipo Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona). A continuación se añadieron 150 µl de metanol y se centrifugaron 10 min a 4°C a 20.000 xg. Por último, se recogieron 75 µl del sobrenadante que se preparaban para el análisis en el HPLC-MS/MS.

En todo momento los oocitos se mantuvieron protegidos de la luz para evitar la posible degradación del hemo a cuantificar.

2.33.2. Procesamiento de los parásitos para medida de hemo por HPLC-MS/MS

A cada muestra de parásitos ya tratada se le añadieron 50 µl de una solución de budesonida 10 µM disuelta en agua (que servía como control interno) y se sonicaron en un baño a 4°C durante 2 min a máxima potencia por tres veces con un equipo Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona). A continuación se añadieron 150 µl de metanol y se centrifugaron 10 min a 4°C a 20.000 xg. Por último, se recogían 75 µl del sobrenadante que se preparaban para el análisis en el HPLC-MS/MS.

Como se hizo en el caso de los oocitos, en todo momento los parásitos se mantuvieron protegidos de la luz para evitar la posible degradación del hemo a determinar.

2.34. Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron al menos dos veces y siempre en duplicado. Todos los datos son presentados como la media y el error representa el S.E.M..

Tras realizar un ANOVA, se determinó el valor de las diferencias estadísticas mediante el t-test de Student y se consideraron significativas para un p<0,05.



Los resultados de este Capítulo relativos a la caracterización de la captación de hemo en *L. donovani* aparecen en el artículo **“A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in Leishmania”**, publicado en la revista *Molecular Microbiology*, Enero 2011 (Anexo 1)

Los resultados relativos a *L. major* forman parte del manuscrito en preparación **“Insights into the mechanism of heme uptake in Leishmania major”**, Cabello-Donayre M., et al.

IV. Resultados y discusión

Capítulo 1: Caracterización de la entrada de porfirinas en *Leishmania* spp.

Como se ha dicho anteriormente, *in vitro*, las formas promastigotes de *Leishmania* spp. son capaces de tomar el hemo del medio en forma de hemoglobina o como hemo. La hemoglobina entra por endocitosis mediada por un receptor ya identificado mientras que, cuando se comenzó el trabajo, no se conocía cómo se captaba el hemo libre.

El primer objetivo de este trabajo fue, por tanto, caracterizar la entrada de hemo en los organismos del género *Leishmania*. En el hospedador mamífero, la disponibilidad del hemo para los parásitos puede ser muy diferente en función del órgano en el que se encuentren los macrófagos infectados. Por ejemplo, los órganos afectados en la leishmaniasis visceral, como el bazo o el hígado, desempeñan un papel importante en la eritrofagocitosis, que no tiene esa relevancia en la dermis afectada en la leishmaniasis cutánea. Por tanto, se estudió la entrada de porfirinas en *L. donovani*, como modelo de parásito que produce leishmaniasis visceral y *L. major*, como modelo de parásito que provoca leishmaniasis cutánea.

RESULTADOS

1. Caracterización de la entrada de hemo en las formas promastigotes de *Leishmania donovani*

1.1. Búsqueda de análogos fluorescentes del hemo y la hemoglobina

Para estudiar la captación de porfirinas decidimos utilizar análogos fluorescentes del hemo y de la hemoglobina. Como análogo del hemo (FePPIX) se utilizó una porfirina fluorescente en la que el átomo de hierro que coordina a los pirroles es sustituido por otro metal como el Mg (MgPPIX) (Fig. 1a). Como análogo de la hemoglobina se utilizó una hemoglobina fluorescente formada por sustitución de la molécula de hemo por una molécula de porfirina fluorescente (MgPPIX-ApoHb) (Fig. 1b).

IV. Resultados y discusión

La entrada de estos compuestos al parásito se analizó por citometría de flujo usando un citómetro analizador FACScalibur (laser de excitación de 488 nm), tras eliminar la sonda que no se internaliza pero se asocia al exterior del parásito, como se indica en materiales y métodos.

Para comprobar si estas sondas fluorescentes podían ser usadas como moléculas modelo para el estudio de los mecanismos de transporte de hemo y hemoglobina realizamos los estudios de inhibición de captación.

La figura 2 muestra que la entrada de porfirina fluorescente al parásito era inhibida por concentraciones crecientes de hemina, lo que sugería que ambas metaloporfirinas competían por el mismo transportador y que la sonda elegida era apropiada para el estudio de la caracterización de la entrada del hemo. De igual forma, la parte derecha de la figura 2 muestra que la acumulación de MgPPIX-ApoHb era inhibida por una concentración elevada de Hb, por lo que consideramos que MgPPIX-ApoHb era un análogo adecuado para los estudios de transporte de hemoglobina.

1.2. Caracterización cinética de la entrada de porfirinas fluorescentes en las formas promastigotes de *L. donovani*

Para caracterizar la cinética de captación de porfirinas en *L. donovani* se estableció una concentración de sustrato de 250 μM , que era saturante de acuerdo con nuestros estudios preliminares. Se trabajó con estas condiciones para que la concentración de sustrato, que va variando a lo largo del tiempo en un proceso de transporte, no influya en su cinética. Como MgPPIX era tóxica a esta concentración (datos no mostrados), obtuvimos 250 μM de porfirinas utilizando 75 μM de MgPPIX + 175 μM de hemina. Usando la sonda Sytox Green, que marca los parásitos muertos, confirmamos que la viabilidad de los parásitos en estas condiciones era mayor del 95 % (datos no mostrados).

En primer lugar, se monitorizó la entrada de porfirina a lo largo del tiempo a 28 °C y 4 °C. Como se observa en la figura 3, la entrada de porfirinas era dependiente de temperatura y aumentaba con el tiempo (Fig. 3a), siendo lineal durante los cinco primeros minutos ($R^2=0,995$) (Fig. 3b). Basándonos en estos resultados, se midió la velocidad inicial (V_0) para los estudios cinéticos tras incubar los parásitos durante 120 s con la porfirina fluorescente, por lo que los cambios que se producen en la concentración de sustrato se limitan a un pequeño

IV. Resultados y discusión

porcentaje y se puede considerar que su concentración permanece constante (Nelson, Lehninger et al. 2008).

Para calcular los parámetros cinéticos del transporte de porfirinas, medimos la velocidad inicial de su entrada en función de la concentración de sustrato en el medio extracelular.

Como muestra la figura 4a, a 28 °C se observó que la entrada de porfirinas se saturaba al aumentar la concentración de sustrato, ajustándose a una función hiperbólica clásica de Michaelis-Menten ($R^2=0,988$). Cuando el ensayo se llevó a cabo a 4 °C, donde los fenómenos de transporte están muy ralentizados como habíamos comprobado (Fig. 3a), también se obtuvo una curva de saturación ($R^2=0,986$), pero cuyos parámetros cinéticos mostraban una velocidad inicial muy inferior. Consideramos que este componente incluye tanto la unión inespecífica como un mínimo transporte mediado. Por ello, para calcular la captación neta o sensible a la temperatura se calculó la diferencia de captación a cada concentración de sustrato para ambas temperaturas.

En la figura 4b se muestra la representación de Lineweaver-Burk del transporte neto de porfirinas ($R^2=0,990$), lo que permitió calcular la K_m aparente para la entrada de porfirinas que dio un valor de $9,5 \pm 4,4 \mu\text{M}$.

Para dilucidar si el hemo y la hemoglobina comparten la misma ruta de entrada a la célula, se estudió la cinética de entrada de hemoglobina. Se eligió una concentración saturante de hemoglobina de 1 mg/ml (0,3 mg/ml de MgPPIX-ApoHb + 0,7 mg/ml de Hb), en base a los valores de Km para períodos largos de incubación encontrados en la literatura (Sengupta, Tripathi et al. 1999). Así mismo se comprobó que en estas condiciones de ensayo los parásitos eran viables (datos no mostrados).

Como muestra la figura 5 la entrada de hemoglobina era también lineal durante los primeros cinco minutos en nuestras condiciones de ensayo ($R^2=0,980$). Además, se observó que la entrada de MgPPIX era más rápida que la entrada de MgPPIX-ApoHb, lo que sugería que seguían rutas distintas.

Todos estos datos indican que la entrada de porfirinas en *L. donovani* es mediada por una proteína.

2. Caracterización de la entrada de porfirinas en las formas promastigotes de *Leishmania major*

2.1. Análogos fluorescentes del hemo

En este apartado la sonda fluorescente utilizada fue ZnMP, que se ha validado en estudios de entrada de hemo en células intestinales y hepáticas (Worthington, Cohn et al. 2001). Esta sonda presenta algunas ventajas respecto a la sonda utilizada anteriormente (MgPPIX), como por ejemplo un aumento de su estabilidad (Worthington, Cohn et al. 2001). Además, se utilizó un citómetro de flujo FACSSerialIII con el que se pudo realizar la excitación a 405 nm, mucho más eficaz para las porfirinas que la excitación a 488 nm llevada a cabo en el apartado anterior. Lo primero que se comprobó fue que, como pasaba en *L. donovani*, la entrada de la sonda utilizada (ZnMP) era inhibida por concentraciones crecientes de hemina (Fig. 6), lo que indicaba que tanto la sonda como el hemo utilizaban el mismo transportador, validando el uso de la misma para estos experimentos.

2.2. Caracterización cinética de la entrada de porfirinas fluorescentes en las formas promastigotes de *L. major*

Para evaluar la progresión en el tiempo de la captación de porfirinas en *L. major*, se estableció una concentración de porfirinas de 200 μM , que es una concentración 20 veces mayor a la K_m establecida previamente para *L. donovani*. Para evitar la toxicidad de la ZnPPiX a esa concentración, como en el caso anterior obtuvimos 200 μM de porfirinas utilizando 50 μM de ZnPPiX + 150 μM de hemina. En estas condiciones, más del 95 % de los parásitos permanecen viables (datos no mostrados usando Sytox Green).

Utilizando esta concentración saturante de sustrato se monitorizó la entrada de porfirina a lo largo del tiempo a 28 °C y a 4 °C. Como se observa en la figura 7, la entrada de porfirinas aumentaba con el tiempo.

Posteriormente, se midió la velocidad inicial como una función de diferentes concentraciones de ZnMP a 28 °C y a 4 °C, tal y como habíamos hecho para las formas promastigotes de *L. donovani*.

La figura 8a muestra una entrada saturante de porfirinas a 28 °C, que se ajustaba a una función hiperbólica clásica de Michaelis-Menten ($R^2=0,978$). Como ocurría en el caso de *L. donovani*, cuando el ensayo se llevaba a cabo a 4 °C también se obtenía una curva de

IV. Resultados y discusión

saturación ($R^2=0,977$), debido probablemente a la combinación de unión específica de la porfirina a su transportador y a un ralentizado componente de transporte. En la figura 8b se muestra la representación de Lineweaver-Burk del transporte neto de porfirinas ($R^2=0,984$), obtenido por la diferencia de los datos obtenidos a ambas temperaturas, lo que permitía el cálculo de la K_m aparente para la entrada de porfirinas ($1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

Los resultados anteriores muestran que la entrada de porfirinas en *L. major* también se satura al aumentar la concentración de sustrato (Figs. 3 y 7) y es dependiente de temperatura (Fig. 8). Esto indica que el proceso es mediado por una proteína, como ocurre en *L. donovani* y probablemente en el resto de especies de *Leishmania*.

2.3. Efecto del pH extracelular en la incorporación de porfirinas en formas promastigotes de *L. major*

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* se desarrolla en ambientes con valores de pH muy diferentes. Además, este parámetro afecta a la unión del hemo al parásito (Galbraith and McElrath 1988) . Por lo tanto, aunque por razones metodológicas no podíamos trabajar con amastigotes, quisimos evaluar el efecto del pH extracelular en la entrada de porfirinas. Durante la puesta a punto del ensayo observamos que el pH del medio alteraba la fluorescencia de la sonda ZnMP, tal y como se observa en la figura 9. Por ello, en aquellos ensayos que implicaban un cambio de pH realizamos la cuantificación de ZnMP por

espectrofluorimetría en lugar de por citometría de flujo, tras lisar los parásitos y unificar el pH de las distintas muestras.

pH. A pH básico aumenta la fluorescencia de ca el medio. El espectro de emisión se obtuvo distintos pH.

El efecto del pH extracelular sobre la captación de porfirinas se evaluó utilizando distintos tampones fosfato en un rango de pH entre 5,8 y 9,2. Como se observa en la figura 10, la entrada de porfirinas en este organismo era dependiente de pH, siendo más eficaz a valores de pH entre un rango de 6-7 y disminuyendo considerablemente a pH básicos.

Para conocer si la dependencia del pH en este transporte (Fig. 10) era debida a la participación de los H^+ como fuerza impulsora del transporte, se midió el transporte de porfirinas en presencia del ionóforo de H^+ FCCP, que disipa el gradiente de protones de la membrana plasmática. En la figura 11 se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas cuando la captación de porfirinas tiene lugar en presencia de FCCP.

2.4. Efecto de diferentes iones en la entrada de porfirinas

A continuación y con objeto obtener más información sobre la fuerza motriz que permite el transporte de porfirinas a través de la membrana plasmática del parásito, se estudió la influencia de los iones monovalentes sodio y potasio en este proceso.

Para ello, en primer lugar se cuantificó la entrada de ZnMP en presencia de ionóforos de potasio (Valinomicina) y sodio (Monensina). Como se observa en la figura 12, la entrada de porfirinas disminuye un 40 % cuando se reduce el gradiente de los iones potasio y sodio ($p=0,0149$ para Valinomicina y $p=0,026$ para Monensina).

Posteriormente, se estudió la entrada de ZnMP en las formas promastigotes de *L. major* depletando el tampón del ensayo de los iones Na^+ y/o K^+ . El medio utilizado fue el mismo que en el resto de los ensayos y las modificaciones que sobre él se realizaron aparecen indicadas bajo la gráfica de la figura 13.

La cuantificación de porfirinas en este ensayo se realizó de dos formas distintas. En primer lugar se utilizó ZnMP como análogo fluorescente del hemo, y la cuantificación se realizó por espectrofluorimetría, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Por otro lado, se utilizó hemina cuantificándose por HPLC-MS/MS (también descrito en materiales y métodos), en colaboración con el Dr. José Juan García Marín y la Dra. Elisa Herráez Aguilar (Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca).

El protocolo de incubación era el mismo en ambos casos y las concentraciones de ZnMP y hemo eran equivalentes ($10 \mu\text{M}$).

En ambos casos, los resultados fueron similares, y en concordancia con los resultados obtenidos al utilizar los ionóforos. Cuando los iones monovalentes sodio y potasio se eliminaban (juntos o por separado) del tampón de ensayo, la captación de porfirinas por parte de los parásitos disminuía en un 60-80 %. Para evitar la posible influencia en este proceso de transporte de la bajada en la fuerza iónica al eliminar los iones, ésta se mantuvo constante

(135,5 mM de iones monovalentes o de colina) durante el ensayo (Paes, Gálvez Rojas et al. 2008, dos Santos, Paes et al. 2009).

2.5. Efecto de la depleción de energía

Para estudiar si el transporte de hemo era dependiente de energía, se midió este transporte en presencia de distintos depletores de energía. Estos depletores se añadieron 30 min antes de realizar el ensayo del transporte, en las condiciones descritas en (Silber, Rojas et al. 2006).

Los depletores de energía ensayados fueron:

- a) Inhibidores de la cadena respiratoria (RKA: rotenona/KCN/antimicina A).
- b) Inhibidor de la ATPsintasa FoF1: oligomicina A

En la figura 14 se observa que la bajada de los niveles de ATP intracelulares debido a la preincubación de los promastigotes con los inhibidores de la cadena respiratoria (Rotenona, KCN y Antimicina A) o con el Inhibidor de la ATPsintasa FoF₁ (Oligomicina A) disminuía significativamente la entrada de hemo en esos parásitos.

2.6. Efecto de los inhibidores de los transportadores ABC

En *Trypanosoma cruzi* se ha descrito que la entrada de porfirinas se inhibe en presencia de los inhibidores de proteínas ABC (Cupello, Souza et al. 2011), por lo que se ha sugerido que este tipo de proteínas podrían ser las responsables de la entrada de hemo al parásito. Por lo tanto, se estudió si las proteínas ABC eran las responsables de este transporte en este organismo.

Para ello se midió la entrada de ZnMP en presencia de Ciclosporina A y Verapamilo, que se han estudiado como inhibidores de las proteínas ABC (Lara, Sant'Anna et al. 2007). En este caso, y al contrario de lo descrito para *T. cruzi* (Cupello, Souza et al. 2011), estos compuestos no afectaron significativamente a la entrada de porfirinas al parásito.

2.7. Efecto de la privación del hemo en la entrada de porfirinas

Los resultados obtenidos hasta ahora mostraban que la entrada de hemo era un proceso activo mediado por una proteína que funciona probablemente como transportador más que como receptor para la activación de endocitosis dependiente de ligando.

Para ver si la expresión de este posible transportador se modulaba en función de la disponibilidad de hemo, se estudió la entrada de porfirinas en parásitos crecidos en presencia de distintas concentraciones de hemo.

Por un lado, se comparó la entrada de hemo en parásitos crecidos en su medio habitual (RPMi modificado suplementado con un 10 % de SBF inactivado) con la medida en parásitos crecidos en este mismo medio con un aporte extra de hemo (10 μ M de hemina ó 2,5 μ M de hemoglobina, equivalente a 10 μ M de hemo). Tras incubar los parásitos en estas condiciones durante 24 horas se estudió la captación de porfirina fluorescente en medio HPMI glucosa (sin hemina ni hemoglobina) por citometría de flujo, como se describe anteriormente. Como se observa en la figura 16, el crecimiento de los parásitos en presencia de un aporte extra de hemo o hemoglobina disminuyó en un 40 % su capacidad de captar porfirinas.

Por otro lado, se comparó la entrada de porfirinas en estos parásitos crecidos en su medio de cultivo habitual con la observada en parásitos crecidos en un medio de cultivo sin

hemo. Para ello se sustituyó el SBF habitual por un SBF depletado de hemo (SBFf), cuya obtención se detalla en el apartado de materiales y métodos. Este medio depletado de hemo se complementó, o no, con hemina (10 μM) o hemoglobina (2,5 μM). En todas estas condiciones, los parásitos son capaces de crecer durante un pase, pero sólo lo hacen de forma continuada en SBFf cuando el cultivo se suplementa con hemina o hemoglobina (Fig. 7 del apartado de materiales y métodos).

Tras incubar los parásitos en estas condiciones durante 24 horas y lavarlos para eliminar las porfirinas del medio, se estudió la captación de porfirina fluorescente en medio HPMI glucosa por citometría de flujo, como se describe anteriormente.

Como se observa en la figura 16, la depleción de hemo aumentó un 60 % la capacidad de captación de porfirinas del parásito, (comparándolo con parásitos crecidos en presencia de SBF sin depletar de hemo). Cuando los parásitos incubados en presencia de suero depletado de hemo se suplementaron con hemina o hemoglobina, la capacidad de captar porfirinas disminuyó en más de un 60 % (Fig. 16).

Podemos concluir, por tanto, que la proteína responsable de la entrada de porfirinas se induce en ausencia de hemo.

3. Caracterización del eflujo de porfirinas en las formas promastigotes de *L. major*

A pesar del requerimiento celular de porfirinas, estas moléculas también pueden ser tóxicas para la célula por lo que sus niveles intracelulares deben ser finamente regulados. Para evitar el daño que su acumulación pueda causar en el interior celular se conocen diversos mecanismos de detoxificación en células de mamífero. Así, la enzima hemo oxigenasa (HO) cataliza la conversión del grupo hemo en biliverdina, Fe^{2+} y monóxido de carbono. Después, la biliverdina es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa. Además, se conocen transportadores que expulsan porfirinas fuera de la célula en otros organismos (Krishnamurthy, Ross et al. 2004, Quigley, Yang et al. 2004, Yang, Philips et al. 2010).

Las especies del género *Leishmania* parecen no tener la enzima hemo oxigenasa lo que podría acentuar la importancia de mantener un equilibrio entre su entrada y su salida para evitar la acumulación de porfirinas tóxicas en el interior celular. Por ello estudiamos si existía un eflujo de porfirinas en los promastigotes de *L. major*. Para ello, una vez realizado el protocolo habitual de incubación de los parásitos con la sonda y tras lavarlos para eliminar toda la porfirina extracelular, los parásitos se incubaron en ausencia de sonda a 28 °C y a 4 °C. A los tiempos indicados, se midió la porfirina intracelular por citometría de flujo (Fig. 17a) y la porfirina extracelular por espectrofluorimetría (Fig. 17b). Como se observa en la figura 19, se observó un rápido eflujo de porfirina sólo a 28 °C, lo que podría indicar que es un proceso activo.

Finalmente, estudiamos el eflujo de porfirinas en presencia de altas concentraciones de hemo extracelular. Para ello, los parásitos se incubaron con la sonda siguiendo el protocolo habitual, y tras lavarlos se incubaron a 28 °C durante 10 min en presencia de distintas concentraciones de hemina, analizándose la porfirina intracelular restante mediante citometría de flujo. La figura 18 muestra que el eflujo (0 μ M hemina) es independiente de la presencia de hemina (50-500 μ M) en el espacio extracelular. Por lo tanto, el mecanismo responsable del eflujo de porfirinas no es inhibido por el hemo exógeno y se produce eficazmente en contra de un gradiente de concentración de porfirinas.

DISCUSIÓN

La auxotrofia para el hemo es un talón de Aquiles de *Leishmania*

Una forma racional de buscar nuevos fármacos frente a las enfermedades protozoarias consiste en explotar las diferencias bioquímicas entre el parásito y el hospedador humano, y una de estas diferencias en los parásitos tripanosomátidos es su incapacidad para sintetizar hemo.

La secuenciación del genoma de los parásitos tripanosomátidos mostró que, tal y como se esperaba por su auxotrofia del hemo, estos organismos han perdido la mayoría de los enzimas involucrados en la ruta de biosíntesis del hemo (Dutta, Furuyama et al. 2008, Aslett, Aurrecochea et al. 2010). Un talón de Aquiles de estos parásitos tripanosomátidos puede ser, por tanto, su absoluta dependencia del hemo (Lwoff 1933, Kelly, Ignatushchenko et al. 2003) y las proteínas involucradas en la adquisición del hemo procedente del hospedador podrían constituir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades producidas por estos parásitos .

El hemo procedente del hospedador debe atravesar en primer lugar la membrana plasmática del parásito para acceder a su interior, y una vez allí deberá entrar en otros compartimentos celulares donde se requiere, como la mitocondria. La proteína responsable de la entrada de hemo presentaría ventajas como diana terapéutica en comparación con los transportadores intracelulares. El hecho de que se localice en la membrana plasmática implica una mayor accesibilidad del fármaco a la proteína sin necesidad de atravesar otras membranas del parásito.

Entrada del grupo hemo en *Leishmania* spp.

Las formas promastigotes de *Leishmania* spp. pueden usar, *in vitro*, el hemo procedente indistintamente de dos fuentes: hemo libre en forma de hemina, y hemo unido a la hemoglobina (Chang and Chang 1985, Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011).

La hemoglobina se capta por endocitosis dependiente de clatrina (Agarwal, Rastogi et al. 2013), mediada por un receptor que es una hexoquinasa localizada en el bolsillo flagelar (Krishnamurthy, Vikram et al. 2005). En el proceso de rescate del hemo proveniente de la

hemoglobina también participan otras proteínas como Rab5 (Singh, Tandon et al. 2003), Rab7 (Singh, Tandon et al. 2003, Patel, Singh et al. 2008), LABCG5 (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011) y LHR1 (resultados presentados en este trabajo).

Respecto a la entrada de hemo libre, aunque en un primer momento se sugirió que el hemo podría difundir a través de la membrana del parásito (Patel, Singh et al. 2008), las cadenas laterales carboxiladas que posee la molécula impiden este movimiento (Krishnamurthy, Xie et al. 2007). Por ello, la molécula de hemo necesita de un mecanismo de transporte activo para ser incorporada al interior celular.

Cuando se empezó este trabajo sólo se conocía que el hemo podía unirse a la superficie de las formas promastigotes de *L. mexicana amazonensis* (Galbraith and McElrath 1988), y amastigotes de *Leishmania infantum* (Carvalho, Cruz et al. 2009) a través de un ligando de alta afinidad ($K_d=0,03-0,05$ nM), que no une hemoglobina (Carvalho, Cruz et al. 2009). Además, los importadores de hemo descritos, como CaFLC1 en *Candida albicans* (Protchenko, Rodríguez-Suárez et al. 2006), PUG1 en *S. cerevisiae* (Protchenko, Shakoury-Elizeh et al. 2008) o HCP1 a nivel intestinal en mamíferos (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005), no presentaban homólogos en los tripanosomátidos.

