



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **ESTUDIO DE UN CANAL DE CLORURO DE *LEISHMANIA* Y SU IMPORTANCIA EN LA FISIOLÓGIA DEL PARÁSITO**

**YENNY YOLANDA LOZANO JIMÉNEZ**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2011



# **ESTUDIO DE UN CANAL DE CLORURO DE *LEISHMANIA* Y SU IMPORTANCIA EN LA FISIOLÓGIA DEL PARÁSITO**

**YENNY YOLANDA LOZANO JIMÉNEZ**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**DOCTOR EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

Directora:

M.D. Ph.D., MARÍA MARCELA CAMACHO NAVARRO

Codirector:

Bioquímico. Ph.D., CLAUDIO JAIME GÓMEZ ALEGRÍA

Línea de Investigación:

Unidad de investigaciones moleculares

Grupo de Investigación:

Biofísica y biología de membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2011



*A mi hijo Andrés Santiago,  
Mi pedacito de corazón*

*Es hermoso saber que, en estos  
tiempos tan materiales, el éxito  
científico no está preservado  
solo a la disponibilidad de  
recursos materiales, sino  
también al talento, la  
creatividad, al amor por la  
ciencia y a otros valores.*

*Luis A Mortero*

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, al Departamento de Farmacia y al Centro Internacional de Física por la formación académica, profesional y personal; además por proporcionarme las instalaciones para desarrollar mi trabajo de investigación.

A la vicerrectora académica por su colaboración y apoyo con la beca de estudiantes sobresalientes de posgrado.

A Colciencias por la financiación del proyecto Canales iónicos de cloruro de *Leishmania*, blancos terapéuticos potenciales. Número 519-2010 Banco proyectos Salud-nacional, 2228519289191, Hermes 13001.

A la doctora Marcela Camacho por su colaboración y apoyo para desarrollar este trabajo.

Al grupo de investigación en biofísica y biología de membranas. En especial a Gladis Montoya, Camilo Dorado, Nicolás Chacón, Adriana Urbina, María E. Forero y Martha L. Posada, por su colaboración en el diseño y realización de algunos experimentos.

Al profesor Enrico Nasi y a la profesora María Helena Ramírez por sus recomendaciones para desarrollo de este trabajo.

A mi familia y en especial a Andrés Santiago y Norman Edward por su comprensión, apoyo y paciencia durante la elaboración de este trabajo.

## Resumen

Leishmaniasis es una enfermedad producida por un parásito protozoario denominado *Leishmania* que presenta dos estadios: promastigote localizado en el intestino del insecto vector sujeto a un pH 7,0-8,0 y amastigote que se desarrolla dentro de una vacuola fagolisosomal del macrófago (pH 4,5-5,5). Para sobrevivir a estos ambientes los parásitos utilizan H<sup>+</sup> ATPasas acoplados a canales aniónicos. A pesar de las implicaciones funcionales de estas proteínas poco se conoce sobre su naturaleza. Nuestro grupo de investigación ha identificado corrientes de cloruro en ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con ARNm de *L. (L.) amazonensis* y *L. (V) braziliensis*; que pueden ser el resultado de la expresión de canales de cloruro voltaje dependientes. En este proyecto se identificó, clonó y caracterizó la primera proteína tipo CLC LbrM01\_V2.0210 en *L. (L.) amazonensis*, *L. (V) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* localizada en la membrana plasmática, bolsillo flagelar y organelos endolisosomales cuya función se asocia con transporte de aniones.

**Palabras clave:** Leishmaniasis, ATPasa H<sup>+</sup>, Corriente, Cloruro, Canal, Osmolaridad, pH

## Abstract

Leishmaniasis is a disease produced by a protozoan parasite that presents two stages: the promastigote located in the gut of the insect subject to a pH of 7.0-8.0 and the amastigote that develops within a phagolisosomal vacuole inside the macrophage (pH 4.5-5.5). To survive in these environments the parasites use a H<sup>+</sup> ATPase coupled to anionic channels. Despite of the functional implications of these proteins little is known about their nature. Our research group has identified chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes microinjected with mRNA of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V) braziliensis*; which may be the result of a voltage chloride channel expression. In this project it was identified, cloned and characterized the first protein type CLC LbrM01\_V2.0210 in *L. (L.)*

*amazonensis*, *L. (V) braziliensis* and *L. (V.) panamensis*. It is located in the plasmatic membrane, flagellar pocket and endolysosomal organelles and its function is related with anion transport.

**Keywords:** Leishmaniasis, H<sup>+</sup> ATPase, Current, Chloride, Channel, Osmolarity, pH



## Contenido

Resumen.....	V
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	XII
Introducción.....	1
Problema de investigación.....	3
Hipótesis.....	4
Objetivos.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivo específico.....	4
1. Marco teórico.....	5
1.1 Epidemiología.....	5
1.2 Formas clínicas.....	7
1.3 Agente etiológico.....	9
1.4 Ciclo de vida.....	10
1.5 Organización genómica de <i>Leishmania</i> .....	11
1.6 Membrana plasmática.....	12
1.7 Regulación del pH intracelular (pH <sub>i</sub> ) en <i>Leishmania</i> .....	14
1.8 Regulación del volumen celular en <i>Leishmania</i> .....	15
1.9 Potencial de membrana (V <sub>m</sub> ) en <i>Leishmania</i> .....	16
1.10 Canales y transportadores de cloruro.....	16
1.10.1 Receptores activados por ligando.....	17
1.10.2 Proteínas CLC.....	19
2. Metodología.....	23
2.1 Líneas celulares.....	23
2.1.1 Cultivo de parásitos.....	23
2.1.2 Cultivo de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK).....	24
2.2 Extracción de ARN de promastigotes de <i>Leishmania</i> .....	24

2.2.1	Fase de homogenización de la muestra.....	24
2.2.2	Fase de separación.....	25
2.2.3	Fase de precipitación .....	25
2.3	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	25
2.4	Diseño de oligonucleótidos .....	27
2.4.1	Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) .....	28
2.5	Purificación del fragmento <i>LbrM01_V2.0210</i> .....	29
2.6	Clonación de los productos de PCR.....	30
2.6.1	Ligación del producto de PCR al vector de expresión. ....	30
2.6.2	Transformación química de bacterias competentes .....	31
2.6.3	Análisis de clones positivos (PCR de colonia).....	32
2.7	Transfección en células HEK ( <i>Human Embryonic Kidney</i> ).....	33
2.8	Análisis bioinformático .....	34
2.8.1	Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético.....	34
2.8.2	Predicción de la estructura secundaria y perfil de hidrofobicidad .....	34
2.8.3	Modelamiento de la proteína.....	35
2.8.4	Validación .....	35
2.9	Identificación y análisis de proteínas.....	35
2.9.1	Obtención de proteínas totales.....	35
2.9.2	Cuantificación de proteínas .....	36
2.9.3	<i>Dot blot</i> .....	36
2.9.4	Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	37
2.9.5	Transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa ....	37
2.9.6	<i>Western blot (Inmunoblot)</i> .....	38
2.9.7	Inmunolocalización de proteínas sobre parásitos y células HEK 293 .....	38
2.9.8	Inmunofluorescencia .....	39
2.10	Caracterización funcional de un canal de cloruro .....	40
2.10.1	Registro de corrientes cloruro en células HEK .....	40
2.10.2	Caracterización de las corrientes de cloruro.....	41
2.11	Análisis estadístico .....	42
3.	Resultados y Discusión .....	43
3.1	Análisis de la expresión de un canal de cloruro.....	44
3.2	Clonación de un canal de cloruro de <i>Leishmania</i> .....	52
3.2.1	Análisis bioinformático.....	60

---

3.2.2	Transfección transitoria de células HEK 293 .....	69
3.3	Análisis electrofisiológico .....	72
3.3.1	Propiedades eléctricas pasivas .....	72
3.3.2	Propiedades eléctricas activas .....	74
4.	Conclusiones .....	80
5.	Perspectivas .....	81
6.	Anexo 1. ....	83
7.	Anexo 2. ....	85
8.	Anexo 3 .....	90
9.	Anexo 4 .....	92
10.	Bibliografía.....	93

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribución geográfica de leishmaniasis..	6
<b>Figura 2.</b> Reporte de casos de leishmaniasis en Colombia correspondiente a los años 1990 a 2010.....	8
<b>Figura 3.</b> Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i> ..	9
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	10
<b>Figura 5.</b> Cinetoplasto de promastigote de <i>L. braziliensis</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Membrana plasmática de <i>Leishmania</i> .....	13
<b>Figura 7.</b> Principales mecanismos de transporte iónico en la membrana plasmática de eucariotes.....	14
<b>Figura 8.</b> Característica estructural de los receptores activados por ligando .....	18
<b>Figura 9.</b> Estructura secundaria de los canales CFTR .....	18
<b>Figura 10.</b> Estructura de un intercambiador CLC.....	20
<b>Figura 11.</b> Filtro de selectividad del ión Cl <sup>-</sup> .....	21
<b>Figura 12.</b> Mecanismos de apertura y cierre del intercambiador <i>EcCLC</i> .....	22
<b>Figura 13.</b> Estructura en roseta de un cultivo de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> .....	23
<b>Figura 14.</b> Morfología característica de las células HEK 293. ....	24
<b>Figura 15.</b> Perfil de amplificación para la reacción de RT- PCR.....	29
<b>Figura 16.</b> Mapa del vector de expresión pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO ( <i>Invitrogen</i> ).....	30
<b>Figura 17.</b> Secuencia del vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO..	31
<b>Figura 18.</b> ARN total de <i>Leishmania</i> .....	44
<b>Figura 19.</b> RT- PCR de <i>Leishmania</i> .....	46
<b>Figura 20.</b> Geles de electroforesis SDS-PAGE al 8,0%. Evaluación de los extractos proteicos en diferentes buffer de lisis.....	47
<b>Figura 21.</b> Gel de electroforesis SDS-PAGE a 8,0%. Evaluación de los extractos proteicos en buffer de lisis RIPA y NP-40.....	48
<b>Figura 22.</b> <i>Dot blot</i> .....	49
<b>Figura 23.</b> <i>Western blot</i> de extractos proteicos totales de <i>Leishmania</i> .....	49