Se estudió la entrada del hemo en *L. donovani*, como modelo de parásito causante de leishmaniasis visceral, y en *L. major*, como modelo de parásito para la leishmaniasis cutánea, ya que la eficiencia de la captación de hemo puede variar entre las distintas especies del género *Leishmania* (Huynh, Yuan et al. 2012). Las especies responsables de la leishmaniasis visceral infectan bazo, hígado y médula ósea (Carvalho, Cruz et al. 2009), cuyos macrófagos llevan a cabo una fagocitosis muy activa de las células rojas senescentes. De esta forma la fuente y los niveles de hemo a este nivel pueden ser muy diferentes a los que encontramos en los macrófagos de la dermis donde se replican las especies *Leishmania* que producen leishmaniasis cutánea (Ganz 2012, McCall, Zhang et al. 2013). Esto sugiere la posible existencia de adaptaciones específicas en la regulación de la absorción del hemo.

Para el estudio del mecanismo de captación del hemo libre hemos utilizado análogos fluorescentes del hemo, como MgPPIX y ZnMP (Figs. 2 y 6), donde el átomo de hierro es sustituido por un átomo de otro metal. Estos compuestos se han utilizado para numerosos estudios de caracterización de la entrada del grupo hemo en células intestinales y hepatocitos (Worthington, Cohn et al. 2001) y también para *Trypanosoma cruzi* (Worthington,

IV. Resultados y discusión

Cohn et al. 2001, Lara, Sant'Anna et al. 2007) y los hemos validado en el caso de *Leishmania* (Figs. 2 y 6). También hemos utilizado y validado ApoHb-MgPPIX como análogo fluorescente de la hemoglobina (Fig. 2).

Utilizando estos análogos, mostramos en este trabajo que la entrada de hemo en promastigotes de *Leishmania* es más rápida que la entrada de hemoglobina, por lo que el mecanismo de captación de ambos compuestos debe de ser distinto (Fig. 5). Esto está en concordancia con los resultados presentados por Sengupta et al., que describieron que la entrada de la hemoglobina no es inhibida por el hemo (Sengupta, Tripathi et al. 1999) y por la ausencia de competición por parte de la hemoglobina en la unión de hemo a la superficie de las formas amastigotes de *Leishmania* (Carvalho, Cruz et al. 2009). Todo esto sugiere que la entrada de hemo en los promastigotes de *Leishmania* no es por endocitosis, de forma semejante a lo descrito para *T. cruzi* (Lara, Sant'Anna et al. 2007). Además, nuestros resultados mostraron que la captación de porfirinas por *Leishmania* spp. es un proceso dependiente de temperatura y saturable por concentraciones crecientes de sustrato, indicando que probablemente está mediado por un transportador específico y dependiente de temperatura. (Figs. 3, 4, 7 y 8).

Por otra parte, la caracterización cinética del transporte de porfirinas en *L. donovani* y *L. major* mostró diferencias significativas en la afinidad del posible transportador por el sustrato, ya que *L. major* la K_m aparente era casi un orden de magnitud menor que para *L. donovani* (1,0 μM vs 9,5 μM , respectivamente, Fig. 8). Como se mencionó anteriormente, las especies cutáneas como *L. major* podrían tener menos acceso al hemo que las especies que causan leishmaniasis visceral, como *L. donovani*, por lo que podrían requerir una mayor capacidad de captación de porfirinas. El hecho de que para *L. major* el valor de la k_m aparente sea menor indica una mayor afinidad de los sistema de captación del parásito por el hemo. Esto no puede ser originado por un mayor número de moléculas de transportador en la membrana plasmática, lo que afectaría a la velocidad máxima, sino más probablemente a diferencias en la afinidad promedio por el hemo de los transportadores ortólogos que intervienen en cada especie.

Aunque estos ensayos los hemos llevado a cabo en la forma promastigote del parásito, que se desarrolla en un ambiente de pH cercano al neutro, es importante tener en cuenta que las formas amastigotas intracelulares viven en la vacuola parasitófora, de marcado carácter ácido (Opperdoes and Coombs 2007). Por lo tanto, quisimos estudiar el

efecto del pH extracelular en la captación de porfirinas, observándose que los valores de pH a los que presenta una mayor actividad son valores ácidos, por debajo de 7 (Fig. 10). Estos resultados concuerdan con el aumento de hasta 5 veces en la afinidad del hemo por el parásito cuando el pH se disminuía a valores de pH 5,4 (Galbraith and McElrath 1988).

Este incremento a pH ácido de la captación de porfirinas y de la afinidad por el hemo sugiere que el transporte de hemo a través de la membrana plasmática es más eficaz para las formas amastigotas intracelulares. Tras la ingesta de sangre por parte de los flebotomos, las formas promastigotes que colonizan su intestino tienen un mayor acceso a la hemoglobina, mientras que en el interior de la vacuola parasitófora podría haber más hemo libre disponible debido a la digestión de las hemoproteínas que tiene lugar en este compartimento ácido (Kelly, Ignatushchenko et al. 2003). Además, a este nivel los amastigotes son capaces también de captar porfirinas sintetizadas por el macrófago (Carvalho, Cruz et al. 2009). Por tanto, se podría esperar que la fuente de hemo preferente sea diferente en función del estadio celular.

La influencia del pH en la captación de porfirinas, de carga negativa, podría deberse a que ésta se produzca por un cotransporte con protones, de carga positiva, como fuerza motriz del proceso. Sin embargo, el ionóforo de protones FCCP, que disipa el potencial de H^+ de la membrana plasmática, no afecta significativamente a la captación de porfirinas (Fig. 11). Una posible explicación alternativa sería que el nivel de protonación del transportador, que se modifica con el pH, afectara a su interacción con el hemo (como sugiere el aumento de la interacción del hemo con el parásito a pH ácido (Galbraith and McElrath 1988) o al propio proceso de transporte de porfirinas.

Para confirmar que la captación de porfirinas era un proceso activo, estudiamos a continuación el efecto de distintos depletores de energía. Los resultados mostraron que la disminución de los niveles de ATP producida por la preincubación de los parásitos con inhibidores de la cadena respiratoria (rotenona, KCN y antimicina A) o de la ATPsintasa FoF1 (oligomicina A), inhibía significativamente la captación de porfirinas (Fig. 14). Este resultado sugería que la captación de porfirinas se llevaba a cabo efectivamente por un proceso de transporte activo, como cabía esperar por la presencia de los carboxilatos en la molécula de porfirina, como se ha indicado anteriormente. Este transporte activo de porfirinas podría ser primario, es decir, acoplado directamente a la hidrólisis de ATP, o secundario, si se acoplara al transporte a favor de gradiente de otro sustrato, ya sea como en la misma dirección

IV. Resultados y discusión

(simporte) o en dirección opuesta (antiporte). El gradiente del sustrato cotransportado sí se generaría con gasto de energía (Nelson, Lehninger et al. 2008).

Un ejemplo de transporte activo primario es el que llevan a cabo los transportadores ABC, y en *T. cruzi* se había sugerido que la captación de hemo se lleva a cabo a través de este tipo de transportadores, ya que el proceso se impedía en presencia de inhibidores clásicos de transportadores ABC como la ciclosporina A y el verapamilo. Aunque no se conocen muchos transportadores ABC eucariotas que funcionen como importadores, sí se han descrito transportadores ABC implicados en la entrada de hemo en bacterias (Choby and Skaar 2016). Además, en eucariotas también se han descrito transportadores ABC implicados en tráfico de porfirinas: ABCG2 (Krishnamurthy and Schuetz 2005, Krishnamurthy, Xie et al. 2007) y ABCB6 (Krishnamurthy, Du et al. 2006, Kiss, Brozik et al. 2012) en mamíferos, aunque como exportadores, y LABCG5 (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011) en *Leishmania*. Sin embargo, en *Leishmania* estos inhibidores no afectan a la captación de porfirinas (Fig. 15), por lo que probablemente este proceso no involucre a transportadores ABC que funcionen como importadores.

Para seguir buscando la fuerza motriz que dirige el proceso de transporte de hemo en el parásito, estudiamos a continuación el efecto de los iones Na^+ y K^+ . En primer lugar, los ensayos llevados a cabo en presencia de los ionóforos de sodio y potasio (Monensina y Valinomicina) mostraron la importancia del gradiente establecido de estos iones monovalentes a ambos lados de la membrana para el proceso de transporte de porfirinas (Fig. 12). Este resultado se confirmó llevando a cabo el ensayo de transporte en ausencia de iones sodio y potasio (y presencia de colina para mantener la fuerza iónica (Paes, Gálvez Rojas et al. 2008, dos Santos, Paes et al. 2009)). Como en el caso de los ionóforos de Na^+ y K^+ , la eliminación de estos iones monovalentes del tampón de ensayo inhibía significativamente la entrada de porfirinas al parásito (Fig. 13). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la captación de porfirinas por *Leishmania* se lleva a cabo por un proceso de transporte mediado que requiere la presencia de Na^+ o K^+ , ya sea por tratarse de un transporte activo secundario o de un transporte pasivo que requiere la presencia de uno de estos iones para estabilizar al transportador o la interacción del sustrato con el sitio de unión.

En el transcurso de este trabajo, el laboratorio de Norma Andrews de la Universidad de Maryland identificó a LHR1 como la posible proteína responsable de la entrada de hemo en *L. amazonensis* aunque, como se verá más adelante, hemos demostrado que LHR1 tiene un

papel esencial a nivel intracelular, en el rescate del hemo procedente de la hemoglobina endocitada. No se conoce la fuerza motriz que dirige el transporte de porfirinas mediado por LHR1. También nosotros hemos demostrado un papel del transportador LmFLVCRb en la captación de porfirinas en *Leishmania*, como se verá en el Capítulo 3. En este caso, sí hemos demostrado la influencia de iones monovalentes en el transporte de hemo mediado por LmFLVCRb (Fig. 19, Capítulo 3).

Para finalizar con este primer apartado de caracterización de la captación de porfirinas en estos organismos, se estudió si existía un mecanismo de salida de estos compuestos. Aunque pueda parecer paradójico dado los requerimientos de hemo en estos organismos, niveles excesivos de porfirinas pueden ser tóxicos para el parásito, por lo que debe existir un equilibrio entre su entrada y su salida para evitar su excesiva acumulación en el interior celular.

Nuestros resultados mostraron que existía un eflujo muy eficaz de las porfirinas a través de la membrana plasmática. Este eflujo era dependiente de temperatura, ya que se anulaba completamente a 4 °C (Fig. 17) y se producía en contra de un gradiente de concentración, ya que no se inhibía por la presencia de altas concentraciones de hemina en el medio de ensayo (Fig. 18). Todo esto indica que el eflujo es un proceso activo, probablemente dependiente de un transportador, aunque tampoco podemos descartar un papel de la exocitosis. En el caso de ser un transportador el responsable del eflujo, proteínas candidatas para esta función podrían ser miembros de la familia ABC (Krishnamurthy and Schuetz 2005, Krishnamurthy, Du et al. 2006, Krishnamurthy, Xie et al. 2007, Kiss, Brozik et al. 2012) o de la familia FLVCR (Quigley, Yang et al. 2004), que han demostrado llevar a cabo este papel en células eucariotas. Sin embargo, la ausencia de efecto de los inhibidores clásicos de los transportadores ABC sobre la entrada neta de porfirinas en el parásito sugiere que esta familia de proteínas podría no estar implicada en este proceso (Fig. 15).

Este eflujo cobra especial importancia en un organismo como *Leishmania* que carece de la enzima hemo oxigenasa (Aslett, Aurrecoechea et al. 2010) y que, por tanto, sólo dispone de este mecanismo de detoxicación para evitar la acumulación de porfirinas tóxicas en el interior celular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a pesar de no haber sido descrita esta enzima en el genoma de *Leishmania*, se ha sugerido la presencia de actividad HO en *L. donovani* (Srivastava, Sharma et al. 1997) y otros organismos tripanosomátidos como *T. cruzi*

IV. Resultados y discusión

(Cupello, Souza et al. 2014). De ser así, los mecanismos de detoxificación del hemo implicarían, además del eflujo descrito, una ruta activa de catabolismo del hemo.

Como conclusión, en esta parte del trabajo hemos demostrado que la entrada de hemo al parásito depende de un transportador específico, inducible en condiciones de ausencia de hemo. Este transporte es dependiente de temperatura y pH, saturable por concentraciones crecientes de porfirina, y es un proceso más rápido que la endocitosis de hemoglobina que podría estar dirigido por el cotransporte de iones positivos. Finalmente, hemos demostrado también que hay un proceso de transporte mediado, probablemente activo, de eflujo de porfirinas.

Los resultados de este Capítulo aparecen en el artículo **“Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters”**, publicado en la revista *Molecular Microbiology*, Septiembre 2016 (Anexo 2).

Capítulo 2: Los parásitos tripanosomátidos rescatan el hemo proveniente de la hemoglobina endocitada a través de transportadores HRG endolisosomales

*Las proteínas HRG se describieron en *C. elegans* como proteínas de respuesta al hemo y responsables en algunos casos del transporte de hemo en este organismo (Rajagopal, Rao et al. 2008). Un ortólogo de estos transportadores, la proteína LaHR1, se describió en *Leishmania amazonensis* como el transportador de hemo responsable de la captación de hemo a través de la membrana plasmática del parásito (Huynh, Yuan et al. 2012). Las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* no captan hemo libre, pero también expresan un gen HRG, por lo que nos planteamos su caracterización.*

RESULTADOS

1. El genoma de *Trypanosoma brucei* contiene un gen HRG poco conservado

El genoma de *T. brucei brucei* presenta un gen sinténico del gen que codifica el transportador de hemo en *Leishmania* LHR1 que nosotros hemos llamado TbHRG (Tb927.8.6010). Su producto proteico TbHRG es 100 % idéntico en el patógeno del ganado *T. brucei brucei* y en el patógeno humano *T. brucei gambiense*, pero sólo muestra un grado moderado de similitud con otras proteínas HRG fuera del género *Trypanosoma* (Tabla 1): alrededor del 22 % de identidad con las proteínas LHR1 de *Leishmania*, spp., 13 % de identidad con HRG4 de *C. elegans*, 9 % de identidad con HRG1 de *C. elegans* y 16 % de identidad con el HRG1 humano.

El parásito relacionado *T. cruzi* tiene también un gen homólogo del gen LHR1 (con solo 6 aa diferentes en los dos alelos diploides, TcHRGa y TcHRGb, de la línea híbrida secuenciada) y muestra un 32 % de identidad con el transportador de *T. brucei*. Este gen homólogo, que se ha caracterizado recientemente (Merli, Pagura et al. 2016) denominándose TcHTE (por *Heme Transport Enhancer protein*) y se localiza en el bolsillo flagelar. Aunque también podría desempeñar un papel en la entrada de hemo en este organismo, queda por confirmar si es un transportador de hemo o una proteína que facilita la actividad del transportador de hemo (Merli, Pagura et al. 2016).

IV. Resultados y discusión

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HRG permitió determinar los aminoácidos más conservados entre las distintas secuencias (Fig. 1).

La observación en conjunto de este alineamiento de las secuencias de aminoácidos y de la tabla de similitudes anterior, muestra que la familia de proteínas HRG no se encuentra muy conservada. Este alineamiento múltiple de secuencias también permitió realizar un árbol de distancias génicas en el que se agruparon por un lado las proteínas de los organismos tripanosomátidos y por otro las de metazoos (Fig. 2).

La proteína TbHRG tiene un peso molecular de 18,1 kDa, y como otras proteínas HRG, se espera que contenga 4 dominios transmembrana (Figs. 1 y 3).

Figura 3. Topología propuesta del transportador HRG de *Leishmania*, mostrando los cuatro dominios transmembrana. Adaptado de (Huynh, Yuan et al. 2012).

2. TbHRG es esencial en las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

Mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) observamos que *TbHRG* se expresaba de forma constitutiva en ambos estadios de *T. brucei*. La expresión en la forma procíclica, que es el estadio del parásito en el insecto vector es ocho veces mayor que en la forma sanguínea ($7,9 \pm 1,3$ fold, $p < 0,05$). La expresión de *TbHRG* en la forma sanguínea, que es la forma clínicamente relevante, era sorprendente ya que *T. brucei* no es capaz de tomar hemo libre en este estadio (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). Este hecho sugería que la función fisiológica de *TbHRG* podría diferir de la función propuesta para LHR1, que sería la de importar hemo del ambiente (Huynh, Yuan et al. 2012).

Por lo tanto, analizamos la importancia de la función de *TbHRG* en las formas sanguíneas del parásito utilizando la tecnología del ARN interferente (RNAi). Para ello, en primer lugar se silenció su expresión vía interferencia de ARNi inducible en los tripanosomas sanguíneos. Tras añadir el inductor Doxociclina, la disminución de la expresión del gen (66 %, $p < 0,005$) se ve correlacionada con una inhibición en el crecimiento del parásito (Fig. 4a). Este defecto en el crecimiento es acompañado por significativas alteraciones fenotípicas en la morfología de los parásitos inducidos, como muestra la figura 4b. Estos resultados se reprodujeron en 4 clones diferentes provenientes de dos transfecciones independientes.

Todos estos datos sugieren que *TbHRG* es esencial en las formas sanguíneas de *T.brucei*, y se correlacionan con los datos obtenidos en ensayos de interferencia a nivel

genómico (RITSeq), en los que se indicaba la aparición de una proliferación celular anormal, tanto en formas sanguíneas como procíclicas (Alsford, Turner et al. 2011).

3. TbHRG se localiza en el compartimento endolisosomal del parásito

Para conocer la localización celular de la proteína TbHRG, se sobreexpresó en el parásito una quimera de HRG fusionada a GFP en el extremo carboxilo terminal y se estudió su localización mediante microscopía de fluorescencia. La figura 5 muestra que TbHRG-GFP no se observaba en la membrana plasmática, como se ha descrito para la proteína LHR1 de *L. amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012), sino que se localizaba de forma intracelular.

Usando el marcador de endocitosis en fase fluida Rojo Dextrano Alexa 647, se observó que colocalizaba con TbHRG-GFP (Fig. 5), indicando que TbHRG se localiza en el compartimento endolisosomal del parásito. Como los complejos Hp-Hb endocitados son dirigidos al lisosoma-endosoma tardío del parásito (Widener, Nielsen et al. 2007), la función esencial de TbHRG podría estar relacionada con la salida del hemo derivado de la hemoglobina al citosol.

4. TbHRG es un transportador de hemo

Para estudiar si la proteína TbHRG era un transportador de hemo, analizamos la capacidad de TbHRG para rescatar el defecto de crecimiento de una cepa mutante de *S. cerevisiae* auxótrofa para el hemo (cedida por el Dr. Ivan Hapala (IABG-SAS, Slovakia). Esta cepa tiene una delección en el gen *hem1*, que codifica ALA sintasa, el primer gen de la ruta biosintética del hemo (Kohut, Wustner et al. 2011). Como *S. cerevisiae* no puede internalizar de forma eficiente el hemo del ambiente, las levaduras $\Delta hem1$ sólo pueden crecer en presencia de ALA, el producto de la enzima ausente Hem1, o de concentraciones elevadas de hemina, que pueden entrar a las células de las levaduras cuando hay concentraciones altas a través de un mecanismo desconocido (Protchenko, Shakoury-Elizeh et al. 2008).

En primer lugar, y para conocer la localización de esta proteína en las levaduras, se expresó la quimera de TbHRG fusionada a GFP en el extremo carboxilo terminal en las levaduras $\Delta hem1$. Como muestra la figura 6, la proteína TbHRG-GFP se localizaba tanto en la membrana plasmática como en la vacuola digestiva, que sería el equivalente al lisosoma de los tripanosomátidos.

Posteriormente, diluciones seriadas de levaduras $\Delta hem1$ expresando o no TbHRG se plaquearon en medio libre de ALA con concentraciones crecientes de hemina. La figura 7 muestra que TbHRG es capaz de rescatar el crecimiento de las levaduras mutantes a concentraciones bajas de hemina (0,25 μM), tal y como se ha descrito para LaHR1 (Miguel, Flannery et al. 2013) y otras proteínas HRG (Yuan, Protchenko et al. 2012), lo que sugiere que TbHRG es de hecho un transportador de hemo.

5. TbHRG transporta el hemo liberado de la digestión de la hemoglobina al citoplasma de las levaduras

En las levaduras, la hemoglobina endocitada es dirigida a la vacuola, donde es digerida (Weissman, Shemer et al. 2008). Posteriormente, el hemo liberado no se transporta de manera eficiente al citosol sino que se degrada en el lumen de la vacuola, liberando hierro

IV. Resultados y discusión

que sí es importado hasta el citosol (Weissman, Shemer et al. 2008). Para evaluar la posibilidad de que el transportador TbHRG localizado en el lisosoma del parásito o en la vacuola digestiva de las levaduras, transporte el hemo producido tras la digestión de la hemoglobina de estos orgánulos al citosol, estudiamos la capacidad de estas proteínas para rescatar el crecimiento de las levaduras $\Delta hem1$ en presencia de hemoglobina.

Como muestra la figura 8, las levaduras control $\Delta hem1$ no crecieron en presencia de $0,025 \mu M$ Hb (equivalente a $0,1 \mu M$ hemo), requiriendo concentraciones más elevadas de hemoglobina para crecer. Sin embargo, las levaduras mutantes que expresaban TbHRG eran capaces de crecer a estas bajas concentraciones de hemoglobina y mostraban una mejora significativa a concentraciones mayores de hemoglobina (Fig. 8). Esta capacidad de TbHRG de rescatar el crecimiento de las levaduras mutantes era independiente de su fusión con GFP (datos no mostrados).

Por último, también se midió la biodisponibilidad de hemo derivado de hemoglobina midiendo la actividad de una enzima dependiente de hemo, como es la catalasa. Como las catalasas de las levaduras son hemoproteínas reguladas por hemo y no están presentes en la vacuola digestiva, la actividad catalasa puede ser utilizada como un marcador endógeno para medir los niveles intracelulares de hemo (Kathiresan, Martins et al. 2014).

La actividad de la catalasa de las levaduras se midió con un ensayo sencillo desarrollado para aislados bacterianos y células humanas (Iwase, Tajima et al. 2013) que no requiere lisis celular. Este ensayo consiste en la visualización de la espuma producida por las burbujas de oxígeno, generadas por la catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno,

atrapadas en detergente (ver materiales y métodos). La altura de la espuma en los tubos de ensayo se correlaciona con la actividad de la catalasa (Iwase, Tajima et al. 2013). La figura 9 muestra cómo las levaduras $\Delta hem1$ control incubadas en presencia de $0,5 \mu M$ Hb tenían una actividad catalasa baja, aun cuando esta concentración de Hb permite un crecimiento normal de las levaduras mutantes (datos no mostrados). Por el contrario, en las levaduras $\Delta hem1$ que expresan TbHRG incubadas en las mismas condiciones que el control se observó un incremento significativo de la actividad catalasa, como mostró la espuma generada en el tubo (Fig. 9).

Estos resultados sugieren de forma importante que la proteína TbHRG localizada en la vacuola está involucrada en el rescate del hemo de la hemoglobina internalizada. La incubación de estas mismas levaduras con la concentración equivalente de hemo en forma de hemina también produjo actividad catalasa solo cuando expresaban TbHRG, aunque a niveles más bajos que los obtenidos tras la incubación con hemoglobina (Fig. 9). Esto apoya la idea de que TbHRG localizado en la membrana plasmática es también funcional.

Este ensayo de la catalasa sugería que el hemo derivado de la hemoglobina era utilizado de forma más eficaz que la hemina por las levaduras que expresan TbHRG.

IV. Resultados y discusión

Para confirmar este punto, las levaduras $\Delta hem1$ expresando o no TbHRG se incubaron en medio líquido con un suplemento bajo de hemo, en forma de hemina o de hemoglobina, y se comparó su crecimiento. Como control positivo de crecimiento volvió a utilizarse el ALA.

Las levaduras $\Delta hem1$, independientemente de la expresión de TbHRG, no crecieron en presencia de las bajas concentraciones de hemo ensayadas (0,02 y 0,04 μM) (Fig. 10a). Por el contrario, la hemoglobina mejoró significativamente el crecimiento de las levaduras que expresan TbHRG a concentraciones de sólo 0,02 μM de hemo (equivalente a 0,005 μM de hemoglobina) y restauró completamente el crecimiento a 0,04 μM de hemo (0,01 μM de hemoglobina) (Fig. 10b).