<b>Figura 24.</b> Microscopía de luz e inmunofluorescencia de <i>L. amazonensis</i> .....	50
<b>Figura 25.</b> Microscopía de fluorescencia de <i>L. braziliensis</i> .....	51
<b>Figura 26.</b> Microscopía de luz e inmunofluorescencia de las especies evaluadas.....	51
<b>Figura 27.</b> Producto de PCR de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	53
<b>Figura 28.</b> Evaluación de los productos de PCR de colonia.....	54
<b>Figura 29.</b> Secuencia nucleotídica consenso de <i>L braziliensis</i> .....	55
<b>Figura 30.</b> Comparación de la secuencia consenso con la secuencia reportada en bases de datos (GeneID: 5412354).....	56
<b>Figura 31.</b> Productos de PCR de colonia.....	58
<b>Figura 32.</b> Comparación de las secuencias proteicas para cada una de las especies evaluadas con la secuencia reportada (LbrM01V2.0210).....	59
<b>Figura 33.</b> Árbol filogenético obtenido usando el método <i>Neighbor-joining</i> .....	62
<b>Figura 34.</b> Alineamiento de las secuencias codificantes para canales e intercambiadores CLC. ....	64
<b>Figura 35.</b> Perfil de hidrofobicidad y esquema topológico de la secuencia proteica consenso. ....	65
<b>Figura 36.</b> Estructura del canal de <i>Cyanidioschyzon merolae</i> .....	66
<b>Figura 37.</b> Modelo estructural de la secuencia proteica consenso obtenido con el programa PHYRE 2. ....	67
<b>Figura 38.</b> Vía de transporte iónico.....	68
<b>Figura 39.</b> Microscopía de fluorescencia de células HEK transfectadas.....	70
<b>Figura 40.</b> Microscopía confocal de células HEK transfectadas en diferentes planos.....	71
<b>Figura 41.</b> <i>Western blot</i> de células HEK 297 transfectadas y sin transfectar. ....	72
<b>Figura 42.</b> Capacitancias de membrana ( $C_m$ ) de las células control y células transfectadas. ....	73
<b>Figura 43.</b> Potencial de membrana ( $V_m$ ) de las células control y células transfectadas..	74
<b>Figura 44.</b> Propiedades de las corrientes de células control y transfectadas en condiciones isotónicas. ....	75
<b>Figura 45.</b> Corriente de cola para una célula HEK transfectada. ....	76
<b>Figura 46.</b> Relación corriente (pA) vs voltaje (mV).....	77
<b>Figura 47.</b> Propiedades de las corrientes de células transfectadas con y sin inhibidor..	78
<b>Figura 48.</b> Propiedades de las corrientes de células transfectadas expuestas a diferente pH.....	79

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de casos de las tres formas clínicas de leishmaniasis en Colombia correspondiente a los años 2005 a 2010.....	8
<b>Tabla 2.</b> Características genómicas de <i>Leishmania</i> . .....	11
<b>Tabla 3.</b> Características electrofisiologías de los principales canales tipo CLC [79][81][6]. .....	19
<b>Tabla 4.</b> Reactivos y cantidades empleadas para la síntesis de ADNc .....	26
<b>Tabla 5.</b> Reactivos y cantidades empleadas para la mezcla de reacción en la síntesis de ADNc .....	26
<b>Tabla 6.</b> Características de los oligonucleótidos diseñados.....	27
<b>Tabla 7.</b> Reactivos y cantidades empleadas para PCR del fragmento <i>LbrM01_V2.021028</i>	
<b>Tabla 8.</b> Reactivos y cantidades empleadas para la ligación de los fragmentos purificados .....	31
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ARN total para las diferentes especies estudiadas. .....	45
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones ( $\mu$ g/mL) de proteína total para las especies estudiadas. ....	47
<b>Tabla 11.</b> Concentraciones ( $\mu$ g/mL) de producto de PCR para las diferentes especies estudiadas. ....	57
<b>Tabla 12.</b> Secuencias que presentan similitud a la secuencia consenso.....	60
<b>Tabla 13.</b> Valores de capacitancia para los grupos evaluados (células control y células transfectadas) .....	72
<b>Tabla 14.</b> Valores de potencial de membrana para los grupos evaluados.....	73
<b>Tabla 15.</b> Efecto de DIDS (200 $\mu$ M) sobre promedio de corriente (Iss) .....	78