Esta preferencia por la hemoglobina como fuente de hemo no era debida a un aumento en la entrada de la hemoglobina en las levaduras debido a la presencia de la proteína TbHRG, como muestra la figura 11, donde no se observaron diferencias en la acumulación de hemoglobina fluorescente (ApoHb-PPIX) en levaduras que expresaban o no TbHRG. ApoHb-PPIX es un análogo fluorescente de la hemoglobina en la cual el hemo ha sido reemplazado por su precursor inmediato PPIX, que es fluorescente, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Por lo tanto, todos estos resultados confirman que las levaduras que expresan TbHRG son capaces de obtener hemo de forma más eficaz a partir de la hemoglobina, a través del transportador vacuolar, que a partir de la hemina, por medio del transportador localizado en la membrana plasmática.

6. La proteína TbHRG lisosomal aumenta los niveles citosólicos de hemo a partir de la hemoglobina endocitada en las formas sanguíneas de *T. brucei*

Todos los resultados anteriores sugerían que la proteína TbHRG también podría transportar el hemo derivado de la hemoglobina endocitada desde el compartimento endolisosomal al citosol en las formas sanguíneas de *T. brucei*. Por tanto, esperábamos que los parásitos que sobreexpresaban la proteína TbHRG, crecidos en presencia de suero conteniendo el complejo Haptoglobina-Hemoglobina, contuviesen una concentración mayor de hemo en su citosol.

Para confirmar esto, medimos los niveles de hemo en el citosol después de lisar suavemente los parásitos que sobreexpresaban o no TbHRG, tal y como se describe en (da Silva Augusto, Moretti et al. 2015). La figura 12 muestra que los parásitos que sobreexpresaban TbHRG (después de la inducción con Doxociclina) contenían alrededor de un 85 % más de hemo citosólico que los parásitos WT ($\beta=p<0,005$) o los parásitos no inducidos ($\alpha=p<0,05$).

7. La proteína LmHR1 de *Leishmania major* complementa la deficiencia de TbHRG en las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

En *L. amazonensis*, LaHR1 se localiza en la membrana plasmática e importa hemo del exterior (Huynh, Yuan et al. 2012). Aunque esta función difiere de la función que proponemos para TbHRG, LaHR1 también se localiza en el lisosoma del parásito (Huynh, Yuan et al. 2012), por lo que podría desempeñar también un papel similar en el rescate del hemo proveniente de la hemoglobina endocitada.

Para investigar esta hipótesis, analizamos en primer lugar la capacidad que tenía la proteína LHR1 de *L. major* (LmHR1) para rescatar el papel esencial que desempeña la proteína TbHRG en el compartimento endolisosomal de las formas sanguíneas de *T. brucei*. Para ello, se transfectó la línea TbHRG ARNi de *T. brucei* descrita anteriormente con el gen LmHR1 fusionado a GFP en el extremo carboxilo terminal (clonado en un plásmido de expresión de *T. brucei*).

A diferencia de la localización descrita para LaHR1 en *L. amazonensis*, LmHR1-GFP no se encontró en la membrana plasmática de las formas sanguíneas de *T. brucei* (Fig. 13a). Al igual que TbHRG-GFP, LmHR1-GFP mostraba una localización intracelular que corresponde al compartimento endolisosomal, como se dedujo de su colocalización con el marcador Rojo Dextrano (tal y como se describe anteriormente para TbHRG).

Además, el efecto letal producido por la interferencia de TbHRG tras la adición de la doxociclina se rescató por la expresión de LmHR1 (Fig. 13b), indicando que LmHR1 puede complementar la función de TbHRG en el compartimento endolisosomal de *T. brucei*. Análisis de qRT-PCR confirmaron la bajada en la expresión de TbHRG tras la adición de doxociclina (52 %, $p < 0,03$) mientras que la expresión de LmHR1-GFP se confirmó por microscopía de fluorescencia.

8. La proteína LmHR1 localizada en la vacuola de las levaduras también rescata el hemo procedente de la hemoglobina endocitada en levaduras

Para confirmar que LmHR1 podría tener una función similar a TbHRG, analizamos su capacidad para rescatar el crecimiento de las levaduras $\Delta hem1$ en presencia de hemoglobina. Primero se analizó la localización de LmHR1-GFP en esta cepa de levaduras. La microscopía de fluorescencia mostró una doble localización en la membrana plasmática y vacuolar (Fig. 14), como se había observado para TbHRG-GFP (Fig. 6).

Posteriormente, se incubaron diluciones seriadas de levaduras control y transfectadas con LmHR1 en presencia de concentraciones crecientes de hemo y hemoglobina. El ensayo de crecimiento de gotas mostró que LmHR1 era capaz de rescatar el crecimiento de las levaduras mutantes en presencia de ambas fuentes de porfirina (Fig. 15).

El hemo procedente de la hemoglobina era de nuevo más eficiente que la hemina como fuente de hemo, ya que $0,01 \mu\text{M}$ de hemoglobina (equivalente a $0,04 \mu\text{M}$ de hemo) permitía el crecimiento (70 % del crecimiento del control con ALA), mientras que $0,04 \mu\text{M}$ de hemina no tenía efecto en esta cepa de levadura que expresaba LmHR1 (Fig. 16).

Como se observó en el caso de TbHRG, la expresión de LmHR1 no incrementaba la captación de hemoglobina en las levaduras mutantes (Fig. 17).

IV. Resultados y discusión

Finalmente, el papel de LmHR1 en el rescate del hemo procedente de la hemoglobina se midió con el ensayo de catalasa descrito anteriormente. Los resultados mostrados en la figura 18 indican que la expresión de LmHR1 aumentó significativamente la actividad catalasa de las levaduras incubadas en presencia de 0,5 μM de Hb. Como se observó para TbHRG, la actividad catalasa de estas levaduras que expresaban LmHR1 era mayor cuando la fuente de hemo era la hemoglobina que cuando era el hemo libre (Fig. 18).

Durante el clonaje inicial de LmHR1 en los plásmidos de expresión de las levaduras, un clon mostró mutaciones puntuales, probablemente causadas por la amplificación en la PCR, que cambiaron el aminoácido Asparragina de la posición 38, localizado entre los dominios transmembrana TM1 y TM2, a Alanina (LmHR1^{N38}). Este residuo no estaba incluido en el extenso análisis de mutagénesis llevado a cabo en LaHR1 (Renberg et al., 2015) y, por lo tanto, su función era desconocida. Aunque este mutante fue en un principio descartado, observamos que esta proteína se localizaba exclusivamente en la vacuola digestiva (Fig. 19).

Si esta mutación no afectara a la capacidad de la proteína para transportar hemo, podría utilizarse para confirmar definitivamente el papel de LmHR1 en la vacuola digestiva. De hecho, en presencia de 0,5 μM de hemoglobina, las levaduras $\Delta hem1$ transfectadas con LmHR1^{N38} producían actividad catalasa de forma significativa. (Fig. 19). Estos resultados indican que la proteína LmHR1 vacuolar puede importar hemo de la vacuola digestiva al citosol. Por el contrario, la suplementación con hemina no aumentaba la actividad catalasa en estas levaduras (Fig. 19), de acuerdo con su ausencia en la membrana plasmática.

9. La proteína LmHR1 lisosomal rescata el hemo de la hemoglobina endocitada en *L. major*

Finalmente, analizamos el papel de LmHR1 en el rescate del hemo procedente de la hemoglobina en *Leishmania*.

En primer lugar se estudió la localización de LmHR1 en *L. major*. Para ello, se expresó una quimera de LmHR1 unida a GFP en el extremo carboxilo terminal. Como se describió para LaHR1 en *L. amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012), LmHR1 también se localizó en la membrana plasmática, el bolsillo flagelar y en el compartimento endolisosomal de *L. major* (ensayos de colocalización con FM4-64 a 28 °C) (Fig. 20a).

La proteína LmHR1 intracelular también colocalizó con la hemoglobina endocitada, que se añadió como ApoHb-PPIX (Fig. 20b).

IV. Resultados y discusión

Una vez analizada la localización de LmHR1 en las formas promastigotes de *L. major*, para estudiar su función generamos parásitos con mayores (copias ectópicas del gen) y menores (delección de un alelo del gen) niveles de expresión de LmHR1. La obtención de la línea heterocigota *LmHR1^{+/-}* se llevó a cabo por recombinación homóloga siguiendo la estrategia descrita en el apartado de materiales y métodos.

Para ello, los parásitos se transfectaron con un “cassette” conteniendo el gen de resistencia a higromicina flanqueado por las secuencias UTR 5' y 3' de *LmHR1* (Fig. 21a). Tras la

IV. Resultados y discusión

selección con higromicina, se obtuvo un clon del que se aisló el ADN. La inserción del “cassette” higromicina en el locus correcto se confirmó por PCR (Fig. 21b): usando un oligonucleótido “sentido” de la región UTR 5' del gen *LmHR1* y un oligonucleótido “reverso” del gen de la resistencia a higromicina, se obtuvo una amplificación del tamaño esperado solo en los parásitos *LmHR1*^{+/+}. Mediante qRT-PCR se confirmó una disminución de los niveles de ARNm del gen *LmHR1* de un 50 % en los parásitos *LmHR1*^{+/+} (Fig. 21c). Esta disminución de la expresión de *LmHR1* no afectaba al crecimiento de los promastigotes (Fig. 21d).

No pudimos obtener ninguna línea doble KO utilizando una estrategia similar con un segundo cassette de resistencia, a pesar de haber realizado varios ensayos, lo que podría indicar un papel esencial para *LmHR1*, tal y como se describió para *LaHR1* de *L. amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012).

Con estas herramientas (parásitos que sobreexpresaban *LmHR1* y parásitos con expresión reducida del gen) continuamos el estudio del papel de *LmHR1* respecto al tráfico de porfirinas en *Leishmania*. En primer lugar estudiamos el papel de *LmHR1* en la membrana plasmática.

En contraste con los resultados publicados con LaHR1 en *L. amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012) en nuestros experimentos la sobreexpresión de *LmHR1* no produjo ningún incremento significativo de la entrada de la porfirina fluorescente ZnMP en *L. major* (Fig. 22). Sin embargo, la línea heterocigota *LmHR1*^{+/-} acumuló un 60 % menos de porfirina fluorescente que las células control (Fig. 22). Cuando se expresaba una copia ectópica de *LmHR1* en la línea heterocigota *LmHR1*^{+/-}, la entrada de las porfirinas en los parásitos quedaba restablecida (Fig. 22).

Este rescate no se conseguía cuando se expresaba una copia ectópica del gen mutado *LmHR1*^{N38} (Fig. 22), de acuerdo a su exclusiva localización intracelular en los promastigotes de *L. major* (Fig. 23). Este resultado vendría a confirmar el papel que desempeña la proteína *LmHR1* en la entrada de hemo en la membrana plasmática en estos parásitos.

En segundo lugar se estudió el papel de *LmHR1* a nivel endolisosomal. A diferencia de *T. brucei*, *Leishmania* spp. posee el gen de la ferroquelatasa y puede añadir hierro al precursor PPIX para sintetizar hemo. De esta forma, la biodisponibilidad de porfirinas procedentes de la hemoglobina endocitada puede ser medida analizando la formación *de novo* de hemo en las mitocondrias de los parásitos incubados previamente con ApoHb-PPIX (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011) (Fig. 24).

La figura 24b muestra cómo la formación *de novo* de hemo se correlacionaba con los niveles de *LmHR1*. De esta forma, la sobreexpresión de *LmHR1* aumentó 3 veces la formación de hemo a partir de ApoHb-PPIX respecto al control, mientras que la delección de un alelo

IV. Resultados y discusión

LmHR1 redujo esta formación de hemo a la mitad . Cuando se expresó una copia ectópica del gen *LmHR1* en los parásitos *LmHR1*^{+/-} , éstos mostraron niveles de formación de hemo similares a los de las células control. Este mismo resultado se pudo observar cuando los parásitos *LmHR1*^{+/-} se complementaron con una copia ectópica de la proteína mutada *LmHR1*^{N38}.

Como ya se observó para las levaduras (Fig. 17), no observamos diferencias en la endocitosis de hemoglobina en las distintas líneas de *L. major* (Fig. 25) por lo que podemos descartar que las diferencias en la formación de hemo a partir de ApoHb-PPIX se debiera a cambios en la endocitosis de Hb dependiente de LmHR1.

DISCUSIÓN

Las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, las formas clínicamente relevantes del parásito, obtienen hemo exclusivamente a través de la endocitosis del complejo Hp-Hb (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). Las especies del género *Leishmania*, por otro lado, pueden obtener hemo por su captación directa a través del transportador esencial de porfirinas LHR1 (Huynh, Yuan et al. 2012), una proteína de la familia HRG (Rajagopal, Rao et al. 2008), y del transportador LmFLVCRb (resultados presentados en este trabajo en el Capítulo 3), o a través de la endocitosis de la hemoglobina (Sengupta, Tripathi et al. 1999). En ambos parásitos, el hemo liberado después de la ruptura lisosomal de la hemoglobina debe atravesar la membrana del lisosoma antes de ser incorporado a las hemoproteínas. En este trabajo mostramos evidencias que sugieren de forma clara que los transportadores HRG de *T. brucei* y *L. major* son los responsables de este paso esencial.

En primer lugar, tanto LmHR1 como el producto de su gen sintético en *T. brucei*, TbHRG, se localizan en los compartimentos endolisosomales de *Leishmania* spp. (Fig. 20) y de las formas sanguíneas de *T. brucei* (Fig. 5), respectivamente, hacia donde se dirige la hemoglobina endocitada y donde es digerida (Sengupta, Tripathi et al. 1999, Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). En el caso de *Leishmania* spp., la proteína también se expresa en la membrana plasmática (Fig. 20), donde se ha propuesto que transporta el hemo desde el exterior hasta el citosol (Huynh, Yuan et al. 2012). Esta doble localización de LaHR1 en *L. amazonensis* en la membrana plasmática y en los compartimentos ácidos (vacuola en el caso de levaduras o lisosomas en el caso de células de mamífero) se observó también cuando la proteína se expresaba en células HeLa (Huynh, Yuan et al. 2012), cuando TbHRG y LmHR1 se expresaron en levaduras (este trabajo) o en el caso del HRG1 humano en células MCF-7 (O'Callaghan, Ayllon et al. 2010).

LmHR1 tiene la misma localización intracelular exclusiva que TbHRG cuando ambas se expresan en las formas sanguíneas de *T. brucei* (Fig.13a) Por el contrario, resultados provisionales muestran que en las formas procíclicas de *T. brucei*, TbHRG (y LmHR1) se localizan tanto en la membrana plasmática como en el interior celular (Fig. 26).

La ausencia de TbHRG en la membrana plasmática de las formas sanguíneas de *T. brucei* podría ser debida a la baja disponibilidad de hemo libre en el suero humano, comparado con los niveles del complejo Hp-Hb (Thomsen, Etzerodt et al. 2013). Por el contrario, la presencia de TbHRG en la membrana plasmática y en los compartimentos endolisosomales en las formas procíclicas de *T. brucei*, sugiere que este estadio del parásito podría también tomar el hemo liberado tras la digestión de la sangre ingerida por la mosca tse-tsé. Igualmente, la doble localización de las proteínas HRG en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares, observada en las formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. (Huynh, Yuan et al. 2012), podría estar también relacionada con la exposición a ambas, porfirinas libres y hemoglobina, en el fagolisosoma del macrófago y dentro del insecto vector (Kelly, Ignatushchenko et al. 2003).

En segundo lugar, tanto TbHRG como LmHR1 (y LaHR1 (Huynh, Yuan et al. 2012)) median el transporte de hemo en levaduras. Estas proteínas se expresaron de forma heteróloga en las levaduras mutantes $\Delta hem1$ (Figs. 6 y 14). Estas levaduras tienen el gen *hem1* deletado, que codifica ALA sintasa que es la primera enzima de la ruta de la biosíntesis del grupo hemo, por lo que son auxótrofas para el hemo. La expresión de estas proteínas en las levaduras las capacitaba para vivir en presencia de concentraciones bajas de hemina (Figs. 7 y 15). Un fenotipo similar de rescate de la cepa mutante de levadura también se ha descrito para las proteínas HRG: CeHRG1, CeHRG4 y HsHRG1 (Yuan, Protchenko et al. 2012).

IV. Resultados y discusión

En tercer lugar, las proteínas TbHRG y LmHR1 localizadas en la vacuola de estas levaduras son funcionales, tal y como demuestra el hecho de que también son capaces de rescatar el defecto de crecimiento en estas levaduras mutantes auxótrofas cuando el hemo es sustituido por hemoglobina (Figs. 8 y 15). La hemoglobina alcanza la vacuola de la levadura después de su endocitosis (Weissman, Shemer et al. 2008) y allí se degrada liberando el hemo que es exportado al citosol. La capacidad de estas proteínas HRG para utilizar la hemoglobina como fuente de hemo en las levaduras se confirmó al constatar que promueven la actividad de la catalasa, que es una hemoproteína utilizada como enzima reportero. Tras la incubación de las levaduras con hemoglobina había mayor actividad catalasa cuando estas levaduras mutantes expresaban la proteína TbHRG o la proteína LmHR1 (Figs. 9 y 18). Esto se ratificó utilizando un mutante de la proteína LmHR1 que se localizaba de forma exclusiva en la vacuola y que también facilitaba el uso del hemo procedente de la hemoglobina endocitada (Figs. 19 y 18).

Finalmente, la sobreexpresión de la proteína TbHRG lisosomal aumenta los niveles de hemo citosólicos procedentes del complejo Hp-Hb en *T. brucei* (Fig. 12). En *L. major*, por su parte, la sobreexpresión de la proteína LmHR1 promueve la biodisponibilidad de las porfirinas unidas a la hemoglobina endocitada en los parásitos de este género (Fig. 24a). Más aún, la función de TbHRG en *T. brucei* puede ser complementada por la expresión de la proteína LmHR1 de *L. major* (Fig. 13b). Por lo tanto, es probable que ambas proteínas desempeñen un papel similar en los compartimentos endolisosomales, como es el de rescatar el hemo de la hemoglobina endocitada. De forma similar, la proteína HRG1 de mamíferos es la responsable del transporte del hemo del fagolisosoma de los macrófagos al citosol durante la eritrofagocitosis (Delaby, Rondeau et al. 2012, White, Yuan et al. 2013); mientras que CeHRG1 se ha propuesto como la proteína responsable de facilitar la disponibilidad de hemo intracelular a través del compartimento endolisosomal en *C. elegans* (Rajagopal, Rao et al. 2008).

Los datos presentados en este trabajo suponen un avance significativo en el conocimiento de los mecanismos utilizados por los parásitos tripanosomátidos auxótrofos para el hemo para rescatar el hemo procedente de sus hospedadores (Fig. 27).

De esta forma, en las formas sanguíneas de *T. brucei* endocitan los complejos Hp-Hb a través del receptor TbHpHbR (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). La hemoglobina es conducida a través de la ruta endocítica y digerida en el compartimento endolisosomal; el hemo libre liberado sería transportado por TbHRG hasta el citosol (resultados presentados en

IV. Resultados y discusión

este trabajo), donde es incorporado a hemoproteínas tales como CYP51 (esterol 14 α -demetilasa) esencial para el parásito (Dauchy, Bonhivers et al. 2016).

Por su parte, *Leishmania* spp. puede internalizar el hemo a través de la proteína de membrana plasmática LHR1 (Huynh, Yuan et al. 2012), de la proteína LmFLVCRb (resultados presentados en este trabajo, ver Capítulo 3) o puede utilizar el hemo de la hemoglobina (Chang and Chang 1985, Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011). La hemoglobina unida a su receptor, una hexoquinasa, es endocitada (Sengupta, Tripathi et al. 1999, Krishnamurthy, Vikram et al. 2005) y dirigida a los endosomas tardíos/lisosomas donde es digerida y libera el hemo (Singh, Tandon et al. 2003, Patel, Singh et al. 2008). La proteína intracelular LHR1, localizada en el compartimento endolisosomal, media la salida del hemo desde este compartimento al citosol (Fig. 22).

El transportador LABCG5, de la familia de los transportadores ABC, desempeña probablemente un papel en este punto, ya que se ha demostrado que participa en el tráfico del hemo procedente de la hemoglobina a la mitocondria, sin afectar al tráfico del hemo libre. Así, la disminución de la función de LABCG5 inhibe el crecimiento de los parásitos a menos que se añada un suplemento de hemina libre, no unida a la hemoglobina (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011). De cualquier forma, en esta localización, LABCG5 podría tomar el hemo exportado por LHR1 de los endolisomas donde la hemoglobina es digerida, aunque esta posibilidad todavía requiere de más investigación. Finalmente, el transportador LmABCB3, también de la familia de los transportadores ABC, que está involucrado en la maduración de los clusters Fe/S, promueve igualmente la biogénesis del hemo mitocondrial a partir de los precursores del hospedador (Martínez-García, Campos-Salinas et al. 2016).

También mostramos que *TbHRG* es un gen esencial para la forma sanguínea de *T. brucei* (Fig. 4), que es la forma clínicamente relevante. La única fuente de hemo en este estadio del ciclo de vida del parásito es la endocitosis mediada por el receptor Hp-Hb (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008), un proceso bien caracterizado debido a su relación con la inmunidad natural humana contra muchas especies de tripanosomas (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008, Vanhollebeke and Pays 2010, Pays, Vanhollebeke et al. 2014). La anulación de la expresión de *TbHRG* impide esta forma de tomar hemo del hospedador y podría explicar por qué esta proteína es esencial.

De cualquier forma, cuando se elimina el gen TbHpHbR, se ha mostrado que el crecimiento de los tripanosomas se puede ver comprometido de forma severa (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008) o más leve (DeJesus, Kieft et al. 2013), sugiriendo en cualquier caso que la utilización del hemo a través de HpHbR podría ser no esencial para el parásito (DeJesus, Kieft et al. 2013). Además, en *T. b. gambiense* la proteína TbHpHbR tiene una expresión reducida (Kieft, Capewell et al. 2010) y presenta mutaciones que disminuyen su afinidad por el complejo Hp-Hb (Stodkilde, Torvund-Jensen et al. 2014), confirmando la idea de que este receptor no sea esencial. Por lo tanto, se ha sugerido que los parásitos HpHbR⁻ utilizan otros mecanismos de captación de hemo que compensarían la pérdida del receptor Hp-Hb (DeJesus, Kieft et al. 2013).

Esta posibilidad todavía no ha sido probada, pero el carácter esencial de TbHRG sugiere que este posible mecanismo alternativo para la captación del hemo se basa también en el tráfico de cualquier forma de hemo al endolisosoma del parásito, necesitando la proteína TbHRG para la salida del hemo al citoplasma.

LHR1 es también un gen esencial para *L. amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012) y *L. major* (este trabajo) y una bajada del 50 % en su expresión compromete severamente la virulencia del parásito en modelos animales (Miguel, Flannery et al. 2013, Renberg, Yuan et al. 2015).

Por lo tanto, estas proteínas HRG de *T. brucei* y *Leishmania* spp. podrían ser atractivas dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos. *Trypanosoma cruzi*, responsable de la enfermedad de Chagas, es también auxótrofo para el hemo y lleva a cabo así mismo la endocitosis de la hemoglobina (Lara, Sant'Anna et al. 2007). En este organismo se ha descrito también la presencia de un gen sinténico HRG (TCHTE), que se localiza en el bolsillo flagelar (Merli, Pagura et al. 2016). Aunque su esencialidad no ha sido aún confirmada, es de esperar que también juegue un papel importante.

En conclusión, aquí mostramos que los parásitos tripanosomátidos auxótrofos para el hemo, pueden tomar el hemo a partir de la hemoglobina endocitada a través de los transportadores HRG localizados en los compartimentos endolisosomales.

Los resultados de este Capítulo forman parte del manuscrito en preparación **“Leishmania heme uptake involves FLVCRb, a novel porphyrin transporter required for parasite virulence”**, Cabello-Donayre M., et al.

Capítulo 3: Captación de hemo en *Leishmania* mediada por LmFLVCRb, un nuevo transportador de porfirinas requerido para la virulencia del parásito

Cuando se comenzó esta parte del trabajo no se había descrito a la proteína LHR1 como responsable de la captación de hemo en *Leishmania*. Como habíamos mostrado que la captación de hemo era un transporte mediado (Capítulo 1), entre otras aproximaciones buscamos al transportador responsable de este proceso dentro de la familia FLVCR (Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor). Estas proteínas, pertenecientes a la superfamilia MFS, incluyen transportadores de hemo en humanos, actuando FLVCR2 como importador de porfirinas.

RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de las proteínas FLVCR de parásitos tripanosomátidos

La proteína humana HsFLVCR2 (NP_060261.2), descrita como una proteína importadora de hemo localizada en la membrana plasmática (Duffy, Shing et al. 2010), se utilizó para identificar posibles ortólogos en los organismos tripanosomátidos mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

En el genoma de *Leishmania major* se encontraron cuatro genes de la familia FLVCR, que hemos nombrado como LmFLVCRa (LmjF.03.0410), LmFLVCRb (LmjF.17.1430), LmFLVCRc (LmjF.20.0350) y LmFLVCRd (LmjF.21.0080). Entre éstas, la proteína codificada por LmFLVCRb es la que presentaba los mayores valores de identidad (23,41 %) y similitud (50 %) con el HsFLVCR2 (Tabla 1) por lo que se priorizó su caracterización. El resto de productos proteicos de estos genes (LmFLVCRa, LmFLVCRc y LmFLVCRd) sólo muestran un grado moderado de identidad (12-19 %) y similitud (30-38 %) con la proteína FLVCR2 humana (Tabla 1).

Los genomas de *T. brucei* y de *T. cruzi* presentan un solo gen de esta familia, que hemos llamado TbFLVCR (Tb927.10.3350) y TcFLVCR (XP_809220.1), respectivamente. Ambas proteínas presentan semejantes grados de identidad (19 %) y similitud (40-43 %) tanto con la isoforma FLVCR1a como con FLVCR2 humanas, mientras que, también para ambos casos,

IV. Resultados y discusión

estos porcentajes son menores para la isoforma FLVCR1b humana: identidad del 11 % y similitud del 24 % (Tabla 1).

Se realizó un árbol de distancias filogénicas en el que podemos visualizar cómo se agrupan las distintas proteínas en función de su semejanza de secuencia (Fig. 1). Este árbol de distancias muestra la relación evolutiva que hay entre las distintas proteínas FLVCR que hemos analizado. Se agrupan por un lado las proteínas FLVCR de metazoos (humano (HsFLVCR1a, HsFLVCR1b y HsFLVCR2), *Caenorhabditis elegans* (CeFLVCR), *Danio rerio* (DrFLVCR) y *Drosophila melanogaster* (DmFLVCR)). Por otro lado, y partiendo del mismo punto de divergencia evolutiva encontramos las proteínas FLVCR de los organismos unicelulares (*Plasmodium ovale* (PoFLVCR), *Leishmania major* (LmFLVCR), *Trypanosoma brucei* (TbFLVCR) y *T. cruzi* (TcFLVCR)).

2. Análisis de la secuencia de LmFLVCRb

El gen *LmFLVCRb* codifica una proteína de 500 aminoácidos, con un valor de punto isoeléctrico teórico de 8,41 y un peso molecular estimado de 54 kDa. Estos valores fueron obtenidos utilizando la herramienta de Expasy (*ExpertProtein Analysis System*) (http://web.expasy.org/compute_pi/).

La predicción topológica de LmFLVCRb se llevó a cabo analizando la secuencia de la proteína mediante el algoritmo Kyte-Doolittle (Kyte and Doolittle 1982) con el programa ProtScale Analysis (<http://web.expasy.org/protscale/>) para ver su perfil de hidrofobicidad (Fig. 2a), y mediante el programa de predicción de segmentos transmembranas DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/tmdas.cgi>) (Fig. 2b). Como puede observarse en la figura

IV. Resultados y discusión

2, se deducen doce dominios transmembrana en esta proteína, que aparecen representados en el modelo estructural de la figura 3. Este modelo se ha realizado con el programa Phyre2, que tras hacer una predicción de su estructura secundaria utilizó como molde para construir el modelo un transportador de glucosa perteneciente también a la familia MSF (Pao, Paulsen et al. 1998). Esta estructura de doce dominios transmembrana es común a todos los transportadores de esta superfamilia, a la que pertenecen las proteínas FLVCR. No se encontró el motivo GXXSDRXGRR descrito en otras proteínas FLVCR, que también se encuentra en todos los transportadores de complejos metal-tetraciclina, y que se sugirió que podría estar relacionado con la interacción con el hemo (Krishnamurthy, Xie et al. 2007).

3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HsFLVCR2 y LmFLVCRb

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HsFLVCR2 y LmFLVCRb permitió determinar los aminoácidos más conservados entre estas dos proteínas (Fig. 4). Como se menciona en la introducción, se han descrito una serie de mutaciones en HsFLVCR2 asociadas con el síndrome de Fowler (Meyer, Ricketts et al. 2010, Kvarnung, Taylan et al. 2016). Varios de estos residuos se conservan en la proteína LmFLVCRb (rectángulos azules en la figura 4) mientras que otros están sustituidos por aminoácidos de propiedades muy similares (rectángulos naranjas en la figura 4).

4. Localización celular de la proteína LmFLVCRb en promastigotes de *L. major*

La localización celular de la proteína LmFLVCRb en las formas promastigotas de *L. major* se estudió mediante microscopía de fluorescencia tras sobreexpresarla en los parásitos como una quimera fusionada a GFP en el extremo carboxilo.

La figura 5 muestra la localización de la quimera LmFLVCRb-GFP, tanto en la membrana del parásito como en compartimentos intracelulares. Utilizando FM4-64 a 4 °C, que es un marcador de membrana plasmática y bolsillo flagelar cuando se utiliza a esta temperatura, se observó que colocalizaba con LmFLVCRb-GFP (Fig. 5a). Para identificar los orgánulos intracelulares donde se localizaba la proteína LmFLVCRb-GFP se utilizó FM4-64 a 28 °C, temperatura a la que marca la ruta endocítica, y LysoTracker Red, marcador de organelos ácidos como el lisosoma. LmFLVCRb-GFP colocalizó con y FM4-64 (Fig. 5b) y LysoTracker Red (Fig. 5c), por lo que podríamos concluir que la quimera LmFLVCRb-GFP se localiza en la membrana plasmática, bolsillo flagelar y endolisosomas.

5. Generación de líneas de *L. major* con niveles alterados de *LmFLVCRb*

Para estudiar la función de *LmFLVCRb* en el tráfico de hemo en la membrana plasmática se generaron líneas de parásitos con diferentes niveles de expresión de la proteína, bien por su sobreexpresión o por eliminación del gen *LmFLVCRb*.

Para la sobreexpresión de *LmFLVCRb* en *L. major*, el gen se clonó en el plásmido de expresión pXG Hygro (Ha, Schwarz et al. 1996) y se obtuvo una línea transfectante como en el caso de la quimera con GFP.

Para tratar de generar una línea KO para el gen *LmFLVCRb*, en primer lugar delecionamos un alelo del gen por recombinación homóloga para obtener una línea heterocigota *LmFLVCRb*^{+/−}, siguiendo la estrategia descrita en el apartado de materiales y métodos. Para ello, los parásitos se transfectaron con un “cassette” que contenía el gen de resistencia a higromicina flanqueado por las secuencias 5’UTR y 3’UTR de *LmFLVCRb* (Fig. 6a). Tras la selección con higromicina, se obtuvo un clon del que se aisló el ADN.

La inserción del “cassette” higromicina en el locus correcto se confirmó por PCR (Fig. 6b): usando un oligonucleótido “sentido” de la región 5’UTR del gen *LmFLVCRb* y un oligonucleótido “reverso” del gen de la resistencia a higromicina, se obtuvo una amplificación del tamaño esperado (1860 pb) solo en los parásitos *LmFLVCRb*^{+/−}.

También se confirmó la inserción del “cassette” higromicina en el locus correcto por Southern Blot (Fig. 6c). Para ello, se extrajo ADN genómico de los parásitos control y *LmFLVCRb*^{+/−}, y se realizó una digestión con la enzima de restricción XhoI que cortaba dentro de la secuencia del gen pero no lo hacía dentro del “cassette” de higromicina. Los fragmentos de ADN digeridos con esta enzima de restricción se hibridaron con sondas específicas para la región 3’UTR. Como se puede observar en la figura 6c, los perfiles obtenidos confirman que el “cassette” de higromicina se insertó de forma correcta sustituyendo uno de los alelos del gen *LmFLVCRb*.

Finalmente, mediante qRT-PCR se confirmó una disminución de los niveles de ARNm del gen *LmFLVCRb* de un 60 % en los parásitos *LmFLVCRb*^{+/−} (Fig. 6d).

No se pudo obtener ninguna línea doble KO utilizando una estrategia similar con un segundo “cassette” de resistencia, a pesar de haber realizado varios ensayos. Actualmente estamos usando la tecnología CRISPR/Cas9 para tratar de generarlos.

IV. Resultados y discusión

6. LmFLVCRb está implicada en la captación de porfirinas en *Leishmania*

Posteriormente, se estudió la captación de porfirinas en los parásitos que sobreexpresaban la proteína, en promastigotes controles y en parásitos con una expresión reducida de la misma (*LmFLVCRb^{+/-}*). Como se describió en el apartado de materiales y métodos, estos estudios se llevaron a cabo mediante citometría de flujo, utilizando la porfirina fluorescente ZnMP como análogo de hemo.

La sobreexpresión de *LmFLVCRb* aumentó en un 40 % la entrada de la porfirina fluorescente ZnMP en *L. major* ($p < 0,005$) con respecto al control (Fig. 7). Por el contrario, la línea heterocigota *LmFLVCRb^{+/-}* acumuló un 50 % menos de porfirina fluorescente que las células control ($p < 0,005$) (Fig. 7).

7. Niveles intracelulares de hemo en parásitos con distintos grados de expresión de *LmFLVCRb*

A continuación, se analizaron los niveles intracelulares de hemo en las distintas líneas de *L. major*. Para ello, los cultivos se sincronizaron partiendo todos ellos de una cantidad inicial de parásitos de 1×10^6 /ml y al cabo de 72 h se recogieron y se determinó su contenido de hemo mediante HPLC-MS/MS.

Como muestra la figura 8, los niveles de hemo intracelulares se relacionaban con los niveles de expresión de *LmFLVCRb*. Así, la línea que sobreexpresaba el transportador presentaba más del doble de hemo que el control, mientras que la línea con un alelo de *LmFLVCRb* delecionado, contenía un 50 % menos de hemo que el control.

8. La proteína *LmFLVCRb* interacciona con el grupo hemo

A continuación se estudió la capacidad que tenía la proteína *LmFLVCRb* para interaccionar con hemo mediante un ensayo de precipitación (pull down) con hemina-agarosa. Para ello, en primer lugar se aislaron membranas de parásitos que expresaban *LmFLVCRb*-GFP y se solubilizaron con un detergente suave. Posteriormente, estas proteínas solubilizadas se incubaron con hemina-agarosa en ausencia o presencia de distintas concentraciones de hemo libre. Tras lavar la agarosa, las proteínas precipitadas se separaron por SDS-PAGE y *LmFLVCRb*-GFP se visualizó por western blot usando un anticuerpo frente a

la GFP. Como muestra la figura 9a, LmFLVCRb-GFP interaccionaba con la hemina-agarosa, y esta interacción fue visiblemente inhibida por hemina libre (Fig. 9b).

9. LmFLVCRb lisosomal no importa hemo procedente de la Hb endocitada

La proteína LmFLVCRb se localiza en la membrana plasmática y en el compartimento endolisosomal (Fig. 5), como ocurre con LmHR1. Los resultados anteriores sugieren que la proteína LmFLVCRb localizada en la membrana plasmática media la entrada de porfirinas desde el espacio extracelular al citosol. Sin embargo, estos ensayos no permitían valorar la función que pudiera realizar la proteína LmFLVCRb localizada intracelularmente.

Por lo tanto, para dilucidar esta cuestión se realizó un ensayo para estudiar si la proteína LmFLVCRb lisosomal mediaba la salida del hemo procedente de la hemoglobina endocitada al citosol, como habíamos descrito para LmHR1 en el Capítulo 2.

Como ya se mencionó anteriormente, *Leishmania* spp. posee el gen de la ferroquelatasa y puede añadir hierro al precursor PPIX para sintetizar hemo en la mitocondria. De esta forma, la biodisponibilidad de porfirinas provenientes de la Hb puede ser medida de forma indirecta analizando la formación de hemo *de novo* en las mitocondrias de los parásitos incubados con ApoHb-PPIX, como se vió en el Capítulo 2.

Como control para confirmar que PPIX era transportado por LmFLVCRb, previamente estudiamos la formación de hemo *de novo* en parásitos con distintos niveles de expresión de LmFLVCRb incubados con PPIX.

IV. Resultados y discusión

Como muestra la figura 10, la sobreexpresión de *LmFLVCRb* aumentó la formación de hemo a partir de PPIX en un 40 %, mientras que la delección de un alelo de *LmFLVCRb* redujo esta formación en un 40 % (Fig. 10a), confirmando que PPIX es sustrato de *LmFLVCRb*.

Posteriormente repetimos el ensayo incubando los parásitos con ApoHb-PPIX, que entra por endocitosis. Como se observa en la figura 11, la sobreexpresión de *LmFLVCRb* no afecta a la formación de hemo *de novo* a partir de ApoHb-PPIX. Sin embargo, la delección de un alelo del gen no solo no disminuye la formación de hemo sino que sorprendentemente la aumenta en un 55,5 %, aunque de forma estadísticamente no significativa. Una posible explicación de este resultado sería que la delección de un alelo de *LmFLVCRb* provocase la sobreexpresión de *LmHR1* en el parásito (Fig. 10b)

10. La disminución de la expresión de *LmFLVCRb* aumenta la expresión de *LmHR1*

Para conocer si la delección de uno de los alelos del gen *LmFLVCRb* provocaba la sobreexpresión de *LmHR1* se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real comparando parásitos control y parásitos *LmFLVCRb*^{+/-}.

Se observó que en los parásitos *LmFLVCRb*^{+/-} había un aumento estadísticamente significativo de la expresión de este gen a nivel de ARNm (Fig. 11).

11. La proteína *LmFLVCRb* no importa hemo cuando se expresa de forma heteróloga en levaduras

Tal y como se hicimos para las proteínas HRG (Capítulo 2) se estudió la capacidad que tenía la proteína *LmFLVCRb* para rescatar el defecto de crecimiento en una línea de levaduras *S. cerevisiae* auxótrofa para el hemo crecida en presencia de bajas concentraciones de hemina. Como se explicó anteriormente, esta cepa tiene una delección en el gen *hem1*, el primer gen de la ruta biosintética del hemo que codifica el gen ALA sintasa, por lo que solo crece en presencia de ALA o de concentraciones elevadas de hemina.

11.1. Localización de la proteína *LmFLVCRb* expresada en levaduras

En primer lugar, estudiamos la correcta expresión y localización de *LmFLVCRb* en el sistema heterólogo de levadura. Para ello, se clonó en un plásmido de expresión constitutiva el gen del transportador fusionado a GFP en el extremo carboxilo terminal. Como se observa en la figura 14, *LmFLVCRb*-GFP se expresaba correctamente y se localizaba en la membrana plasmática de las levaduras.

11.2. La proteína LmFLVCRb no rescata el crecimiento de las levaduras auxótrofas para el hemo crecidas en presencia de bajas concentraciones de hemina

Para conocer si LmFLVCRb era capaz de importar hemo en este modelo, se usaron levaduras que expresaban LmFLVCRb fusionado (plásmido constitutivo pDR) o no (plásmido inducible pYESDEST52) a GFP. Con estas levaduras y sus controles se realizó el mismo ensayo que hemos descrito para TbHRG y LmHR1, y que consiste en plaquear diluciones seriadas de células en medio libre de ALA con concentraciones crecientes de hemina.

Como se observa en la figura 14, la proteína LmFLVCRb no posibilitaba el crecimiento de las levaduras en presencia de concentraciones bajas de hemina, independientemente de usar un sistema de expresión inducible (Fig. 14) o constitutivo (dato no mostrado). Este resultado era similar al descrito para la proteína FLVCR2 humana, que tampoco rescataba el crecimiento de estas levaduras mutantes en presencia de bajas concentraciones de hemina (Yuan, Protchenko et al. 2012).

12. La proteína LmFLVCRb importa hemo cuando se expresa de forma heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis*

Como no se obtuvieron resultados positivos usando el modelo de *S. cerevisiae*, para confirmar que LmFLVCRb tenía la capacidad de importar hemo, como sugerían los resultados en *L. major*, decidimos usar el modelo de oocitos de rana *Xenopus laevis*.

Este modelo se ha utilizado para estudiar la funcionalidad de proteínas transportadoras y para realizar estudios cinéticos con gran precisión (Briz, Serrano et al. 2002), incluyendo ensayos de transporte de hemo mediado por HsFLVCR2 (Duffy, Shing et al. 2010). Una de las ventajas que presenta este método es la posibilidad de medir la cantidad de sustrato captado por un solo oocito. Este modelo también presenta la ventaja de que al poder disponer de gran número de oocitos por experimento, es posible realizar estudios con un número elevado de determinaciones para cada punto experimental, lo que reduce la dispersión de los valores calculados y aumenta la fiabilidad de los resultados.

Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. José Juan García Marín y la Dra. Elisa Herráez Aguilar (Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca).

Para este ensayo se extrajeron los oocitos de la rana y se seleccionaron aquellos que se encontraban en el estadio 6 de maduración con ausencia de deformaciones para su microinyección con el ARNm sintetizado *in vitro* a partir del gen *LmFLVCRb*.

12.1. Expresión y localización subcelular de la proteína LmFLVCRb-GFP en los oocitos

Los oocitos sanos extraídos de las ranas *X. laevis* se inyectaron con el ARNm correspondiente a la proteína de fusión LmFLVCRb-GFP, sintetizado *in vitro*. Se monitorizó la aparición de fluorescencia a diferentes tiempos tras la inyección del ARNm para confirmar por un lado que el ARNm sintetizado se traducía en una proteína y por otro lado para determinar el tiempo adecuado para su máxima expresión en la membrana de los oocitos.

La figura 14 muestra imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de cortes de los oocitos 8, 24 y 48 h después de la inyección del ARNm. La máxima expresión de la proteína en la membrana plasmática se observaba a las 48 h. La señal obtenida a las 8 h resultó ser muy parecida a la señal inespecífica de fluorescencia de los oocitos control (no inyectados).

12.2. LmFLVCRb importa hemo al interior de los oocitos

Los experimentos de captación de hemo tras la inyección del ARNm de *LmFLVCRb* sintetizado *in vitro* se realizaron 48 h después de la microinyección, para permitir la máxima expresión de la proteína en la membrana de los oocitos, como se describió en el apartado anterior (Fig. 14). Como control se utilizaron oocitos no inyectados. Salvo que se indiquen otras condiciones, en estos ensayos tanto los oocitos control como los oocitos inyectados con ARNm de *LmFLVCRb* se incubaron durante 1 h a 25 °C con una solución de hemina 100 μM disuelta en medio de captación que incluye iones monovalentes y a pH 7,5, como se describe en materiales y métodos. Transcurrida esta incubación, se midió el contenido intracelular de hemo por HPLC-MS/MS. La captación de hemo neta (dependiente de *LmFLVCRb*) se calculó restándole los valores obtenidos en los oocitos controles a la cantidad de hemo medida en los oocitos inyectados con el ARNm.

En la figura 15 podemos observar que la captación de hemo por los oocitos que expresaban la proteína *LmFLVCRb* fue el doble de la observada en los oocitos sin inyectar, obteniéndose una captación neta de hemo en los oocitos que expresan *LmFLVCRb* de unos $5,55 \pm 0,97$ pmol hemo/oocito en 60 min. Este transporte de hemo mediado por *LmFLVCRb* es casi 4 veces mayor que el descrito para la proteína FLVCR2 humana expresada en el mismo

modelo de oocitos (alrededor de 1,44 pmol hemo/oocito en 60 min). Este dato confirma que el hemo es transportado por LmFLVCRb.

Esta captación de hemo mediada por LmFLVCRb es dependiente de temperatura, ya que a 4 °C no se produjo la entrada de hemo en los oocitos inyectados con ARNm de LmFLVCRb (Fig. 16).

12.3. La captación de hemo realizada por LmFLVCRb es inhibida por PPIX

A continuación estudiamos si la captación de hemo en los oocitos mediada por LmFLVCRb era inhibido por la competición con otras porfirinas. Para ello, realizamos un ensayo de captación de hemo en presencia y ausencia de PPIX, que en resultados en *Leishmania* (Cap. 2, Fig. 11) había mostrado ser sustrato de LmFLVCRb.

La presencia de PPIX no alteró la entrada de hemo en oocitos controles (dato no mostrado). Por el contrario, como se observa en la figura 17, en los oocitos inyectados con el ARNm de LmFLVCRb la entrada neta de hemo se inhibía en un 50 % por la presencia de PPIX.

12.4. Papel del pH en la captación de hemo por parte de la proteína LmFLVCRb

Para evaluar el efecto del pH extracelular sobre la captación de porfirinas se utilizó un medio de captación con distinto un rango de pH desde 5,5 a 8,5.

Como se observa en la figura 18, la entrada neta de hemo en los oocitos inyectados con ARNm de LmFLVCRb era dependiente de pH, disminuyendo muy marcadamente a un valor de pH una unidad más básico que el fisiológico. A pH menores de 7,5, también se observó una tendencia a una menor actividad del transportador pero, en este caso, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

12.5. Papel de los iones en la captación de hemo por parte de la proteína LmFLVCRb

Cuando se caracterizó la entrada de hemo en *L. major* se observó el requerimiento de los iones monovalentes sodio y potasio para el proceso de captación de porfirinas y en este Capítulo hemos demostrado que la proteína LmFLVCRb es responsable, al menos en parte, de la captación de hemo en los parásitos. Por lo tanto, decidimos analizar también la influencia de estos iones monovalentes en el transporte de hemo llevado a cabo por la proteína LmFLVCRb en el modelo de expresión heteróloga en oocitos. Para ello, se modificó la composición del tampón de captación, que contiene normalmente 100 mM Na⁺ y 2 mM K⁺, como aparece reflejado debajo de la figura 20, manteniendo en todos los casos la fuerza iónica constante durante el ensayo mediante el suplemento con colina (102 mM de iones monovalentes o de colina) (Paes, Galvez Rojas et al. 2008, dos Santos, Paes et al. 2009).

Como se observa en la figura 19, el transporte de hemo mediado por LmFLVCRb al interior de los oocitos también dependía significativamente de la presencia de sodio y potasio en el medio de incubación. Este resultado sugiere que estos iones monovalentes son importantes ya sea por tratarse de un cotransporte de hemo con iones monovalentes (transporte activo secundario) o de un transporte que requiere la presencia de uno de estos iones para estabilizar al transportador o la interacción de la porfirina con el sitio de unión.

12.6. LmFLVCRb no exporta hemo

En humanos existen dos proteínas FLVCR, como se detalló en la introducción. Mientras que FLVCR2 es un importador de hemo, la proteína FLVCR1 es un exportador de hemo. Por lo tanto, se quiso estudiar si la proteína LmFLVCRb podría funcionar como un transportador bidireccional y exportar hemo además de importarlo.

Para llevar a cabo este análisis, se realizaron experimentos de eflujo en medio sin sustrato tras 2 h de carga con hemina, como se detalla en materiales y métodos, tomándose muestras de oocitos a diferentes tiempos. Igual que para los experimentos de captación, se midió el contenido intracelular de los oocitos por HPLC-MS/MS. Aunque podría existir una pérdida de la hemina captada por degradación metabólica, este componente debería ser similar en los oocitos, independientemente de que expresasen o no *LmFLVCRb*. Sin embargo, si el eflujo fuese mediado por el transportador, se esperaría una caída más rápida de las concentraciones de hemina en los oocitos que expresasen *LmFLVCRb*. La figura 20 muestra que la bajada de hemo intracelular en los oocitos control fue muy rápida en los 10 primeros min, llegando prácticamente a los niveles basales a las 2 h. Esto podría deberse al

establecimiento de un equilibrio entre las concentraciones de hemo dentro y fuera del oocito. Por otra parte, los oocitos inyectados con ARNm de *LmFLVCRb* no mostraron una mayor bajada del hemo intracelularlos oocitos que el control, sugiriendo que la presencia de la proteína *LmFLVCRb* en la membrana de los oocitos no favorece el eflujo de hemo.

13. Efecto de *LmFLVCRb* sobre la viabilidad del parásito

En primer lugar se estudió el efecto producido por la sobreexpresión del gen *LmFLVCRb* o la delección de uno de los alelos del gen en el crecimiento de las formas promastigotas del parásito. Para ello, se cuantificó su densidad celular en un cultivo durante cinco días consecutivos. La curva de crecimiento fue similar para los parásitos control, para los que sobreexpresaban el transportador y para los parásitos *LmFLVCRb*^{+/−}. Por tanto, esta variación en la expresión de *LmFLVCRb* a estos niveles no afectaba al crecimiento *in vitro* de los promastigotes (Fig. 21a). Próximamente estudiaremos la capacidad de estos parásitos de desarrollar su ciclo de vida dentro del insecto vector. En segundo lugar, estudiamos el efecto de la variación de la expresión de expresión de *LmFLVCRb* en amastigotes intracelulares. Para ello, se realizó un ensayo de infección *in vitro* de macrófagos derivados de células THP-1, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos, con formas promastigotes en fase estacionaria de las distintas líneas de parásitos (parásitos que sobreexpresaban la proteína: *LmFLVCRb*; promastigotes controles y parásitos con una expresión reducida de la misma:

IV. Resultados y discusión

LmFLVCRb^{+/+}). A los cinco días se cuantificó el índice AM, definido como el número de amastigotes intracelulares en 100 macrófagos. Como muestra la figura 21, los parásitos *LmFLVCRb^{+/+}* mostraron un índice AM significativamente menor que los parásitos control (Fig. 21b, 49,8 %, $p=0,07$). Por el contrario, los parásitos que sobreexpresaban *LmFLVCRb* presentaban un índice AM un 56 % superior (p) (Fig. 21b).

14. Virulencia de los parásitos *LmFLVCRb^{+/+}* en un modelo *in vivo*

Como los parásitos *LmFLVCRb^{+/+}* presentaban un valor de índice de efectividad menor en el ensayo *in vitro* con macrófagos THP-1, se estudió a continuación la capacidad que tenían estos parásitos para producir enfermedad en un modelo murino de leishmaniasis cutánea. Para ello, se infectaron ratones macho C57BL/6 con 1×10^6 promastigotes de *L. major* control y *LmFLVCRb^{+/+}* por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata trasera, como se indica en materiales y métodos. La inflamación de esta almohadilla se controló semanalmente durante 15 semanas (Fig. 22).

Los ratones infectados con los parásitos control comenzaron a desarrollar una inflamación progresiva y edema alrededor del sitio de la inyección en la segunda semana, alcanzando un nivel máximo a las tres semanas (Fig. 22). Por el contrario, los ratones infectados con parásitos *LmFLVCRb^{+/-}* mostraron muy poca inflamación, con diferencias mucho menores entre las almohadillas plantares de la pata infectada y no infectada (Fig. 22). A partir de la cuarta semana, los animales comenzaron a recuperarse lentamente, tal y como se espera en este modelo.

DISCUSIÓN

Leishmania es un organismo auxótrofo para el hemo y necesita tomarlo del hospedador. Cuando se comenzó esta parte del trabajo no se conocía cómo se llevaba a cabo la captación de hemo en el parásito. Como habíamos descrito que este proceso era mediado por una proteína (capítulo 1), que podría ser una atractiva diana terapéutica, entre otras aproximaciones tratamos de identificar al transportador responsable buscando en el genoma de *Leishmania* genes que codificaran a proteínas con homología a importadores de hemo conocidos en otros organismos.

En un primer momento no se identificaron proteínas homólogas a HCP1 de mamíferos (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005), CaFLC1 de *Candida albicans* (Protchenko, Rodríguez-Suárez et al. 2006), PUG1 de *S. cerevisiae* (Protchenko, Shakoury-Elizeh et al. 2008) o HRG-4 de *C. elegans* (Rajagopal, Rao et al. 2008). En este último caso, aunque se había descrito que CeHRG-4 era exclusiva de este gusano (Rajagopal, Rao et al. 2008), en concordancia con nuestros resultados buscando homólogos en *Leishmania*, posteriormente se identificó una proteína HRG en el parásito, de baja homología con CeHRG-4 ($\approx 15\%$ de identidad y $\approx 45\%$ de similitud con HRG-4) (Huynh, Yuan et al. 2012). Más tarde, se describió la proteína FLVCR2 como un importador de hemo en humanos (Duffy, Shing et al. 2010) por lo que buscamos proteínas homólogas en *L. major*. En este caso si se encontraron cuatro proteínas FLVCR en el parásito, de las que seleccionamos LmFLVCRb por ser la que mostraba un mayor porcentaje de identidad (23,4%) y similitud (50%) con la proteína FLVCR2 humana (Tabla 1).

Una serie de evidencias sugieren que LmFLVCRb es un transportador de hemo responsable de captar este compuesto, al menos en las formas promastigotas del parásito. En primer lugar, la capacidad de captar porfirinas (ZnMP y PPIX) del parásito depende de los niveles de expresión de LmFLVCRb. Así, la sobreexpresión de LmFLVCRb aumentó la captación de ZnMP en un 35% (Fig. 7) y también incrementó en un 40% la capacidad de formar hemo a partir de PPIX exógeno (Fig. 10a). Por el contrario, la delección de un alelo de LmFLVCRb redujo en un 60% la entrada de ZnMP (Fig. 7) y disminuyó en un 40% la capacidad de formar hemo a partir de PPIX (Fig. 10a). En segundo lugar, los niveles intracelulares de hemo en los promastigotes de *Leishmania* se correlacionan con el grado de expresión de LmFLVCRb. Efectivamente, la sobreexpresión del transportador aumentó los niveles intracelulares de hemo en un 125% mientras que la delección de un alelo los redujo en un 50%

(Fig. 8). Por otra parte, LmFLVCRb interacciona con el hemo, como demuestran los ensayos de precipitación con hemina-agarosa, y esta unión puede competirse con hemina libre (Fig. 9). Esta capacidad para unir hemo también se ha descrito para las proteínas FLVCR humanas HsFLVCR1 y HsFLVCR2, que también se precipitaban con hemina agarosa (Duffy, Shing et al. 2010). Este mismo ensayo de precipitación se ha realizado también para otras proteínas relacionadas con el transporte de hemo, como pueden ser ABCG2 de células de mamíferos (Krishnamurthy, Ross et al. 2004) y LABCG5 en *Leishmania* (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011). Además, LmFLVCRb se localiza en la membrana plasmática de los parásitos, como cabe esperar de un importador de hemo desde el exterior (Fig. 5). Finalmente, LmFLVCRb expresada de forma heteróloga en la membrana plasmática de oocitos de rana *X. laevis* (Fig. 14) transporta hemo al interior celular. Este modelo ha sido muy utilizado para estudiar proteínas transportadoras (Briz, Serrano et al. 2002). De hecho, también se ha utilizado en otras proteínas importadoras de hemo, como las proteínas HRG (CeHRG1, CeHRG4 y HsHRG1) (Rajagopal, Rao et al. 2008) o la proteína FLVCR2 humana (Duffy, Shing et al. 2010). En este último caso, el importe de hemo mediado por LmFLVCRb es casi cuatro veces mayor que el mediado por HsFLVCR2 (Duffy, Shing et al. 2010), aunque no podemos comparar los niveles de expresión de ambas proteínas. Además, los experimentos de eflujo realizados en este modelo de oocitos revelaron que la proteína LmFLVCRb no exporta hemo (Fig. 20), de forma equivalente a lo descrito para HsFLVCR2 (Quigley, Yang et al. 2004) y contrario al exporte de hemo mediado por HsFLVCR1 (Quigley, Yang et al. 2004). Por lo tanto, LmFLVCRb no funciona como un transportador bidireccional dependiente de gradiente, al contrario de lo que ocurre con otros MFS (Yang, Philips et al. 2010).

Esta función de LmFLVCRb como importador de porfirinas desde el exterior podría ser redundante con la descrita para LHR1 (Huynh, Yuan et al. 2012). Aunque en nuestras manos la sobreexpresión de LmHR1 no produce un aumento de la captación de hemo en el parásito, como ocurre al sobreexpresar LmFLVCRb, la delección de un alelo de *LmHR1* sí produce el mismo efecto de disminución en la captación de hemo que la delección de un alelo de *LmFLVCRb* (Fig. 22). Queda por determinar la importancia de cada uno de los genes a lo largo del ciclo de vida del parásito, tanto en el insecto vector como en el animal infectado, aunque los resultados en el modelo murino sugieren que ambos transportadores son importantes para la virulencia del parásito (Fig. 22). Por otra parte, además de localizarse en la membrana plasmática, ambas proteínas se localizan en el compartimento endolisosomal, donde LmHR1 es responsable de la salida del hemo proveniente de la lisis de la hemoglobina

IV. Resultados y discusión

endocitada hasta el citosol (Capítulo 2). LmFLVCRb no lleva a cabo este papel, como se deduce de los ensayos de formación *de novo* de hemo a partir ApoHb-PPIX, usado como precursor de hemo dirigido al lisosoma, en parásitos que sobreexpresan LmFLVCRb. Aunque no podemos asignar ningún papel funcional a la proteína LmFLVCRb lisosomal, una posibilidad es que su sobreexpresión por encima de niveles fisiológicos haga que parte de la proteína se dirija a este organelo para su degradación, como se ha descrito en el caso de otras proteínas sobreexpresadas. Sorprendentemente, la formación de hemo *de novo* a partir de ApoHb-PPIX en los parásitos con un alelo de *LmFLVCRb* deleciónado es mayor que en los parásitos control (Fig. 10b), contrariamente a lo que ocurre en parásitos con un alelo de *LmHR1* deleciónado, en los que disminuye a la mitad (Capítulo 2, Fig. 24b). Una posible explicación de este resultado es la sobreexpresión del gen *LmHR1* producida en los parásitos al deleciónar una copia de *LmFLVCRb* (Fig. 11). Esta sobreexpresión de *LmHR1* podría estar motivada por la disminución de los niveles de hemo intracelulares en los parásitos LmFLVCRb^{+/-}, ya que se ha demostrado que la depleción de hemo induce la expresión del gen LHR1 en el parásito (Huynh, Yuan et al. 2012). Estos mayores niveles de LmHR1 podrían ser por lo tanto los responsables en el lisosoma de la salida del PPIX proveniente de la ApoHb-PPIX endocitada, explicando el incremento en la síntesis *de novo* de hemo observado. Por otra parte, este mayor nivel de expresión de LmHR1 en los parásitos LmFLVCRb^{+/-} no se traduce en un aumento de la captación de porfirinas, que de hecho se reduce a la mitad en los parásitos con poca expresión de LmFLVCRb. Por lo tanto, la importancia de estos transportadores podría depender también de la fuente de hemo (hemoproteínas o porfirinas libres).

Independientemente de si LmFLVCRb y LmHR1 tienen papeles redundantes en la membrana plasmática, el transporte de hemo mediado por LmFLVCRb en el modelo de oocitos comparte numerosas características con el proceso de captación de porfirinas en promastigotes de *Leishmania*, descrito en el Capítulo 1: i) Depende de la temperatura, inhibiéndose considerablemente a 4 °C (Fig. 16); ii) Requiere la presencia de iones monovalentes como sodio y/o potasio (Fig. 19). Las proteínas FLVCR pertenecen a la superfamilia MFS, que constituye la superfamilia más amplia de transportadores secundarios activos, y muchos de sus miembros funcionan como simportes o antiportes de pequeños solutos conducidos por gradientes de H⁺ o Na⁺ (Pao, Paulsen et al. 1998). La molécula de hemo contiene dos carboxilatos que le confieren dos cargas negativas por lo que una posibilidad es que LmFLVCRb cotransporte iones positivos al importar el hemo. Sin embargo, no podemos descartar que estos iones sean requeridos para estabilizar la interacción del

sustrato con el sitio de unión o estabilizar al propio transportador. iii) Depende del pH, inhibiéndose a pH básico (Fig. 18); y iv) Se inhibe por la presencia de porfirinas en el exterior (Fig. 17).

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que *LmFLVCRb* podría ser una nueva diana terapéutica en el parásito. En primer lugar, y aunque no se trata de un resultado concluyente, como ocurría con *LmHR1* no se pudo obtener una línea homocigota sin el gen *LmFLVCRb*, lo que nos podría sugerir la importancia del gen para la supervivencia del parásito, al menos en las formas promastigotes. La reducción a la mitad del nivel de expresión de *LmFLVCRb* al delecionar un alelo del gen no parece tener efecto sobre el crecimiento de las formas promastigotes del parásitos (Fig. 21a), al menos *in vitro*, igual que ocurre para la proteína HRG de *L. major* (Capítulo 2, Fig. 21d) y *L. amazonensis* (Huynh, Yuan et al. 2012). Esto podría deberse a que los niveles requeridos de estas proteínas en las condiciones de cultivo *in vitro* de las formas promastigotas se puedan alcanzar con una sola copia del gen. En segundo lugar, la bajada de la expresión de *LmFLVCRb* en los parásitos con un alelo del gen eliminado produce una disminución en la cantidad de amastigotes intracelulares en los macrófagos (Fig. 21b). Un resultado similar ocurre al delecionar un alelo de *LaHR1* en *L. amazonensis* (Miguel, Flannery et al. 2013). Por el contrario, la sobreexpresión de *LmFLVCRb* aumenta la carga parasitaria de los macrófagos (Fig. 21b). Además, la eliminación de un alelo del gen *LmFLVCRb* reduce severamente la virulencia de los parásitos en un modelo *in vivo* de leishmaniasis cutánea (Fig. 22), en un nivel similar al producido por la delección de un alelo de *LmHR1* (Capítulo 3, Fig. 1). Finalmente, resultados de ARN de interferencia con el único gen *FLVCR* presente en *T. brucei* sugieren que el transportador es esencial en las formas sanguíneas de este parásito (María Cabello-Donayre y col., resultados no mostrados), aunque por el momento se desconoce su localización y la función de podría realizar.

Queda pendiente determinar el posible papel de los otros tres miembros de la familia *FLVCR* de *Leishmania* en el tráfico de hemo en el parásito. Aunque no hemos profundizado en su estudio, resultados preliminares muestran que estas proteínas podrían localizarse en la membrana plasmática y en el bolsillo flagelar (*LmFLVCRc* y *LmFLVCRd*) y posiblemente en la mitocondria (*LmFLVCRa*), además de en otros orgánulos intracelulares (María Cabello-Donayre y col., resultados no mostrados). La sobreexpresión de estas proteínas no aumenta la captación de hemo (María Cabello-Donayre y col., resultados no mostrados) pero, de forma interesante, en algún caso confiere resistencia a antimoniales en amastigotes intracelulares

IV. Resultados y discusión

(resultados provisionales en colaboración con los Dres. Francisco Gamarro y Raquel García-Hernández).

Como conclusión, en esta parte del trabajo hemos caracterizado LmFLVCRb, el primer miembro de la familia FLVCR descrito en *Leishmania*. Los resultados obtenidos sugieren que LmFLVCRb es un transportador de hemo localizado en la membrana plasmática del parásito y es responsable, al menos en parte, de la captación de hemo a las formas promastigotas del parásito. Finalmente, hemos mostrado datos que sugieren que LmFLVCRb podría ser una buena diana terapéutica, ya que la eliminación de uno sólo de sus alelos impide una replicación adecuada como amastigotes intracelulares y el desarrollo de virulencia en un modelo *in vivo* de leishmaniasis cutánea.

Los resultados de este Capítulo forman parte del manuscrito en preparación “A yeast-based high-throughput screen identifies inhibitors of TrypHRG haem transporters with potent trypanocidal activity.” , Cabello-Donayre M., et al.

Capítulo 4: Identificación de inhibidores de transportadores TrypHRG con potente actividad tripanocida utilizando un cribado de alto rendimiento en levaduras

Los transportadores HRG de *T. brucei* y *Leishmania* (y probablemente de *T. cruzi*) son esenciales en los parásitos e incluso la eliminación de un alelo del gen LHR1 de *Leishmania* impide el desarrollo de la leishmaniasis en modelos animales. Con el objetivo de identificar inhibidores de estas proteínas TrypHRG con actividad tripanocida, y aprovechando la posibilidad de expresar los transportadores funcionalmente en levaduras, quisimos desarrollar un ensayo que permitiera el cribado de alto rendimiento dirigido a diana dentro de un contexto celular eucariota.

RESULTADOS

1. Las proteínas TrypHRG como nuevas dianas terapéuticas

Como se indicó anteriormente, LaHR1 de *L. amazonensis* ha sido propuesta como diana terapéutica en base a que i) no es posible generar parásitos KO para el gen (Huynh, Yuan et al. 2012); ii) la eliminación de un alelo impide la virulencia en modelos animales (Miguel, Flannery et al. 2013); y iii) el grado de funcionalidad de LaHR1 se correlaciona con el grado de desarrollo de la enfermedad en este modelo murino (Renberg, Yuan et al. 2015).

De igual modo, en nuestros estudios con LmHR1 de *L. major* (Capítulo 2) tampoco hemos podido generar parásitos KO para el gen. Como disponíamos de parásitos con una copia del gen LmHR1 delecionada (*LmHR1^{+/-}*), quisimos confirmar su rol en la virulencia, en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.

Para ello, se infectaron ratones macho C57BL/6 con 1×10^6 promastigotes en fase estacionaria de *L. major* control y *LmHR1^{+/-}* en la almohadilla plantar de la pata trasera, por vía subcutánea, como se indica en el apartado de materiales y métodos. La inflamación de esta almohadilla se controló semanalmente durante 15 semanas (Fig. 1).

IV. Resultados y discusión

Los ratones que habían sido infectados con los parásitos control desarrollaron una inflamación progresiva y edema en la almohadilla plantar inyectada en torno a la segunda semana. El nivel máximo de inflamación se alcanzó a las tres semanas, después de lo cual la almohadilla de la pata trasera infectada comenzó a recuperarse lentamente, tal y como se espera en este modelo. Por el contrario, los ratones infectados con parásitos *LmHR1^{+/-}* mostraron muy poca inflamación en la almohadilla de la pata, con diferencias mínimas entre las almohadillas plantares de la pata infectada y no infectada.

En el caso de *T. brucei*, como se describió en el Capítulo 2 la disminución de la expresión de TbHRG en las formas sanguíneas del parásito mediante ARN de interferencia provocaba su muerte (Fig. 2, tomada del Capítulo 2).

Estos resultados refuerzan la idea de utilizar las proteínas HRG de tripanosomátidos como diana farmacológica para el desarrollo de nuevos fármacos tripanocidas.

2. La expresión funcional de TrypHRG en levaduras auxótrofas para el hemo posibilita la búsqueda de inhibidores en este modelo en formato HTS

La cepa de *S. cerevisiae* $\Delta hem1$ es auxótrofa para el hemo ya que tiene deletado el gen que codifica la enzima ALA sintasa. Las levaduras $\Delta hem1$ sólo pueden crecer en presencia de ALA, el producto de la enzima ausente *Hem1*, o de concentraciones elevadas de hemina o hemoglobina, que pueden entrar a las células de las levaduras en estas condiciones a través de un mecanismo desconocido (Weissman, Shemer et al. 2008). Como se describió en el Capítulo 2, la expresión de las proteínas HRG de *L. major* y *T. brucei* capacita a esta cepa

mutante de levaduras para crecer en presencia de bajas concentraciones de hemo y hemoglobina. En estas levaduras, las proteínas TrypHRG tienen una doble localización: en la membrana plasmática, desde donde se ha descrito que median el importe de hemo desde el exterior, y en la membrana de la vacuola digestiva, donde hemos propuesto que median la entrada al citosol del hemo procedente de la hemoglobina endocitada. Por lo tanto, estas levaduras expresando los transportadores de los parásitos podrían usarse para buscar inhibidores de la diana en un contexto celular, en formato de alto rendimiento y de forma barata. Este cribado podría llevarse a cabo tanto midiendo la inhibición del crecimiento producida al inhibir los transportadores TrypHRG, como observando la inhibición de la actividad catalasa, monitorizada como formación de espuma según se describió anteriormente.

Como prueba de concepto, hemos llevado a cabo un rastreo de una pequeña quimioteca formada por 1007 compuestos, la mayoría de ellos (1000) fármacos de reposición y el resto (7) antioxidantes alimentarios aprobados para su uso. Los fármacos de reposición son fármacos en uso para otras indicaciones terapéuticas y, por tanto, su toxicidad, farmacodinámica y farmacocinética son conocidos. Los antioxidantes utilizados son moléculas (naturales o sintéticas) presentes de forma natural en la dieta humana o empleados como aditivos o conservantes por la industria alimentaria, por lo que también se conoce bien su toxicidad, etc.

Como diana, además de TbHRG de *T. brucei* (enfermedad del sueño) y LmHR1 de *L. major* (leishmaniasis cutánea) usamos LdHR1, de *L. donovani* (leishmaniasis visceral). Para ello, en primer lugar, clonamos el gen HRG de *L. donovani* (LdHR1) en el plásmido de expresión constitutiva pDR y se transformaron levaduras $\Delta hem1$ con esta construcción y confirmamos que producía un fenotipo similar al descrito para LmHR1 en el Capítulo 2 (dato no mostrado).

2.1. Ensayo de inhibición del crecimiento. Cálculo del valor Z del minitest

El cribado de los inhibidores de las proteínas TrypHRG en las levaduras se realizó en colaboración con la Fundación Medina (PTS-Granada), utilizando placas de 96 pocillos y un volumen de ensayo de 100 μ l por pocillo. Para ello, se adaptaron los ensayos de funcionalidad descritos en el Capítulo 2. Las levaduras $\Delta hem1$ transformadas con las proteínas HRG y el

control (transformadas con el plásmido vacío) se sembraron en una placa de 96 pocillos a una DO inicial de 0.1, en presencia de 0.05 μM de hemoglobina, y se midió la DO al cabo de 24 h. Se utilizó 10 μM de hemo y 2,5 μM de hemoglobina como control positivo de crecimiento.

El valor Z es un coeficiente estadístico adimensional que refleja tanto el rango dinámico de la señal del ensayo como la variación de los datos asociada a las mediciones de la señal, y se trata, por tanto, de un parámetro adecuado para la evaluación de la calidad del ensayo. Para cualquier ensayo, el valor de Z sólo es significativo cuando se encuentra dentro del rango $-1 \leq Z \leq 1$. Por debajo de 0, el cribado no se puede realizar. Si $Z=0$, se trata de un ensayo “si/no”. Entre 0 y 0.5 el test no es fiable mientras que cuando Z tiene un valor de entre 0,5 y 1, se trata de un ensayo excelente (Zhang, Chung et al. 1999).

El cálculo del valor Z se realizó, siguiendo la fórmula descrita en materiales y métodos, con los valores de DO leídos a una λ de 600 nm de las levaduras transformadas (TrypHRG) y las levaduras control (plásmido vacío) en presencia de 0,05 μM de hemoglobina. Como se observa en la tabla 1, el valor Z observado para cada caso validaba el ensayo al ser siempre mayor que 0,5.

LmHR1	LdHR1	TbHRG
0,87	0,87	0,84

2.2. Minitest para observar la pérdida de actividad catalasa al inhibir los transportadores TrypHRG

Como se explicó en el Capítulo 2, las catalasas de las levaduras son hemoproteínas reguladas por hemo por lo que la actividad catalasa puede ser utilizada como un marcador endógeno para medir los niveles intracelulares de hemo (Kathiresan, Martins et al. 2014). Esta actividad catalasa es posible medirla con un ensayo sencillo que no requiere lisis celular (Iwase, Tajima et al. 2013), consistente en la visualización de la espuma producida por las burbujas de oxígeno, generadas por la catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno, atrapadas en el detergente añadido.

IV. Resultados y discusión

Previamente (Capítulo 2) habíamos descrito que las levaduras $\Delta hem1$ control incubadas en presencia de $0,5 \mu\text{M}$ Hb tenían una actividad catalasa baja mientras que las levaduras $\Delta hem1$ que expresan TrypHRG incubadas en las mismas condiciones presentaban una significativa actividad catalasa (Figs. 9 y 18, Capítulo 2).

Por lo tanto, la ausencia de espuma también podría usarse para determinar qué compuestos ejercían una actividad inhibitoria de las proteínas HRG. Este ensayo facilitaría el cribado de los compuestos que tenían actividad inhibitoria de las proteínas TrypHRG de forma visual.

Para adaptar el ensayo a placas de 96 pocillos, en primer lugar estudiamos la cantidad de hemoglobina necesaria para visualizar la espuma en las levaduras transformadas con las proteínas TrypHRG pero no en los controles. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (factor 1:2) en presencia de concentraciones de hemoglobina, en un rango de 0 a $2,5 \mu\text{M}$ y se añadieron las levaduras $\Delta hem1$ transformadas con el plásmido vacío o con los plásmidos que contenían las secuencias que codificaban las proteínas TrypHRG (DO final de 0,1). Tras incubarlas 24 h en agitación a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, se añadió peróxido de hidrógeno y detergente. Se observó que a partir de una concentración de $0,313 \mu\text{M}$ se generaba espuma para todas las proteínas TrypHRG, por lo que se seleccionó una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ de hemoglobina para la realización de este ensayo.