## Introducción.

La leishmaniasis, producida por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*, es una enfermedad de distribución mundial que afectan a millones de personas. De acuerdo a la organización mundial de la salud se estima que anualmente hay 12 millones de casos nuevos, con más de 350 millones de personas en riesgo [1]. En Colombia esta enfermedad es endémica y se encuentra en 91% del territorio ubicado bajo los 1750 m sobre el nivel del mar, por lo que se estima que 10 millones de personas se encuentran en riesgo [2]. En los últimos años se ha reportado un incremento en el número de casos notificados atribuido principalmente a factores ambientales [3] y de orden público lo que convierte a esta enfermedad en un problema de salud pública [4].

Durante el ciclo de vida *Leishmania* se adapta y prolifera en un ambiente donde las condiciones ambientales son drásticas, manteniendo su pH intracelular y osmolaridad en rangos fisiológicos; para sobrevivir a las fluctuaciones de estos ambientes *Leishmania* usa un gradiente electroquímico de protones, mantenido por una H<sup>+</sup> ATPasa acoplada a canales aniónicos. Sin embargo, poco se conoce sobre los transportadores y la naturaleza de los canales iónicos del parásito que regulan estos mecanismos. Los estudios descritos hasta el momento demuestran la presencia de canales de cloruro CLC asociados a la regulación de pH intracelular y volumen celular en diferentes células mamíferas[5;6], por lo tanto, se sugiere que *Leishmania* podría utilizar sistemas de transporte iónico para la regulación de su homeóstasis iónica.

Recientemente el grupo de investigación en Biofísica y biología de membranas identificó una corriente de cloruro en ovocitos del anfibio *Xenopus laevis* microinyectados con ARNm de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. La corriente identificada presenta una cinética y farmacología diferente a las corrientes endógenas del ovocito, lo cual puede resultar de la expresión de proteínas del parásito que codifican para canales cloruro [7].

En este trabajo se presenta por primera vez evidencia de la expresión de canales de cloruro tipo CIC-3 en *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. La homología de las secuencias encontradas con CIC endosomales y la ubicación de estas proteínas en el bolsillo flagelar y la membrana plasmática de *Leishmania* permiten sugerir que este canal podría estar asociado con procesos de acidificación de compartimientos endolisosomales indispensable en el tráfico vesicular para la adquisición de nutrientes desde el hospedero.



## Problema de investigación

Durante el ciclo de vida *Leishmania* debe sobrevivir a las fluctuaciones ambientales ocasionadas por los diferentes ambientes celulares en los hospederos; en el intestino del insecto tolera un pH entre 7,0 y 8,0 [4;8;9] y un gradiente de osmolaridad variable; en el hospedero vertebrado soporta un pH entre 4,5 y 5,5 [10] con un gradiente de osmolaridad bajo [11]. Para sobrevivir a las fluctuaciones de estos ambientes los parásitos usan una H<sup>+</sup> ATPasa [8], acoplada a un canal aniónico [12;13] que puede corresponder a un canal de cloruro; además, usan otros sistemas de transporte que permiten desechar productos del metabolismo y controlar la osmolaridad [14].

En nuestro grupo se han identificado corrientes de cloruro en ovocitos del anfibio *Xenopus laevis* microinyectados con ARNm de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, que pueden resultar de la expresión de proteínas del parásito. La elucidación de estas corrientes permitiría generar conocimiento sobre los canales iónicos del parásito y su relación con la funcionalidad, fisiología e infectividad, además de su proyección como posibles blancos de interés farmacológico.

La pregunta que se quiere responder es: **¿Cuál es la identidad de dicho canal y cuál podría ser su importancia en la fisiología del parásito?**

## Hipótesis

Las corrientes de cloruro detectadas por nuestro grupo luego de la inyección de ARN mensajero de *Leishmania* en ovocitos de *Xenopus Laevis* son el resultado de la expresión de canales cloruro del parásito.

## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar un canal de cloruro de *Leishmania* e iniciar estudios para determinar su papel funcional en la fisiología del parásito.