3. Identificación de “hits”

3.1 Selección de posibles “hits”

Para el primer cribado se utilizaron los compuestos a 20 μM en placas de 96 pocillos. Esta concentración relativamente alta se eligió debido a que el fármaco ensayado debía atravesar la pared celular de las levaduras (ausente en los parásitos), que va a presentar una barrera a la entrada del fármaco. Como la cantidad de cada compuesto en la quimioteca era limitado, en el primer cribado se utilizaron sólo las levaduras transformadas con la proteína TbHRG, que eran las levaduras que habían presentado un mayor crecimiento en presencia de concentraciones bajas de hemoglobina (Fig.10 del Capítulo 2) y las que habían presentado una mayor actividad catalasa para una misma concentración de hemoglobina (Fig. 3).

Por un lado, se midió el crecimiento (DO_{600}) de las distintas levaduras crecidas en presencia de 0,05 μM de hemoglobina en un lector de placas. Tras analizar los datos, se seleccionaron aquellos compuestos que habían producido una inhibición del crecimiento mayor del 75 %.

Por otro lado, para el cribado visual de la inhibición de la actividad catalasa, se añadió Triton x-100 1 % y agua oxigenada a las placas de levaduras crecidas a 0,5 μM de hemoglobina y se realizaron fotos de cada placa. La imagen 2 muestra el resultado de una de estas placas, en la que aparecen tres compuestos positivos. Estos tres compuestos positivos aparecen en los dos ensayos y esta correlación se mantuvo para todo el ensayo (Fig. 4). Por lo tanto, no llevamos a cabo ningún control de la posible inhibición de la actividad catalasa por parte de los compuestos seleccionados.

Este ensayo de rastreo de los compuestos de la colección original que tenían efecto inhibitorio sobre la proteína TbHRG se realizó de forma independiente dos veces.

De esta forma, de los 1007 compuestos de la colección se seleccionaron 69 compuestos (un 6,85 %).

3.2. Eliminación de los compuestos tóxicos en levaduras

La selección de los compuestos en el apartado anterior se hizo en función de su capacidad de inhibir el crecimiento de las levaduras o su actividad catalasa. Este efecto puede deberse a la inhibición de los transportadores TrypHRG pero también a un efecto fungicida de los fármacos. Para descartar estos compuestos tóxicos para las levaduras se obtuvieron curvas de dosis-respuesta con los 69 compuestos seleccionados usando levaduras control (crecidas en presencia de ALA) y levaduras transformadas con las tres proteínas HRG de *L. major*, *L. donovani* y *T. brucei* (crecidas en presencia de 0,05 μM de Hb). A partir de estas curvas se determinó la EC₅₀ (concentración de fármaco requerida para la inhibición de la

mitad de la tasa máxima de crecimiento celular (Gómez-Pérez, García-Hernández et al. 2016)) de los 69 compuestos.

La figura 5 muestra cuatro ejemplos de tipos de curvas de dosis-respuesta obtenidos para los compuestos analizados: a) compuestos positivos por mostrar sólo efecto inhibitorio sobre las levaduras que expresan TrypHRG; b) compuestos positivos, por mostrar mayor efecto inhibitorio (al menos dos veces) sobre las levaduras que expresan TrypHRG que sobre las levaduras control; c) compuestos negativos, por no mostrar actividad inhibitoria sobre ninguna de las levaduras a las concentraciones ensayadas; y d) compuestos negativos, por ser igual de tóxico para las levaduras control que para las que expresan TrypHRG

En el caso de *T. brucei*, de los 27 compuestos ensayados por el momento 16 mostraron una IC₅₀ por debajo de 10 µM (59,3 %). De ellos, 4 la tuvieron entre 1 y 10 µM, 8 entre 0,1 y 1 µM y 4 por debajo de 0,1 µM. Dentro de este último grupo que engloba los compuestos más activos frente a *T. brucei*, los valores de IC₅₀ obtenidos fueron de 3 nM (compuesto 8), 15 nM (compuesto 26), 64 nM (compuesto 23) y 77 nm (compuesto 32).

En el caso de *Leishmania*, de los 28 compuestos ensayados 14 mostraron una IC₅₀ por debajo de 10 µM (50,0 % de los ensayados). De ellos, 2 mostraron una IC₅₀ entre 1 y 10 µM, mientras que 10 mostraron un valor de entre 0,1 y 1 µM y 2 lo hacían por debajo de 0,1 µM. Estos últimos serían los fármacos más activos frente a *Leishmania*, mostrando un valor de IC₅₀ de 30 nM (compuesto 15) y 67 nM (compuesto 32).

	IC ₅₀ (1-10 µM)	IC ₅₀ (0,1-1 µM)	IC ₅₀ (<1 µM)
<i>Trypanosoma brucei</i>	4	8	4
<i>Leishmania major</i>	2	10	2

Tabla 3. Resumen de la actividad antiparasitaria de los compuestos identificados.

La mayoría de los compuestos activos mostraron efecto inhibitorio frente a los dos parásitos, como era de esperar si la diana sobre la que están actuando son las proteínas HRG de cada organismo. No obstante, 3 de los compuestos con actividad tripanocida no mostraron actividad leishmanicida.

DISCUSIÓN

La auxotrofia para el hemo de los parásitos tripanosomátidos ya fue considerada como un talón de Aquiles hace más de 80 años (Lwoff 1933). Esto es debido a que, aunque necesitan el grupo hemo, no pueden sintetizarlo por lo que deben rescatarlo del hospedador (Dutta, Furuyama et al. 2008, Aslett, Aurrecochea et al. 2010) . En *Leishmania* se conocen numerosas hemoproteínas esenciales, como los citocromos b5 y c (Tripodi, Menendez Bravo et al. 2011). Por el contrario, hasta hace poco tiempo no se ha validado la primera hemoproteína esencial en las formas sanguíneas de *T. brucei*, la enzima esterol 14 α -demetilasa (CYP51) (Dauchy, Bonhivers et al. 2016), esencial para la síntesis del ergosterol que es el esterol principal de su membrana plasmática (Lepesheva, Park et al. 2010). Esta hemoproteína también es esencial para otros tripanosomátidos (Lepesheva and Waterman 2011), y de hecho es un blanco de acción de fármacos frente a estos parásitos (Buckner and Urbina 2012, McCall, El Aroussi et al. 2015). Las proteínas involucradas en el rescate de hemo del hospedador humano podrían ser por lo tanto atractivas dianas terapéuticas sobre las que dirigir nuevos fármacos.

Un caso interesante es el de los transportadores HRG de tripanosomátidos. Estudios de ARN de interferencia sugieren que son esenciales para las formas sanguíneas de *T. brucei* (Fig. 2) al rescatar el hemo proveniente de la hemoglobina, que es endocitada acompañada a la haptoglobina a través del receptor TbHpHbR (Vanhollebeke, De Muylder et al. 2008). En *Leishmania*, el transportador HRG también es esencial y realiza dos funciones. Por un lado, media la entrada del grupo hemo desde el espacio extracelular al citosol (Huynh, Yuan et al. 2012) y, por otro lado, media la salida del hemo del lisosoma al citosol procedente de la hemoglobina endocitada (capítulo 2). Además, la baja similitud entre las proteínas HRG de tripanosomátidos y la única proteína HRG humana (entre 14-18 % de identidad) podría hacer posible el desarrollo de inhibidores específicos contra estas proteínas transportadoras de los parásitos. Por lo tanto, la inhibición de las proteínas HRG de tripanosomátidos representa una prometedora ruta para el control de las enfermedades desatendidas producidas por los parásitos que estamos mencionando. Para validar esta idea, en colaboración con la Fundación MEDINA (Fundación Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, consorcio público-privado entre Merck Sharp & Dohme, la Junta de Andalucía y la

UGR), se ha realizado un cribado de alto rendimiento (Ivens, Peacock et al.) con el fin de identificar inhibidores de las proteínas HRG de tripanosomátidos con actividad tripanocida.

Los cribados HTS suelen llevarse a cabo mediante dos aproximaciones diferentes: ensayos fenotípicos, usando células vivas (Mackey, Baca et al. 2006), y ensayos dirigidos a dianas, usando ensayos bioquímicos *in vitro* (Norcliffe, Álvarez-Ruíz et al. 2014, Denny and Steel 2015). Ambas aproximaciones tienen sus inconvenientes. Los ensayos fenotípicos, basados en células, no revelan la diana del hit identificado y requieren el cultivo de células (parásitos). Por su parte, las metodologías *in vitro* carecen de un contexto celular, suelen requerir la purificación de proteína soluble. Además, ambos suelen ser caros y en muchos casos, difíciles de miniaturizar. El uso de un ensayo como el que mostramos, basado en levaduras que expresan las dianas de los parásitos, puede salvar estos obstáculos ya que ofrece una plataforma barata para el cribado de alto rendimiento dirigido a diana dentro de un contexto celular eucariota. De hecho, este tipo de ensayos se han propuesto recientemente como una buena alternativa para buscar fármacos frente a enfermedades olvidadas (Norcliffe, Álvarez-Ruíz et al. 2014, Denny and Steel 2015, Balaña-Fouce and Reguera 2016)

Para ello, hemos aprovechado la capacidad de expresar funcionalmente estos transportadores TrypHRG (TbHRG de *T. brucei*, LmHR1 de *L. major* y LdHR1 de *L. donovani*) en levaduras auxótrofas para el hemo ($\Delta hem1$). Estas levaduras no son capaces de crecer en presencia de bajas concentraciones de hemina o hemoglobina salvo que expresen alguno de estos TrypHRG. Por lo tanto, hipotetizamos que, en presencia de un inhibidor de estos transportadores, las levaduras no podrían crecer, lo que puede visualizarse fácilmente midiendo su DO_{600} . La disminución del hemo intracelular también puede visualizarse fácilmente observando la espuma formada por la actividad de la catalasa, usada como hemoproteína reportera, como se muestra en la figura 4. Para adaptarlo a formato HTS, hemos puesto a punto la miniaturización del ensayo en placas de 96 pocillos (que podría extrapolarse al formato de 384 pocillos), obteniéndose valores de Z de 0.84.

La quimioteca de fármacos de reposición usada, suministrada por la empresa Neuron BioPharma S.A. (NEURON), está formada por fármacos aprobados para su uso clínico en patologías diferentes a la leishmaniasis o la tripanosomiasis. La ventaja de este tipo de fármacos es que en su mayoría son de administración oral y se dispone de gran información sobre su toxicidad, farmacocinética y farmacodinámica. Esto permite ahorrar tiempo y costes

IV. Resultados y discusión

en el caso de que llegara a usarse alguno de estos compuestos en ensayos clínicos. De hecho, esta aproximación de usar fármacos de reposición frente a parásitos responsables de enfermedades olvidadas ha sido explorada previamente (Mackey, Baca et al. 2006, Padhy and Gupta 2011, Kaiser, Maser et al. 2015, Sbaraglini, Vanrell et al. 2016). A esta colección añadimos varios antioxidantes, de origen natural y sintético, en uso en la industria alimentaria, con perfiles de seguridad bien caracterizados (Durazzo 2017).

Tras realizar el cribado de la colección en el minitest desarrollado y desechar los compuestos con toxicidad frente a las levaduras, se seleccionaron 36 compuestos (3.57 % del total) capaces de impedir el crecimiento de las levaduras mediado por los transportadores TrypHRG. La mayoría de estos compuestos (29) han sido ya ensayados frente a las formas sanguíneas de *T. brucei* y las formas promastigotas de *L. major* (el análisis del resto de compuestos también se llevará a cabo). Aunque estas formas promastigotas son clínicamente menos interesantes, sirven para validar el test ya que LmHR1 es esencial en este estadio. Independientemente, en un futuro también se ensayarán frente a las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani*. Alrededor de la mitad de estos compuestos seleccionados en levaduras mostraron actividad ($IC_{50} < 10 \mu M$) frente a *T. brucei* y *Leishmania*. La mayoría de los compuestos activos (cerca del 80 %) fueron efectivos frente a *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*. El hecho de que sean compuestos activos para las dos especies apoya que inhiban una proteína común en ambas especies, como podrían ser las proteínas HRG. De hecho, en el ensayo de levaduras estos compuestos inhibieron todos los transportadores TrypHRG. No obstante, algunos compuestos son activos sólo frente a uno de los parásitos, como por ejemplo el compuesto 23, activo sólo para *T. brucei*. Este resultado podría deberse a que los compuestos fueran internalizados con mayor eficacia en un parásito en comparación con el otro, o a que estén llevando su acción antiparasitaria inhibiendo una diana diferente a los TrypHRG.

Entre los compuestos activos encontramos algunos cuyo efecto frente a *Leishmania* spp. y/o *T. brucei* ya se ha descrito en la literatura, aunque en la mayoría de los casos no se conoce su diana. La actividad tripanocida del compuesto 32 (IC_{50} de 77 nM), utilizado como antihelmíntico, fue ya descrita en otro ensayo HTS fenotípico utilizando una colección de 2160 fármacos de reposición, en el que no se identificó su diana de acción, aunque la IC_{50} encontrada fue de 3 μM (Mackey, Baca et al. 2006). Este compuesto ha mostrado además un efecto importante frente a la forma promastigote de *L. major* (IC_{50} de 67 nM), no descrito en la literatura. Para el compuesto 2 (IC_{50} de 1.09 μM frente a *L. major*), un fármaco utilizado

para tratar la arritmia, se describió un actividad inhibitoria submicromolar frente a las formas amastigotes de *L. amazonensis* (de Macedo-Silva, de Oliveira Silva et al. 2011). Para análogos del anterior, también usados para tratar la arritmia, se ha descrito una actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. mexicana* a concentraciones subnanomolares (Benaim, Casanova et al. 2014). El compuesto 16, utilizado en el tratamiento del alcoholismo crónico, fue identificado previamente como potencial agente leishmanicida (Chavali, Blazier et al. 2012). Como último ejemplo en este grupo, el compuesto 27 (IC₅₀ de 579 nM en *L. major*) tiene actividad leishmanicida conocida (El-On and Messer 1986) y de hecho es un componente de una crema leishmanicida en uso para tratar la leishmaniasis cutánea, aunque no se conoce su mecanismo de acción. La actividad tripanocida encontrada (IC₅₀ de 558 nM) no ha sido descrita en la literatura.

Por otra parte, para muchos de los compuestos identificados como activos no hemos encontrado ninguna descripción de actividad frente a estos parásitos tripanosomatidos. Entre ellos estarían el compuesto 3 (IC₅₀ de 119 nM frente a *T. brucei* y 146 nM frente a *L. major*), el compuesto 10 (IC₅₀ de 231 nM frente a *T. brucei* y 189 nM frente a *L. major*) el compuesto 12 (IC₅₀ de 1.80 µM frente a *L. major*) y el compuesto 26 (IC₅₀ de 15 nM frente a *T. brucei*). Tampoco se ha descrito actividad frente a estos parásitos del compuesto 9 (IC₅₀ de 1.79 µM frente a *T. brucei* y 531 nM frente a *L. major*), que sin embargo se ha usado experimentalmente en la producción de liposomas para encapsular agentes leishmanicidas (Dasgupta, Adhya et al. 2002). A su vez, el compuesto 11 (IC₅₀ de 293 nM frente a *T. brucei* y 299 nM frente a *L. major*) se ha usado para prevenir infecciones asociadas a leishmaniasis mucosa (Abbas, Musatafa et al. 2009). Finalmente, uno de los antioxidantes de uso en alimentación ensayados (compuesto 23) ha demostrado también una actividad tripanocida (IC₅₀ de 64 nM) previamente no descrita.

Además de las proteínas HRG de parásitos tripanosomátidos, esta familia de transportadores está presente en otros patógenos causantes de enfermedades humanas. Por ejemplo, el nematodo causante de la filariasis en humanos (*Brugia malayi*) también es auxótrofo para el hemo por lo que debe adquirirlo del hospedador, probablemente a través de una proteína HRG (BmHRG-1) (Luck, Yuan et al. 2016). Además, las proteínas HRG también son importantes para organismos vectores de enfermedades para el humano y otros animales, como ocurre con las garrapatas (Perner, Sobotka et al. 2016). Por tanto, inhibidores de las proteínas HRG podrían tener un uso mucho más amplio. Por el contrario, también existe una proteína HRG en el hombre que lleva a cabo un papel importante en el reciclaje del

IV. Resultados y discusión

hemo proveniente de los eritrocitos senescentes. Por lo tanto, sería importante comprobar que los inhibidores identificados no afecten al transportador humano, que por otra parte muestra una baja identidad con el de los parásitos (alrededor del 15 %). El uso de levaduras que sobreexpresen el transportador humano permitiría estudiar fácilmente la especificidad de los distintos inhibidores.

Como conclusión, en este último capítulo hemos validado un ensayo basado en levaduras que permite el cribado de alto rendimiento de inhibidores de los transportadores HRG de parásitos tripanosomátidos. Muchos de los inhibidores identificados han mostrado una actividad en el orden submicromolar sobre formas sanguíneas de *T. brucei* y promastigotas de *L. major*. Además de haber tenido éxito como prueba de concepto para un futuro rastreo de colecciones de mayor número de compuestos, algunos de los inhibidores identificados pueden ser interesantes ya que provienen de una colección de fármacos en uso clínico, por lo que se conoce bien sus perfiles de seguridad.



1. La entrada de porfirinas en formas promastigotas de parásitos del género *Leishmania* spp. es dependiente de energía, temperatura y pH, saturable por concentraciones crecientes de porfirina y requiere la presencia de cationes monovalentes. Por lo tanto, se trata de un proceso mediado por un transportador específico, que es inducible en condiciones de ausencia de hemo.
2. Las formas promastigotas de *Leishmania* spp. pueden evitar la acumulación de porfirinas potencialmente tóxicas mediante un proceso activo de eflujo.
3. Las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* expresan una proteína HRG (TbHRG) esencial para el parásito y localizada en el compartimento endolisosomal.
4. *Leishmania* spp. y *Trypanosoma brucei* rescatan el grupo hemo procedente de la hemoglobina endocitada a través de transportadores HRG endolisomales.
5. LmFLVCRb, el primer miembro de la familia FLVCR descrito en parásitos tripanosomátidos, se localiza en la membrana plasmática de *Leishmania* y contribuye a la captación del grupo hemo en las formas promastigotas del parásito. Cuando se expresa heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*, LmFLVCRb se localiza en la membrana plasmática e importa hemo al interior celular. Este transporte requiere la presencia de cationes monovalentes y depende de temperatura y pH.
6. La eliminación de un alelo del gen *LmFLVCRb* disminuye la virulencia de *L. major* en un modelo murino de leishmaniasis cutánea sugiriendo que no sería necesario inhibir completamente el transportador para controlar la enfermedad.
7. Para identificar inhibidores de los transportadores HRG de parásitos tripanosomátidos se ha desarrollado un ensayo en levaduras que permite llevar a cabo un cribado de alto rendimiento dirigido a diana dentro de un contexto celular eucariota.
8. Utilizando este ensayo en levaduras se ha cribado una librería compuesta por fármacos de reposición y antioxidantes en uso en la industria alimentaria que ha permitido la selección de inhibidores de los transportadores HRG de *T. brucei* y *Leishmania* spp. Algunos de los compuestos seleccionados han mostrado *in vitro* una actividad tripanocida y leishmanicida en el orden nanomolar.



VI. Bibliografía

Abbas, K., Musatafa, M.A., Abass, S., Kheir, M.M., Mukhtar, M., Elamin, E.M. and Elhassan, A.M. (2009). "Mucosal leishmaniasis in a Sudanese patient." Am J Trop Med Hyg 80(6): 935-938.

Agarwal, S., Rastogi, R., Gupta, D., Patel, N., Raje, M. and Mukhopadhyay, A. (2013). "Clathrin-mediated hemoglobin endocytosis is essential for survival of *Leishmania*." Biochim Biophys Acta 1833(5): 1065-1077.

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votypka, J., Marty, P., Delaunay, P. and Sereno, D. (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies." PLoS Negl Trop Dis 10(3): e0004349.

Akilov, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K. and Hasan, T. (2007). "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 16(8): 651-660.

Alderete, J.F., Nguyen, J., Mundodi, V. and Lehker, M.W. (2004). "Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*." Microb Pathog 36(5): 263-271.

Alsford, S., Turner, D.J., Obado, S.O., Sánchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., Hertz-Fowler, C. and Horn, D. (2011). "High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome." Genome Res 21(6): 915-924.

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J.G. and den Boer, M. (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS one 7(5): e35671.

Alves, J.M., Voegtly, L., Matveyev, A.V., Lara, A.M., da Silva, F.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Teixeira, M.M. and Camargo, E.P. (2011). "Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts." PLoS One 6(8): e23518.

Ascoli, F., Fanelli, M.R. and Antonini, E. (1981). "Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins." Methods Enzymol 76: 72-87.

Ashutosh, Sundar, S. and Goyal, N. (2007). "Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*." J Med Microbiol 56(Pt 2): 143-153.

Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M.J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W., Logan, F.J., Miller, J.A., Mitra, S., Myler, P.J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D.F., Ramasamy, G., Rogers, M.B., Roos, D.S., Ross, C., Sivam, D., Smith, D.F., Srinivasamoorthy, G., Stoeckert, C.J., Jr., Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G. and Wang, H. (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." Nucleic Acids Res 38(Database issue): D457-462.

Balaña-Fouce, R. and Reguera, R.M. (2016). "Yeast-based systems for tropical disease drug discovery." Expert Opin Drug Discov 11(5): 429-432.

Balaña-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubria, J.C. and Ordóñez, D. (1998). "The pharmacology of leishmaniasis." Gen Pharmacol 30(4): 435-443.

VI. Bibliografía

- Banuls, A.L., Hide, M. and Prugnolle, F. (2007).** "*Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." Adv Parasitol 64: 1-109.
- Barrett, M.P. and Croft, S.L. (2012).** "Management of trypanosomiasis and leishmaniasis." Br Med Bull 104: 175-196.
- Barrett, M.P., Vincent, I.M., Burchmore, R.J., Kazibwe, A.J. and Matovu, E. (2011).** "Drug resistance in human African trypanosomiasis." Future Microbiol 6(9): 1037-1047.
- Barupala, D.P., Dzul, S.P., Riggs-Gelasco, P.J. and Stemmler, T.L. (2016).** "Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors." Arch Biochem Biophys 592: 60-75.
- Benaim, G., Casanova, P., Hernández-Rodríguez, V., Mújica-González, S., Parra-Giménez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, J.L., Liu, Y.L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A. and Suárez, A.I. (2014).** "Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy." Antimicrob Agents Chemother 58(4): 2295-2303.
- Bermúdez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J.P. and Palma, S. (2016).** "Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease." Acta Trop 156: 1-16.
- Bhandari, V., Sundar, S., Dujardin, J.C. and Salotra, P. (2014).** "Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother 58(5): 2580-2585.
- Blackmon, J., Dailey, T.A., Lianchun, X. and Dailey, H.A. (2002).** "Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein." Arch Biochem Biophys 407(2): 196-201.
- Blázquez, A.G., Briz, O., Romero, M.R., Rosales, R., Monte, M.J., Vaquero, J., Macías, R.I., Cassio, D. and Marín, J.J. (2012).** "Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta." Mol Pharmacol 81(2): 273-283.
- Bradford, M.M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Briz, O., Serrano, M.A., Rebollo, N., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Koepsell, H. and Marín, J.J. (2002).** "Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells." Mol Pharmacol 61(4): 853-860.
- Brotherton, M.C., Bourassa, S., Legare, D., Poirier, G.G., Droit, A. and Ouellette, M. (2014).** "Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist 4(2): 126-132.
- Brown, J.K., Fung, C. and Taylor, C.S. (2006).** "Comprehensive mapping of receptor-functioning domains in feline leukemia virus subgroup C receptor FLVCR1." J Virol 80(4): 1742-1751.
- Buckner, F.S. and Urbina, J.A. (2012).** "Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease." Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2: 236-242.
- Burke, M.A. and Ardehali, H. (2007).** "Mitochondrial ATP-binding cassette proteins." Transl Res 150(2): 73-80.