### Objetivo específico

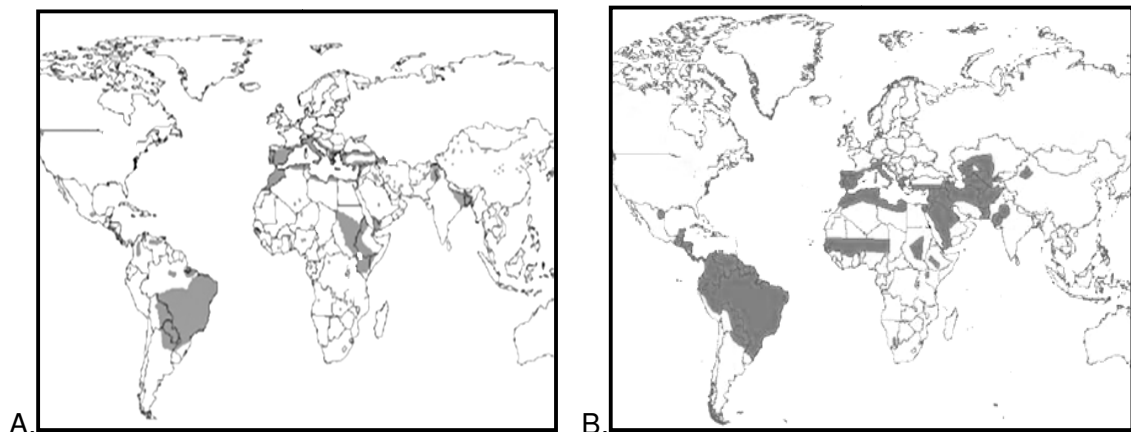
1. Analizar la expresión de potenciales canales de cloruro de *Leishmania*.
2. Clonar un canal de cloruro de *Leishmania*.
3. Caracterizar funcionalmente un canal de cloruro

# 1. Marco teórico

## 1.1 Epidemiología

La leishmaniasis hace parte de un grupo de enfermedades parasitarias transmitidas por la picadura de insectos flebótomos infectados por protozoos del género *Leishmania* [15]. Se presenta con diversas formas clínicas que van desde úlceras (leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea) hasta formas diseminadas potencialmente fatales (leishmaniasis visceral).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la leishmaniasis presenta una amplia distribución mundial, siendo endémicas en 98 países, con más de 350 millones de personas en riesgo. Se calcula una prevalencia mundial de 12 millones de casos, con una incidencia de 2 millones de casos nuevos por año; 1,5 millones corresponden a leishmaniasis cutánea y 500.000 corresponden a leishmaniasis visceral [1]. Noventa por ciento de los casos de leishmaniasis cutánea se localizan en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria; 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea se registran en Bolivia, Brasil, Perú y más de 90% de los casos de leishmaniasis visceral se encuentran en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudan [16] (figura 1).



**Figura 1.** Mapa de distribución geográfica de leishmaniasis. Las zonas en color gris representan las regiones que reportan casos de leishmaniasis. A. Leishmaniasis mucocutánea. B. Leishmaniasis visceral [17].

En Colombia, esta enfermedad se presenta de forma endémica, en focos naturales localizados en su mayoría en zonas rurales que incluyen bosque seco y bosque húmedo tropical (aproximadamente 94% del territorio nacional) [18], con excepción de San Andrés Islas, Atlántico y Bogotá D.C., por lo que se estima que 10 millones de personas se encuentran en riesgo [2].

En los últimos años se ha presentado un aumento de la incidencia de la leishmaniasis en Colombia. En la década de los años 90 se notificaron en promedio 6.500 casos por año y en los años 2005 y 2006 aumentaron a 20.000 [2] (figura 2), incremento atribuido a diversos factores como ampliación en la urbanización no planeada, deforestación, desarrollo de asentamientos humanos no planificados, migración de población de áreas rurales a urbanas [3], desplazamiento forzado, limitaciones en el suministro de tratamientos asociado a la restricción en el uso de medicamentos específicos, diagnósticos inadecuados o tardíos y más recientemente la asociación de la leishmaniasis con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [19]. Igualmente, el surgimiento de cepas resistentes a fármacos [20-23] y el lento desarrollo de vacunas efectivas, han convertido a estas enfermedades en un problema de salud pública de dimensiones globales [4].

## 1.2 Formas clínicas

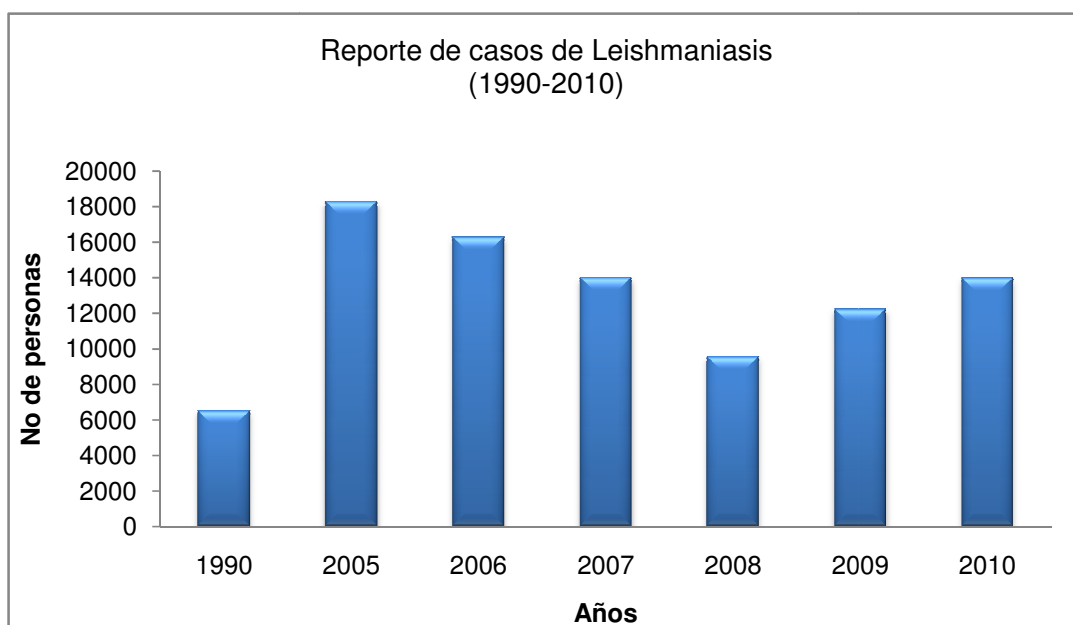
La leishmaniasis presenta dos principales formas clínicas: leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral, asociadas a la especie y al estado inmunológico del individuo infectado. La complicación de mayor consideración de la leishmaniasis cutánea es la leishmaniasis mucosa que se presenta principalmente en el nuevo mundo [24;25].

Leishmaniasis visceral o kala-azar (fiebre negra), es producida por especies del complejo *Leishmania donovani*, que incluye las especies *L. donovani* (Europa, norte de África y Asia), *L. infantum* y *L. chagasi* (en América central y del sur) [16]. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre prolongada, pérdida de peso, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia y pancitopenia; en estados avanzados las infecciones son recurrentes, siendo mortal cuando no se administra tratamiento oportuno [24;25].

Leishmaniasis cutánea (leishmaniasis tegumentaria americana, leishmaniasis cutánea del Viejo mundo o botón de Oriente) es producida por especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*; se asocia con mayor frecuencia a *L. (L) major*, *L. (L) trópica*, (en regiones de África, Medio Oriente, India y Sudán), *L. (L) chagasi*, *L. (L) amazonensis* y *L. (L) mexicana* (en América central y del sur). Típicamente se presenta como una lesión ulcerosa, de bordes bien definidos, redondeada, fondo limpio, de aspecto granular, bordes hiperémicos y engrosados, indolora, habitualmente distribuida en cara y extremidades en el lugar de la picadura del vector y en ocasiones, se presentan infecciones bacterianas secundarias a la lesión. De acuerdo al estado inmunológico del individuo puede curarse de manera espontánea o presentar una forma diseminada denominada leishmaniasis cutánea difusa que afecta la mayor parte del cuerpo [24;25].

En la leishmaniasis mucosa (espúndia), producida por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* (en América Central y del Sur), los primeros síntomas son eritema y edema de mucosas nasofaríngeas y posterior destrucción de mucosas y tejido cartilaginoso. Estas lesiones suelen ser desfigurantes y no se curan espontáneamente. Se producen infecciones bacterianas secundarias a la lesión y malnutrición lo que puede causar la muerte [25].

En Colombia se presentan todas las formas clínicas de la enfermedad, siendo la más frecuente la leishmaniasis cutánea (98% de los casos), (Tabla No 1), principalmente en los departamentos de Antioquia, Caquetá, Guaviare, Meta, Putumayo, Nariño y Santander. Leishmaniasis mucosa (1% de los casos) en Antioquia, Meta, Guaviare, Caquetá, Nariño, Putumayo y leishmaniasis visceral (menor al 1% de los casos reportados) endémica en el valle del río Magdalena principalmente en los departamentos de Bolívar, Córdoba, Sucre, Cundinamarca, Huila, Tolima y Santander [26].