- Caljon, G., Van Reet, N., De Trez, C., Vermeersch, M., Pérez-Morga, D. and Van Den Abbeele, J.** (2016). "The Dermis as a Delivery Site of *Trypanosoma brucei* for Tsetse Flies." PLoS Pathog 12(7).
- Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., Jiménez, M., Molina, R., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R. and Reguera, R.M.** (2014). "First evidence of intraclonal genetic exchange in trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones." PLoS Negl Trop Dis 8(9): e3075.
- Campos-Salinas, J., Cabello-Donayre, M., García-Hernández, R., Pérez-Victoria, I., Castanys, S., Gamarro, F. and Pérez-Victoria, J.M.** (2011). "A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*." Molecular microbiology 79(6): 1430-1444.
- Capewell, P., Clucas, C., DeJesus, E., Kieft, R., Hajduk, S., Veitch, N., Steketee, P.C., Cooper, A., Weir, W. and MacLeod, A.** (2013). "The TgsGP gene is essential for resistance to human serum in *Trypanosoma brucei gambiense*." PLoS Pathog 9(10): e1003686.
- Capewell, P., Cooper, A., Clucas, C., Weir, W. and Macleod, A.** (2015). "A co-evolutionary arms race: trypanosomes shaping the human genome, humans shaping the trypanosome genome." Parasitology 142 Suppl 1: S108-119.
- Capewell, P., Cren-Travaille, C., Marchesi, F., Johnston, P., Clucas, C., Benson, R.A., Gorman, T.A., Calvo-Alvarez, E., Crouzols, A., Jouvion, G., Jamonneau, V., Weir, W., Stevenson, M.L., O'Neill, K., Cooper, A., Swar, N.K., Bucheton, B., Ngoyi, D.M., Garside, P., Rotureau, B. and MacLeod, A.** (2016). "The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes." 5.
- Capewell, P., Veitch, N.J., Turner, C.M., Raper, J., Berriman, M., Hajduk, S.L. and MacLeod, A.** (2011). "Differences between *Trypanosoma brucei gambiense* groups 1 and 2 in their resistance to killing by trypanolytic factor 1." PLoS Negl Trop Dis 5(9): e1287.
- Carvalho, S., Cruz, T., Santarem, N., Castro, H., Costa, V. and Tomas, A.M.** (2009). "Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes." Acta Trop 109(2): 131-135.
- Casas-Sánchez, A. and Acosta-Serrano, A.** (2016). "Skin deep." eLIFE 5.
- Castanys-Muñoz, E., Pérez-Victoria, J.M., Gamarro, F. and Castanys, S.** (2008). "Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement." Antimicrob Agents Chemother 52(10): 3573-3579.
- Cavazzuti, A., Paglietti, G., Hunter, W.N., Gamarro, F., Piras, S., Loriga, M., Allecca, S., Corona, P., McLuskey, K., Tulloch, L., Gibellini, F., Ferrari, S. and Costi, M.P.** (2008). "Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development." Proc Natl Acad Sci U S A 105(5): 1448-1453.
- Clayton, C.E., Estévez, A.M., Hartmann, C., Alibu, V.P., Field, M. and Horn, D.** (2005). "Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*." Methods Mol Biol 309: 39-60.
- Coelho, A.C., Messier, N., Ouellette, M. and Cotrim, P.C.** (2007). "Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes." Antimicrob Agents Chemother 51(8): 3030-3032.

VI. Bibliografía

Cohen, B.E. (2016). "The Role of Signaling via Aqueous Pore Formation in Resistance Responses to Amphotericin B." Antimicrob Agents Chemother 60(9): 5122-5129.

Coura, J.R. (2007). "Chagas disease: what is known and what is needed—a background article." Mem Inst Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 113-122.

Cuervo, P., Domont, G.B. and De Jesus, J.B. (2010). "Proteomics of trypanosomatids of human medical importance." J Proteomics 73(5): 845-867.

Cupello, M.P., Souza, C.F., Buchensky, C., Soares, J.B., Laranja, G.A., Coelho, M.G., Cricco, J.A. and Paes, M.C. (2011). "The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters." Acta Trop 120(3): 211-218.

Cupello, M.P., Souza, C.F., Menna-Barreto, R.F., Nogueira, N.P., Laranja, G.A., Sabino, K.C., Coelho, M.G., Oliveira, M.M. and Paes, M.C. (2014). "Trypanosomatid essential metabolic pathway: new approaches about heme fate in *Trypanosoma cruzi*." Biochem Biophys Res Commun 449(2): 216-221.

Chang, C.S. and Chang, K.P. (1985). "Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*." Molecular and biochemical parasitology 16(3): 267-276.

Chavali, A.K., Blazier, A.S., Tlaxca, J.L., Jensen, P.A., Pearson, R.D. and Papin, J.A. (2012). "Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease." BMC Syst Biol 6: 27.

Chen, C., Samuel, T.K., Krause, M., Dailey, H.A. and Hamza, I. (2012). "Heme utilization in the *Caenorhabditis elegans* hypodermal cells is facilitated by Heme Responsive Gene-2." Journal of Biological Chemistry.

Chen, C., Samuel, T.K., Sinclair, J., Dailey, H.A. and Hamza, I. (2011). "An Intercellular Heme-Trafficking Protein Delivers Maternal Heme to the Embryo during Development in *C. elegans*." Cell 145(5): 720.

Chiabrando, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F., Fiorito, V., Fagoonee, S., Camporeale, A. and Turco, E. (2012). "The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation." The Journal of clinical investigation 122(12): 4569.

Chiabrando, D., Mercurio, S. and Tolosano, E. (2014). "Heme and erythropoiesis: more than a structural role." Haematologica 99(6): 973-983.

Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. and Tolosano, E. (2014). "Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes." Front Pharmacol 5: 61.

Choby, J.E. and Skaar, E.P. (2016). "Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens." Journal of molecular biology.

da Silva Augusto, L., Moretti, N.S., Ramos, T.C., de Jesus, T.C., Zhang, M., Castilho, B.A. and Schenkman, S. (2015). "A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in *Trypanosoma cruzi*." PLoS Pathog 11(2): e1004618.

- Dabaghmanesh, T., Asgari, Q., Moemenbellah-Fard, M.D., Soltani, A. and Azizi, K. (2016).** "Natural transovarial and transstadial transmission of *Leishmania infantum* by naive *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran." Trans R Soc Trop Med Hyg 110(7): 408-413.
- Daniels, J.P., Gull, K. and Wickstead, B. (2010).** "Cell biology of the trypanosome genome." Microbiol Mol Biol Rev 74(4): 552-569.
- Dasgupta, D., Adhya, S. and Basu, M.K. (2002).** "The effect of beta-tubulin-specific antisense oligonucleotide encapsulated in different cationic liposomes on the suppression [correction of suppression] of intracellular *L. donovani* parasites in vitro." J Biochem 132(1): 23-27.
- Dauchy, F.A., Bonhivers, M., Landrein, N., Dacheux, D., Courtois, P., Lauruol, F., Daulouede, S., Vincendeau, P. and Robinson, D.R. (2016).** "*Trypanosoma brucei* CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model." PLoS Negl Trop Dis 10(11): e0005125.
- De Gaudenzi, J.G., Noe, G., Campo, V.A., Frasch, A.C. and Cassola, A. (2011).** "Gene expression regulation in trypanosomatids." Essays Biochem 51: 31-46.
- De Luca, P.M. and Macedo, A.B.B. (2016).** "Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality." Frontiers in immunology 7.
- de Macedo-Silva, S.T., de Oliveira Silva, T.L., Urbina, J.A., de Souza, W. and Rodrigues, J.C. (2011).** "Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*." Mol Biol Int 2011: 876021.
- de Menezes, J.P., Guedes, C.E., Petersen, A.L., Fraga, D.B. and Veras, P.S. (2015).** "Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis." 2015: 815023.
- de Souza, W. (2002).** "Special organelles of some pathogenic protozoa." Parasitol Res 88(12): 1013-1025.
- de Souza, W., Attias, M. and Rodrigues, J.C. (2009).** "Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida)." Int J Biochem Cell Biol 41(10): 2069-2080.
- de Souza, W. and Rodrigues, J.C. (2009).** "Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs." Interdiscip Perspect Infect Dis 2009: 642502.
- DeJesus, E., Kieft, R., Albright, B., Stephens, N.A. and Hajduk, S.L. (2013).** "A single amino acid substitution in the group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* haptoglobin-hemoglobin receptor abolishes TLF-1 binding." PLoS Pathog 9(4): e1003317.
- Delaby, C., Rondeau, C., Pouzet, C., Willemetz, A., Pilard, N., Desjardins, M. and Canonne-Hergaux, F. (2012).** "Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis." PLoS One 7(7): e42199.
- Denny, P.W. and Steel, P.G. (2015).** "Yeast as a potential vehicle for neglected tropical disease drug discovery." J Biomol Screen 20(1): 56-63.
- Desjeux, P. (2004).** "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27(5): 305-318.

VI. Bibliografía

Docampo, R. and Huang, G. (2015). "Calcium signaling in trypanosomatid parasites." Cell calcium 57(3): 194-202.

dos Santos, M.G., Paes, L.S., Zampieri, R.A., da Silva, M.F., Silber, A.M. and Floeter-Winter, L.M. (2009). "Biochemical characterization of serine transport in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*." Mol Biochem Parasitol 163(2): 107-113.

Duffy, S.P., Shing, J., Saraon, P., Berger, L.C., Eiden, M.V., Wilde, A. and Tailor, C.S. (2010). "The Fowler syndrome-associated protein FLVCR2 is an importer of heme." Molecular and cellular biology 30(22): 5318-5324.

Durazzo, A. (2017). "Study Approach of Antioxidant Properties in Foods: Update and Considerations." Foods 6(3).

Dutta, S., Furuyama, K., Sassa, S. and Chang, K.P. (2008). "< i> Leishmania</i> spp.: Delta-aminolevulinic acid-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway." Experimental parasitology 118(4): 629-636.

Eiras, D.P., Kirkman, L.A. and Murray, H.W. (2015). "Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers." Curr Treat Options Infect Dis 7(1): 52-62.

El-On, J. and Messer, G. (1986). "*Leishmania major*: antileishmanial activity of methylbenzethonium chloride." Am J Trop Med Hyg 35(6): 1110-1116.

el Kouni, M.H. (2003). "Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites." Pharmacol Ther 99(3): 283-309.

Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T. and Cerami, A. (1985). "Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids." Science 227(4693): 1485-1487.

Fenn, K. and Matthews, K.R. (2007). "The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation." Curr Opin Microbiol 10(6): 539-546.

Fernández-Prada, C., Vincent, I.M., Brotherton, M.C., Roberts, M., Roy, G., Rivas, L., Leprohon, P., Smith, T.K. and Ouellette, M. (2016). "Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in *Leishmania* Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms." PLoS Negl Trop Dis 10(12): e0005171.

Field, V., Gautret, P., Schlagenhauf, P., Burchard, G.-D., Caumes, E., Jensenius, M., Castelli, F., Gkrania-Klotsas, E., Weld, L. and López-Vélez, R. (2010). "Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008." BMC infectious diseases 10(1): 1.

Flannery, A.R., Renberg, R.L. and Andrews, N.W. (2013). "Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*." Curr Opin Microbiol 16(6): 716-721.

Fortunato, A.E., Sordino, P. and Andreakis, N. (2016). "Evolution of the SOUL Heme-Binding Protein Superfamily Across Eukarya." J Mol Evol 82(6): 279-290.

Franco, J.R., Simarro, P.P., Diarra, A. and Jannin, J.G. (2014). "Epidemiology of human African trypanosomiasis." Clin Epidemiol 6: 257-275.

- Galbraith, R.A. and McElrath, M.J.** (1988). "Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*." Molecular and biochemical parasitology 29(1): 47-53.
- Ganz, T.** (2012). "Macrophages and systemic iron homeostasis." J Innate Immun 4(5-6): 446-453.
- García-Hernández, R., Gómez-Pérez, V., Castanys, S. and Gamarro, F.** (2015). "Fitness of *Leishmania donovani* parasites resistant to drug combinations." PLoS Negl Trop Dis 9(4): e0003704.
- García-Hernández, R., Manzano, J.I., Castanys, S. and Gamarro, F.** (2012). "*Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations." PLoS Negl Trop Dis 6(12): e1974.
- García-Sánchez, S., Sánchez-Cañete, M.P., Gamarro, F. and Castanys, S.** (2014). "Functional role of evolutionarily highly conserved residues, N-glycosylation level and domains of the *Leishmania* miltefosine transporter-Cdc50 subunit." Biochem J 459(1): 83-94.
- Gehrig, S. and Efferth, T.** (2008). "Development of drug resistance in *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense*. Treatment of human African trypanosomiasis with natural products (Review)." Int J Mol Med 22(4): 411-419.
- Geiger, A. and Pissarra, J.** (2016). "Escaping deleterious immune response in their hosts: lessons from trypanosomatids." Frontiers in Immunology 7: 212.
- Genovese, G., Friedman, D.J., Ross, M.D., Lecordier, L., Uzureau, P., Freedman, B.I., Bowden, D.W., Langefeld, C.D., Oleksyk, T.K., Uscinski Knob, A.L., Bernhardt, A.J., Hicks, P.J., Nelson, G.W., Vanhollebeke, B., Winkler, C.A., Kopp, J.B., Pays, E. and Pollak, M.R.** (2010). "Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans." Science 329(5993): 841-845.
- Gibson, W.** (2015). "Liaisons dangereuses: sexual recombination among pathogenic trypanosomes." Res Microbiol 166(6): 459-466.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A.** (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. Yeast Protocol, Springer: 107-120.
- Gómez-Pérez, V., García-Hernández, R., Corpas-López, V., Tomas, A.M., Martín-Sánchez, J., Castanys, S. and Gamarro, F.** (2016). "Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist 6(2): 133-139.
- González González, I. and Sanz, A.I.** (2013). "Parámetros estadísticos que respaldan la calidad de un ensayo HTS a lo largo de sus etapas: GPCR orexigénico como diana."
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M., Rosen, B.P. and Mukhopadhyay, R.** (2004). "Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin." J Biol Chem 279(30): 31010-31017.
- Guha, R., Gupta, D., Rastogi, R., Vikram, R., Krishnamurthy, G., Bimal, S., Roy, S. and Mukhopadhyay, A.** (2013). "Vaccination with *Leishmania* hemoglobin receptor-encoding DNA protects against visceral leishmaniasis." Sci Transl Med 5(202): 202ra121.

VI. Bibliografía

Ha, D.S., Schwarz, J.K., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (1996). "Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol 77(1): 57-64.

Hamza, I. and Dailey, H.A. (2012). "One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans." Biochim Biophys Acta 1823(9): 1617-1632.

Heidari-Kharaji, M., Taheri, T., Doroud, D., Habibzadeh, S., Badirzadeh, A. and Rafati, S. (2016). "Enhanced paromomycin efficacy by solid lipid nanoparticle formulation against *Leishmania* in mice model." Parasite Immunol.

Helias, V., Saison, C., Ballif, B.A., Peyrard, T., Takahashi, J., Takahashi, H., Tanaka, M., Deybach, J.C., Puy, H., Le Gall, M., Sureau, C., Pham, B.N., Le Pennec, P.Y., Tani, Y., Cartron, J.P. and Arnaud, L. (2012). "ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis." Nat Genet 44(2): 170-173.

Horn, D. and McCulloch, R. (2010). "Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes." Curr Opin Microbiol 13(6): 700-705.

Huynh, C., Yuan, X., Miguel, D.C., Hamza, I. and Andrews, N.W. (2012). "Heme uptake in *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1." PLoS Pathogens 8(7):e1002795.

Huynh, C., Yuan, X., Miguel, D.C., Renberg, R.L., Protchenko, O., Philpott, C.C., Hamza, I. and Andrews, N.W. (2012). "Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1." PLoS pathogens 8(7): e1002795.

Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Hojrup, P., Moller, H.J. and Moestrup, S.K. (2005). "Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes." Blood 106(7): 2572-2579.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B. and Myler, P.J. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science 309(5733): 436-442.

Iwahara, S., Satoh, H., Song, D.X., Webb, J., Burlingame, A.L., Nagae, Y. and Muller-Eberhard, U. (1995). "Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol." Biochemistry 34(41): 13398-13406.

- Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K., Hironaka, I., Kamata, Y., Takada, K. and Mizunoe, Y. (2013). "A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach." Sci Rep 3: 3081.
- Jain, K. and Jain, N.K. (2015). "Vaccines for visceral leishmaniasis: A review." J Immunol Methods 422: 1-12.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. and Thornton, J.M. (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." Comput Appl Biosci 8(3): 275-282.
- Kaiser, M., Maser, P., Tadoori, L.P., Ioset, J.R. and Brun, R. (2015). "Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning." PLoS One 10(8): e0135556.
- Kaszak, I., Planellas, M. and Dworecka-Kaszak, B. (2015). "Canine leishmaniosis—an emerging disease." Annals of parasitology 61(2).
- Kathiresan, M., Martins, D. and English, A.M. (2014). "Respiration triggers heme transfer from cytochrome c peroxidase to catalase in yeast mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A 111(49): 17468-17473.
- Kaur, S., Kaur, T. and Joshi, J. (2016). "Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccine against visceral leishmaniasis in BALB/c mice." J Biomed Res 30(4): 304-313.
- Keel, S.B., Doty, R.T., Yang, Z., Quigley, J.G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P.D., De Domenico, I., Vaughn, M.B., Kaplan, J., Palis, J. and Abkowitz, J.L. (2008). "A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis." Science 319(5864): 825-828.
- Kelly, J.X., Ignatushchenko, M.V., Bouwer, H., Peyton, D.H., Hinrichs, D.J., Winter, R. and Riscoe, M. (2003). "Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency." Molecular and biochemical parasitology 126(1): 43-49.
- Khan, A.A. and Quigley, J.G. (2011). "Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases." Biochim Biophys Acta 1813(5): 668-682.
- Khan, A.A. and Quigley, J.G. (2013). "Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49." Molecular aspects of medicine 34(2): 669-682.
- Kieft, R., Capewell, P., Turner, C.M.R., Veitch, N.J., MacLeod, A. and Hajduk, S. (2010). "Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(37): 16137-16141.
- Kiss, K., Brozik, A., Kucsma, N., Toth, A., Gera, M., Berry, L., Vallentin, A., Vial, H., Vidal, M. and Szakacs, G. (2012). "Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes." PLoS One 7(5): e37378.
- Kohut, P., Wustner, D., Hronská, L., Kuchler, K., Hapala, I. and Valachovic, M. (2011). "The role of ABC proteins Aus1p and Pdr11p in the uptake of external sterols in yeast: dehydroergosterol fluorescence study." Biochem Biophys Res Commun 404(1): 233-238.
- Kořený, L., Lukes, J. and Oborník, M. (2010). "Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all?" International journal for parasitology 40(2): 149-156.

VI. Bibliográfia

- Kořený, L., Oborník, M. and Lukeš, J. (2013).** "Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites." PLoS Pathog 9(1): e1003088.
- Korolnek, T. and Hamza, I. (2014).** "Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism." Front Pharmacol 5: 126.
- Korolnek, T., Zhang, J., Beardsley, S., Scheffer, G.L. and Hamza, I. (2014).** "Control of metazoan heme homeostasis by a conserved multidrug resistance protein." Cell Metab 19(6): 1008-1019.
- Koszarska, M., Kucsma, N., Kiss, K., Varady, G., Gera, M., Antalffy, G., Andrikovics, H., Tordai, A., Studzian, M., Strapagiel, D., Pulaski, L., Tani, Y., Sarkadi, B. and Szakacs, G. (2014).** "Screening the expression of ABCB6 in erythrocytes reveals an unexpectedly high frequency of Lan mutations in healthy individuals." PLoS One 9(10): e111590.
- Krauth-Siegel, R.L. and Comini, M.A. (2008).** "Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism." Biochim Biophys Acta 1780(11): 1236-1248.
- Krishnamurthy, G., Vikram, R., Singh, S.B., Patel, N., Agarwal, S., Mukhopadhyay, G., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A. (2005).** "Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket." Journal of Biological Chemistry 280(7): 5884-5891.
- Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P. and Schuetz, J.D. (2004).** "The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme." J Biol Chem 279(23): 24218-24225.
- Krishnamurthy, P. and Schuetz, J.D. (2005).** "The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival." Biomaterials 18(4): 349-358.
- Krishnamurthy, P., Xie, T. and Schuetz, J.D. (2007).** "The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis." Pharmacol Ther 114(3): 345-358.
- Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E., Wang, J., Sosa-Pineda, B., Murti, K.G. and Schuetz, J.D. (2006).** "Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter." Nature 443(7111): 586-589.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K. and Moestrup, S.K. (2001).** "Identification of the haemoglobin scavenger receptor." Nature 409(6817): 198-201.
- Kumar, R. and Engwerda, C. (2014).** "Vaccines to prevent leishmaniasis." Clin Transl Immunology 3(3): e13.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016).** "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." Mol Biol Evol 33(7): 1870-1874.
- Kvarnung, M., Taylan, F., Nilsson, D., Albage, M., Nordenskjold, M., Anderlid, B.M., Nordgren, A. and Syk Lundberg, E. (2016).** "Mutations in FLVCR2 associated with Fowler syndrome and survival beyond infancy." Clin Genet 89(1): 99-103.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982).** "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol 157(1): 105-132.

Lara, F.A., Sant'Anna, C., Lemos, D., Laranja, G.A.T., Coelho, M.G.P., Reis Salles, I., Michel, A., Oliveira, P.L., Cunha-e-Silva, N. and Salmon, D. (2007). "Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." Biochemical and biophysical research communications 355(1): 16-22.

Latunde-Dada, G.O., Simpson, R.J. and McKie, A.T. (2006). "Recent advances in mammalian haem transport." Trends Biochem Sci 31(3): 182-188.

Latunde-Dada, G.O., Takeuchi, K., Simpson, R.J. and McKie, A.T. (2006). "Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells." FEBS Lett 580(30): 6865-6870.

Law, C.J., Maloney, P.C. and Wang, D.N. (2008). "Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters." Annu Rev Microbiol 62: 289-305.

Lecordier, L., Uzureau, P., Tebabi, P., Perez-Morga, D., Nolan, D., Schumann Burkard, G., Roditi, I. and Pays, E. (2014). "Identification of *Trypanosoma brucei* components involved in trypanolysis by normal human serum." Mol Microbiol 94(3): 625-636.

Lepesheva, G.I., Park, H.W., Hargrove, T.Y., Vanhollebeke, B., Wawrzak, Z., Harp, J.M., Sundaramoorthy, M., Nes, W.D., Pays, E., Chaudhuri, M., Villalta, F. and Waterman, M.R. (2010). "Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14 α -demethylase and implications for selective treatment of human infections." J Biol Chem 285(3): 1773-1780.

Lepesheva, G.I. and Waterman, M.R. (2011). "Sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis." Curr Top Med Chem 11(16): 2060-2071.

Leprohon, P., Legare, D., Girard, I., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2006). "Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites." Eukaryot Cell 5(10): 1713-1725.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ method." methods 25(4): 402-408.

López-Martín, C., Pérez-Victoria, J.M., Carvalho, L., Castanys, S. and Gamarro, F. (2008). "Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes." Antimicrobial agents and chemotherapy 52(11): 4030-4036.

Luck, A.N., Yuan, X., Voronin, D., Slatko, B.E., Hamza, I. and Foster, J.M. (2016). "Heme acquisition in the parasitic filarial nematode *Brugia malayi*." Faseb j 30(10): 3501-3514.

Lwoff, M. (1933). "Remarques sur la nutrition des Trypanosomides et des bactéries parahémotrophes le "fer actif" de baudisch." Ann Inst Pasteur 51: 707-703.

Mackey, Z.B., Baca, A.M., Mallari, J.P., Apsel, B., Shelat, A., Hansell, E.J., Chiang, P.K., Wolff, B., Guy, K.R., Williams, J. and McKerrow, J.H. (2006). "Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*." Chem Biol Drug Des 67(5): 355-363.

Madison-Antenucci, S., Grams, J. and Hajduk, S.L. (2002). "Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing." Cell 108(4): 435-438.

VI. Bibliografía

- Marquis, N., Gourbal, B., Rosen, B.P., Mukhopadhyay, R. and Ouellette, M. (2005).** "Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*." Mol Microbiol 57(6): 1690-1699.
- Martínez-García, M., Campos-Salinas, J., Cabello-Donayre, M., Pineda-Molina, E., Gálvez, F.J., Orrego, L.M., Sánchez-Cañete, M.P., Malagarie-Cazenave, S., Koeller, D.M. and Pérez-Victoria, J.M. (2016).** "LmABC3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis." Parasites & vectors 9(1): 1-17.
- Mbow, M.L., Bleyenbergh, J.A., Hall, L.R. and Titus, R.G. (1998).** "Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*." The Journal of Immunology 161(10): 5571-5577.
- McCall, L.I., El Aroussi, A., Choi, J.Y., Vieira, D.F., De Muylder, G., Johnston, J.B., Chen, S., Kellar, D., Siqueira-Neto, J.L., Roush, W.R., Podust, L.M. and McKerrow, J.H. (2015).** "Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase." PLoS Negl Trop Dis 9(3): e0003588.
- McCall, L.I., Zhang, W.W. and Matlashewski, G. (2013).** "Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease." PLoS pathogens 9(1): e1003053.
- McGwire, B. and Satoskar, A. (2013).** "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." Qjm: hct116.
- Medlock, A.E., Shiferaw, M.T., Marcero, J.R., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., Phillips, J.D. and Dailey, H.A. (2015).** "Identification of the Mitochondrial Heme Metabolism Complex." PLoS One 10(8): e0135896.
- Merli, M.L., Pagura, L., Hernández, J., Barison, M.J., Pral, E.M., Silber, A.M. and Cricco, J.A. (2016).** "The *Trypanosoma cruzi* Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake." PLoS Negl Trop Dis 10(1): e0004359.
- Messenger, L.A. and Miles, M.A. (2015).** "Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*." Acta Trop 151: 150-155.
- Meyer, E., Ricketts, C., Morgan, N.V., Morris, M.R., Pasha, S., Tee, L.J., Rahman, F., Bazin, A., Bessières, B. and Déchelotte, P. (2010).** "Mutations in FLVCR2 are associated with proliferative vasculopathy and hydranencephaly-hydrocephaly syndrome (Fowler syndrome)." The American Journal of Human Genetics 86(3): 471-478.
- Michels, P.A., Hannaert, V. and Bringaud, F. (2000).** "Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views." Parasitol Today 16(11): 482-489.
- Miguel, D.C., Flannery, A.R., Mittra, B. and Andrews, N.W. (2013).** "Heme uptake mediated by LHR1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence." Infect Immun 81(10): 3620-3626.
- Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. and Baneth, G. (2008).** "Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two." Trends Parasitol 24(8): 371-377.

- Molina, R., Jiménez, M., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S. and Bernal, J. (2012).** "The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain." Veterinary parasitology 190(1): 268-271.
- Munday, J.C., Settimo, L. and De Koning, H.P. (2015).** "Transport proteins determine drug sensitivity and resistance in a protozoan parasite, *Trypanosoma brucei*." Frontiers in pharmacology 6: 32.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. and Saravia, N.G. (2005).** "Advances in leishmaniasis." Lancet 366(9496): 1561-1577.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L. and Cox, M.M. (2008).** Lehninger principles of biochemistry, Macmillan.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. and Ullu, E. (1998).** "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A 95(25): 14687-14692.
- Norcliffe, J.L., Álvarez-Ruiz, E., Martín-Plaza, J.J., Steel, P.G. and Denny, P.W. (2014).** "The utility of yeast as a tool for cell-based, target-directed high-throughput screening." Parasitology 141(1): 8-16.
- O'Callaghan, K.M., Ayllon, V., O'Keefe, J., Wang, Y., Cox, O.T., Loughran, G., Forgac, M. and O'Connor, R. (2010).** "Heme-binding protein HRG-1 is induced by insulin-like growth factor I and associates with the vacuolar H⁺-ATPase to control endosomal pH and receptor trafficking." J Biol Chem 285(1): 381-391.
- Okwor, I. and Uzonna, J.E. (2013).** "The immunology of Leishmania/HIV co-infection." Immunologic research 56(1): 163-171.
- Olea, P. and Pinilla, J. (2013).** "[Visceral leishmaniasis in patient with HIV infection]." Rev Chilena Infectol 30(2): 216-220.
- Opperdoes, F.R. and Coombs, G.H. (2007).** "Metabolism of Leishmania: proven and predicted." Trends Parasitol 23(4): 149-158.
- Pace, D. (2014).** "Leishmaniasis." J Infect 69 Suppl 1: S10-18.
- Padhy, B.M. and Gupta, Y.K. (2011).** "Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications." J Postgrad Med 57(2): 153-160.
- Padilla-Mejia, N.E., Florencio-Martínez, L.E., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J.C., Cevallos, A.M., Hernández-Rivas, R., Manning-Cela, R. and Martínez-Calvillo, S. (2015).** "The selenocysteine tRNA gene in *Leishmania major* is transcribed by both RNA polymerase II and RNA polymerase III." Eukaryot Cell 14(3): 216-227.
- Padmanaban, G., Venkateswar, V. and Rangarajan, P. (1989).** "Haem as a multifunctional regulator." Trends in biochemical sciences 14(12): 492-496.
- Paes, L.S., Gálvez Rojas, R.L., Daliry, A., Floeter-Winter, L.M., Ramírez, M.I. and Silber, A.M. (2008).** "Active transport of glutamate in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*." J Eukaryot Microbiol 55(5): 382-387.

VI. Bibliografía

- Palenchar, J.B. and Bellofatto, V. (2006).** "Gene transcription in trypanosomes." Mol Biochem Parasitol 146(2): 135-141.
- Panek, H. and O'Brian, M.R. (2002).** "A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis." Microbiology 148(Pt 8): 2273-2282.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. and Saier, M.H., Jr. (1998).** "Major facilitator superfamily." Microbiol Mol Biol Rev 62(1): 1-34.
- Patel, N., Singh, S.B., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A. (2008).** "*Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed hemoglobin for their growth." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(10): 3980-3985.
- Pays, E. (2005).** "Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*." Trends Parasitol 21(11): 517-520.
- Pays, E. and Nolan, D.P. (1998).** "Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol 91(1): 3-36.
- Pays, E. and Vanhollebeke, B. (2008).** "Mutual self-defence: the trypanolytic factor story." Microbes and infection 10(9): 985-989.
- Pays, E. and Vanhollebeke, B. (2009).** "Human innate immunity against African trypanosomes." Current opinion in immunology 21(5): 493-498.
- Pays, E., Vanhollebeke, B., Uzureau, P., Lecordier, L. and Pérez-Morga, D. (2014).** "The molecular arms race between African trypanosomes and humans." Nat Rev Microbiol 12(8): 575-584.
- Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P. and Perez-Morga, D. (2006).** "The trypanolytic factor of human serum." Nat Rev Microbiol 4(6): 477-486.
- Pérez-Moreno, G., Sealey-Cardona, M., Rodrigues-Poveda, C., Gelb, M.H., Ruíz-Pérez, L.M., Castillo-Acosta, V., Urbina, J.A. and González-Pacanowska, D. (2012).** "Endogenous sterol biosynthesis is important for mitochondrial function and cell morphology in procyclic forms of *Trypanosoma brucei*." Int J Parasitol 42(11): 975-989.
- Pérez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Ouellette, M. and Castanys, S. (2003).** "Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance." J Biol Chem 278(50): 49965-49971.
- Pérez-Victoria, F.J., Sánchez-Cañete, M.P., Castanys, S. and Gamarro, F. (2006).** "Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites." J Biol Chem 281(33): 23766-23775.
- Pérez-Victoria, F.J., Sánchez-Cañete, M.P., Seifert, K., Croft, S.L., Sundar, S., Castanys, S. and Gamarro, F. (2006).** "Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use." Drug Resist Updat 9(1-2): 26-39.
- Pérez-Victoria, I., Pérez-Victoria, F.J., Roldán-Vargas, S., García-Hernández, R., Carvalho, L., Castanys, S., Gamarro, F., Morales, J.C. and Pérez-Victoria, J.M. (2011).** "Non-reducing trisaccharide fatty acid monoesters: novel detergents in membrane biochemistry." Biochim Biophys Acta 1808(3): 717-726.

- Pérez-Victoria, J.M., Cortés-Selva, F., Parodi-Talice, A., Bavchvarov, B.I., Pérez-Victoria, F.J., Muñoz-Martínez, F., Maitrejean, M., Costi, M.P., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S. and Gamarro, F. (2006).** "Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux." Antimicrob Agents Chemother 50(9): 3102-3110.
- Pérez-Victoria, J.M., Pérez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Jiménez, I.A., Ravelo, A.G., Castanys, S. and Gamarro, F. (2001).** "Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator." Antimicrob Agents Chemother 45(9): 2468-2474.
- Perner, J., Sobotka, R., Sima, R., Konvickova, J., Sojka, D., Oliveira, P.L., Hajdusek, O. and Kopacek, P. (2016).** "Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction." Elife 5.
- Peyrard, T. (2013).** "The LAN blood group system: a review." Immunohematology 29(4): 131-135.
- Picozzi, K., Fevre, E.M., Odiit, M., Carrington, M., Eisler, M.C., Maudlin, I. and Welburn, S.C. (2005).** "Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases." Bmj 331(7527): 1238-1241.
- Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E. and Kande, V. (2009).** "Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial." Lancet 374(9683): 56-64.
- Protchenko, O., Rodríguez-Suárez, R., Androphy, R., Bussey, H. and Philpott, C.C. (2006).** "A screen for genes of heme uptake identifies the FLC family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum." Journal of Biological Chemistry 281(30): 21445-21457.
- Protchenko, O., Shakoury-Elizeh, M., Keane, P., Storey, J., Androphy, R. and Philpott, C.C. (2008).** "Role of PUG1 in inducible porphyrin and heme transport in *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryotic cell 7(5): 859-871.
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A.H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M., De, T., Singh, D. and Das, P. (2012).** "Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother 56(2): 1031-1041.
- Quigley, J.G., Burns, C.C., Anderson, M.M., Lynch, E.D., Sabo, K.M., Overbaugh, J. and Abkowitz, J.L. (2000).** "Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia." Blood 95(3): 1093-1099.
- Quigley, J.G., Yang, Z., Worthington, M.T., Phillips, J.D., Sabo, K.M., Sabath, D.E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B.L. and Abkowitz, J.L. (2004).** "Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis." Cell 118(6): 757-766.
- Rajagopal, A., Rao, A.U., Amigo, J., Tian, M., Upadhyay, S.K., Hall, C., Uhm, S., Mathew, M.K., Fleming, M.D. and Paw, B.H. (2008).** "Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins." Nature 453(7198): 1127-1131.

VI. Bibliografía

- Rao, A.U., Carta, L.K., Lesuisse, E. and Hamza, I. (2005).** "Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(12): 4270.
- Reddy, V.B., Li, Y. and Lerner, E.A. (2008).** "Maxadilan, the PAC1 receptor, and leishmaniasis." Journal of molecular neuroscience 36(1-3): 241-244.
- Reguera, R.M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C. and Balaña-Fouce, R. (2016).** "Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis." Vet Parasitol 227: 98-114.
- Renberg, R.L., Yuan, X., Samuel, T.K., Miguel, D.C., Hamza, I., Andrews, N.W. and Flannery, A.R. (2015).** "The Heme Transport Capacity of LHR1 Determines the Extent of Virulence in *Leishmania amazonensis*." PLoS Negl Trop Dis 9(5): e0003804.
- Rougeron, V., De Meeus, T. and Banuls, A.L. (2016).** "Reproduction in Leishmania: A focus on genetic exchange." Infect Genet Evol.
- Ryter, S.W. and Choi, A.M. (2009).** "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy." Am J Respir Cell Mol Biol 41(3): 251-260.
- Ryter, S.W. and Tyrrell, R.M. (2000).** "The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties." Free Radic Biol Med 28(2): 289-309.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press.
- Savoia, D. (2015).** "Recent updates and perspectives on leishmaniasis." The Journal of Infection in Developing Countries 9(06): 588-596.
- Sbaraglini, M.L., Vanrell, M.C., Bellera, C.L., Benaim, G., Carrillo, C., Talevi, A. and Romano, P.S. (2016).** "Neglected Tropical Protozoan Diseases: Drug Repositioning as a Rational Option." Curr Top Med Chem 16(19): 2201-2222.
- Schwarz, N.G., Loderstaedt, U., Hahn, A., Hinz, R., Zautner, A.E., Eibach, D., Fischer, M., Hagen, R.M. and Frickmann, H. (2015).** "Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs)." Acta Trop.
- Sengupta, S., Tripathi, J., Tandon, R., Raje, M., Roy, R.P., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A. (1999).** "Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket." Journal of Biological Chemistry 274(5): 2758-2765.
- Sereno, D., Roy, G., Lemesre, J.L., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2001).** "DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening." Antimicrob Agents Chemother 45(4): 1168-1173.
- Severance, S. and Hamza, I. (2009).** "Trafficking of heme and porphyrins in metazoa." Chem Rev 109(10): 4596-4616.
- Severance, S., Rajagopal, A., Rao, A.U., Cerqueira, G.C., Mitreva, M., El-Sayed, N.M., Krause, M. and Hamza, I. (2010).** "Genome-Wide Analysis Reveals Novel Genes Essential for Heme Homeostasis in *Caenorhabditis elegans*." PLoS genetics 6(7): e1001044.

- Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M. and Zilberstein, D. (2001).** "Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*." J Biol Chem 276(6): 3971-3976.
- Shang, N., Li, Q., Ko, T.P., Chan, H.C., Li, J., Zheng, Y., Huang, C.H., Ren, F., Chen, C.C., Zhu, Z., Galizzi, M., Li, Z.H., Rodrigues-Poveda, C.A., González-Pacanowska, D., Veiga-Santos, P., de Carvalho, T.M., de Souza, W., Urbina, J.A., Wang, A.H., Docampo, R., Li, K., Liu, Y.L., Oldfield, E. and Guo, R.T. (2014).** "Squalene synthase as a target for Chagas disease therapeutics." PLoS Pathog 10(5): e1004114.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J. and McKie, A.T. (2005).** "Identification of an intestinal heme transporter." Cell 122(5): 789-801.
- Shi, H., Chamond, N., Tschudi, C. and Ullu, E. (2004).** "Selection and characterization of RNA interference-deficient trypanosomes impaired in target mRNA degradation." Eukaryot Cell 3(6): 1445-1453.
- Sievers, F. and Higgins, D.G. (2014).** "Clustal omega." Curr Protoc Bioinformatics 48: 3.13.11-16.
- Silber, A.M., Rojas, R.L., Urias, U., Colli, W. and Alves, M.J. (2006).** "Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol 36(2): 157-163.
- Sinclair, J. and Hamza, I. (2010).** "A novel heme-responsive element mediates transcriptional regulation in *Caenorhabditis elegans*." Journal of Biological Chemistry 285(50): 39536-39543.
- Singh, S.B., Tandon, R., Krishnamurthy, G., Vikram, R., Sharma, N., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A. (2003).** "Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*." The EMBO journal 22(21): 5712-5722.
- Soding, J. (2005).** "Protein homology detection by HMM-HMM comparison." Bioinformatics 21(7): 951-960.
- Srivastava, P., Prajapati, V.K., Rai, M. and Sundar, S. (2011).** "Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic." J Clin Microbiol 49(8): 3088-3091.
- Srivastava, P., Sharma, G.D., Kamboj, K.K., Rastogi, A.K. and Pandey, V.C. (1997).** "Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*." Mol Cell Biochem 171(1-2): 65-68.
- Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A.K., Singh, A., Shankar, P. and Singh, S. (2017).** "Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India." Parasit Vectors 10(1): 49.
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P. and Pages, M. (2012).** "Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*." Mol Microbiol 86(1): 15-23.
- Steverding, D. (2008).** "The history of African trypanosomiasis." Parasites & vectors 1(1): 1.
- Steverding, D. (2010).** "The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review." Parasit Vectors 3(1): 15.

VI. Bibliografía

Stodkilde, K., Torvund-Jensen, M., Moestrup, S.K. and Andersen, C.B. (2014). "Structural basis for trypanosomal haem acquisition and susceptibility to the host innate immune system." Nat Commun 5: 5487.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R.E., McKerrow, J.H., Reed, S. and Tarleton, R. (2008). "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." The Journal of clinical investigation 118(4): 1301-1310.

Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M.J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J. and Amela Heras, C. (2012). "Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain." Revista Española de Salud Pública 86(6): 555-564.

Sundar, S. and Singh, A. (2016). "Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis." Ther Adv Infect Dis 3(3-4): 98-109.

Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Prajapati, V.K., Singh, A.K., Ostyn, B., Boelaert, M., Dujardin, J.C. and Chakravarty, J. (2012). "Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use." Clin Infect Dis 55(4): 543-550.

Symula, R.E., Beadell, J.S., Sstrom, M., Agbebakun, K., Balmer, O., Gibson, W., Aksoy, S. and Caccone, A. (2012). "*Trypanosoma brucei gambiense* group 1 is distinguished by a unique amino acid substitution in the HpHb receptor implicated in human serum resistance." PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1728.

Szoor, B., Haanstra, J.R., Gualdrón-López, M. and Michels, P.A. (2014). "Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids." Curr Opin Microbiol 22: 79-87.

Taylor, C.S., Willett, B.J. and Kabat, D. (1999). "A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily." J Virol 73(8): 6500-6505.

Taketani, S. (2005). "Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation." Tohoku J Exp Med 205(4): 297-318.

Tang, X.D., Xu, R., Reynolds, M.F., García, M.L., Heinemann, S.H. and Hoshi, T. (2003). "Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels." Nature 425(6957): 531-535.

Theodoulou, F.L. and Kerr, I.D. (2015). "ABC transporter research: going strong 40 years on." Biochem Soc Trans 43(5): 1033-1040.

Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., Colton, C.A., Harris, C.C., Roberts, D.D. and Wink, D.A. (2008). "The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling." Free Radic Biol Med 45(1): 18-31.

Thomsen, J.H., Etzerodt, A., Svendsen, P. and Moestrup, S.K. (2013). "The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging." Oxid Med Cell Longev 2013: 523652.

- Timm, J., Bosch-Navarrete, C., Recio, E., Nettleship, J.E., Rada, H., González-Pacanowska, D. and Wilson, K.S. (2015).** "Structural and Kinetic Characterization of Thymidine Kinase from *Leishmania major*." PLoS Negl Trop Dis 9(5): e0003781.
- Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S.A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., Ribeiro, R.M., Dias, S., Smith, T.K. and Figueiredo, L.M. (2016).** "*Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice." Cell Host Microbe 19(6): 837-848.
- Tripodi, K.E., Menéndez Bravo, S.M. and Cricco, J.A. (2011).** "Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways." Enzyme Res 2011: 873230.
- Tschudi, C., Shi, H., Franklin, J.B. and Ullu, E. (2012).** "Small interfering RNA-producing loci in the ancient parasitic eukaryote *Trypanosoma brucei*." BMC Genomics 13: 427.
- Ulrich, D.L., Lynch, J., Wang, Y., Fukuda, Y., Nachagari, D., Du, G., Sun, D., Fan, Y., Tsurkan, L., Potter, P.M., Rehg, J.E. and Schuetz, J.D. (2012).** "ATP-dependent mitochondrial porphyrin importer ABCB6 protects against phenylhydrazine toxicity." J Biol Chem 287(16): 12679-12690.
- Uzureau, P., Uzureau, S., Lecordier, L., Fontaine, F., Tebabi, P., Homble, F., Grelard, A., Zhendre, V., Nolan, D.P., Lins, L., Crowet, J.M., Pays, A., Felu, C., Poelvoorde, P., Vanhollebeke, B., Moestrup, S.K., Lyngso, J., Pedersen, J.S., Mottram, J.C., Dufourc, E.J., Pérez-Morga, D. and Pays, E. (2013).** "Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* resistance to human serum." Nature 501(7467): 430-434.
- Valente, M., Timm, J., Castillo-Acosta, V.M., Ruíz-Pérez, L.M., Balzarini, T., Nettleship, J.E., Bird, L.E., Rada, H., Wilson, K.S. and González-Pacanowska, D. (2016).** "Cell cycle regulation and novel structural features of thymidine kinase, an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol 102(3): 365-385.
- van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L. and Boelaert, M. (2010).** "Combination therapy for visceral leishmaniasis." Lancet Infect Dis 10(3): 184-194.
- Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D.P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J.P., De Baetselier, P., Brasseur, R. and Pays, E. (2003).** "Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum." Nature 422(6927): 83-87.
- Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K. and Pays, E. (2008).** "A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans." Science 320(5876): 677.
- Vanhollebeke, B., Nielsen, M.J., Watanabe, Y., Truc, P., Vanhamme, L., Nakajima, K., Moestrup, S.K. and Pays, E. (2007).** "Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum." Proc Natl Acad Sci U S A 104(10): 4118-4123.
- Vanhollebeke, B. and Pays, E. (2010).** "The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill." Molecular microbiology 76(4): 806-814.
- Vasudevan, D., Bovee, R.C. and Thomas, D.D. (2016).** "Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes." Nitric Oxide 59: 54-62.

VI. Bibliografía

Vieira Pde, B., Silva, N.L., Kist, L.W., Oliveira, G.M., Bogo, M.R., Carli, G.A., Macedo, A.J. and Tasca, T. (2015). "Iron from haemoglobin and haemin modulates nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*." Mem Inst Oswaldo Cruz 110(2): 201-208.

Viol, M.A., Guerrero, F.D., de Oliveira, B.C., de Aquino, M.C., Loiola, S.H., de Melo, G.D., de Souza Gomes, A.H., Kanamura, C.T., Garcia, M.V., Andreotti, R., de Lima, V.M. and Bresciani, K.D. (2016). "Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs." Parasitol Res 115(9): 3479-3484.

Von Stebut, E. (2015). "Leishmaniasis." J Dtsch Dermatol Ges 13(3): 191-200; quiz 201.

Weissman, Z., Shemer, R., Conibear, E. and Kornitzer, D. (2008). "An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*." Mol Microbiol 69(1): 201-217.

White, C., Yuan, X., Schmidt, P.J., Bresciani, E., Samuel, T.K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M.L., Lapiere, A., Ward, D.M., Liu, P., Fleming, M.D. and Hamza, I. (2013). "HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis." Cell Metab 17(2): 261-270.

Widener, J., Nielsen, M.J., Shiflett, A., Moestrup, S.K. and Hajduk, S. (2007). "Hemoglobin is a co-factor of human trypanosome lytic factor." PLoS Pathog 3(9): 1250-1261.

Worthington, M.T., Cohn, S.M., Miller, S.K., Luo, R.Q. and Berg, C.L. (2001). "Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(6): G1172-1177.

Yan, N. (2015). "Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters." Annu Rev Biophys 44: 257-283.

Yanatori, I., Tabuchi, M., Kawai, Y., Yasui, Y., Akagi, R. and Kishi, F. (2010). "Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells." BMC Cell Biol 11: 39.

Yang, Z., Philips, J.D., Doty, R.T., Giraudi, P., Ostrow, J.D., Tiribelli, C., Smith, A. and Abkowitz, J.L. (2010). "Kinetics and specificity of feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) export function and its dependence on hemopexin." J Biol Chem 285(37): 28874-28882.

Yuan, X., Fleming, M.D. and Hamza, I. (2013). "Heme transport and erythropoiesis." Curr Opin Chem Biol 17(2): 204-211.

Yuan, X., Protchenko, O., Philpott, C.C. and Hamza, I. (2012). "Topologically conserved residues direct heme transport in HRG-1-related proteins." Journal of Biological Chemistry 287(7): 4914-4924.

Yuan, X., Protchenko, O., Philpott, C.C. and Hamza, I. (2012). "Topologically conserved residues direct heme transport in HRG-1-related proteins." J Biol Chem 287(7): 4914-4924.

Zhang, J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K.R. (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." J Biomol Screen 4(2): 67-73.

Zolnerciks, J.K., Andress, E.J., Nicolaou, M. and Linton, K.J. (2011). "Structure of ABC transporters." Essays Biochem 50(1): 43-61.



“A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*”

J. Campos-Salinas, María Cabello-Donayre, R. García-Hernández, I. Pérez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro y J.M. Pérez-Victoria.

En este artículo se describe la caracterización de la proteína LABC5, involucrada en el tráfico intracelular del hemo proveniente de la hemoglobina endocitada. Mi contribución en este artículo fue la de llevar a cabo la caracterización del mecanismo de entrada del grupo hemo en las formas promastigotes de *L. donovani*, que forma parte de esta Tesis.

“Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters”

María Cabello-Donayre, S. Malagarie-Cazenave, J. Campos-Salinas, F.J. Gálvez, A. Rodríguez-Martínez, E. Pineda-Molina, L.M. Orrego, M. Martínez-García, M.P. Sánchez-Cañete, A.M. Estévez y J.M. Pérez-Victoria.

En este trabajo se describe el mecanismo utilizado por *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* para rescatar el hemo proveniente de la endocitosis de la hemoglobina. Todos estos resultados forman parte de esta Tesis.