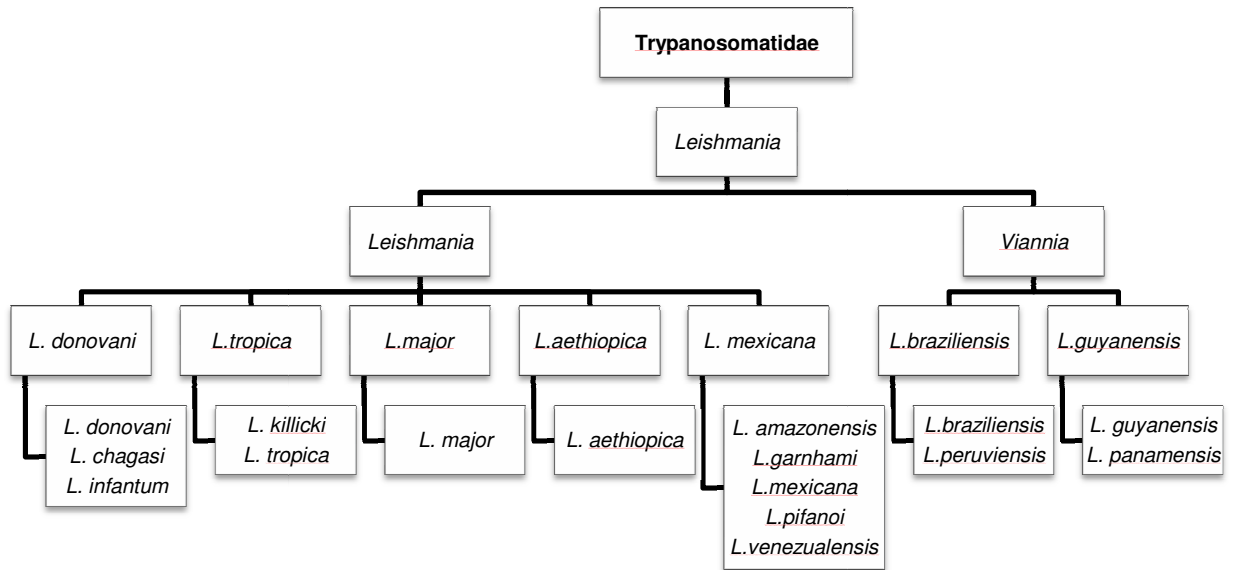
**Figura 2.** Reporte de casos de leishmaniasis en Colombia correspondiente a los años 1990 a 2010.

**Tabla 1.** Porcentaje de casos de las tres formas clínicas de leishmaniasis en Colombia correspondiente a los años 2005 a 2010.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010
L. cutánea	99,3	99,2	94,7	98,8	98,7	98,7
L. mucosa	0,3	0,5	0,6	0,9	0,8	1,0
L. visceral	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3

### 1.3 Agente etiológico

*Leishmania* es un protozooario intracelular que pertenece a la familia Trypanosomatidae, orden Trypanosomatida clase Kinetoplastida, filo Euglenozoa. Posee dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, cada uno con diferentes complejos y especies separados por características bioquímicas y moleculares (figura 3).

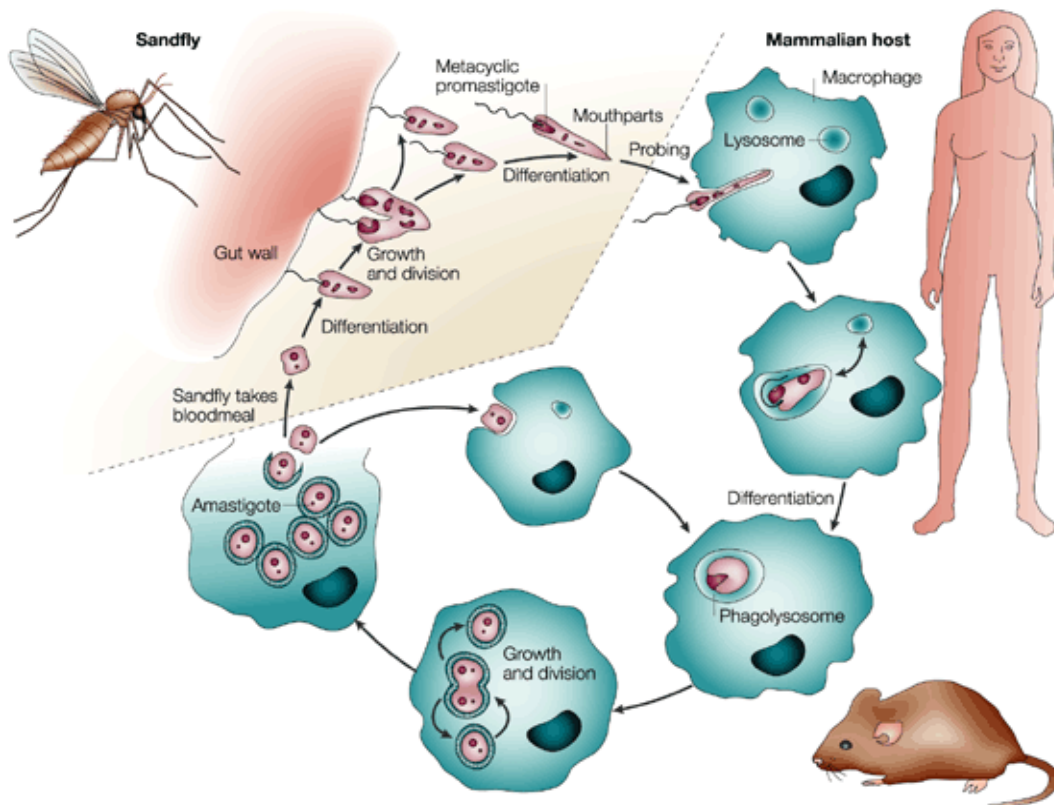


**Figura 3.** Clasificación taxonómica de *Leishmania*. Adaptado de WHO Technical Report Series [16].

Las características morfológicas de los protozoarios del género *Leishmania* corresponden a dos principales formas parasitarias: amastigotes y promastigotes. Los amastigotes son parásitos ovalados que miden de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , no poseen flagelo y se localizan dentro de una vacuola parasitófora en macrófagos; los promastigotes son la forma flagelar que mide de 10 a 12  $\mu\text{m}$  y se encuentran en el tracto digestivo del insecto vector [24]; dentro de esta morfología se han descrito varias formas intermedias: promastigotes procíclicos con forma ovoide, ligeramente móviles, con alta tasa de replicación pero no infectivos; promastigotes nectomonados con forma alargada, delgada; promastigotes leptomonados cortos y anchos, alta tasa de replicación, no infectivos y promastigotes metacíclicos: pequeños, con un flagelo largo y con capacidad de migrar a la probóscide del insecto, y son altamente infectivos [27].

## 1.4 Ciclo de vida

La transmisión de esta enfermedad ocurre vía picadura de un insecto díptero del género *Lutzomia* en el Nuevo mundo y *Phlebotomus* en el Viejo mundo. Este parásito tiene como reservorios a animales domésticos, silvestres y al hombre [28]. El ciclo de vida inicia cuando el insecto ingiere sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes, los cuales son liberados en el intestino del insecto vector; en este ambiente el amastigote se diferencia en promastigote, el cual se multiplica por fisión binaria migrando a la probóscide del vector desde donde son inoculados a otro hospedero vertebrado. En el interior del nuevo huésped los promastigotes son fagocitados por células mononucleares, en donde se diferencian a nuevos amastigotes; finalmente se multiplican y salen a reinvasar células dendríticas y fibroblastos al igual que macrófagos [29] (figura 4). Durante su ciclo de vida *Leishmania* encuentra ambientes caracterizados por cambios en pH, composición iónica, entre otros, entornos que hacen necesario que el parásito exprese mecanismos reguladores para sobrevivir [30].



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Leishmania* (tomado de The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice [31]).



## 1.5 Organización genómica de *Leishmania*

En la actualidad se conocen 5 secuencias genómicas de *Leishmania*: *L. mexicana*, cepa MHOM/GT/2001/U1103, *L. major*, cepa MHOM/IL/80/Friedlin, zymodeme MON-103; *L. infantum*, cepa MCAN/ES/98/LLM-877, *L. donovani*, referencia: BPK282A1 y *L. braziliensis*, cepa MHOM/BR/75M2904, ([www.genedb.com](http://www.genedb.com)); Estos genomas se caracterizan por tener aproximadamente 8 mil genes distribuidos en 34 a 36 cromosomas (tabla 2).

**Tabla 2.** Características genómicas de *Leishmania*.

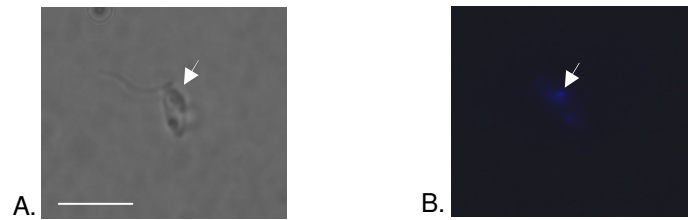
	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. donovani</i>
<b>No de cromosomas</b>	36	36	35*	34	36
<b>Tamaño (pb)</b>	32.816.678	32.134.935	32.005.207	32	32
<b>Genes codificantes</b>	8.298	8.154	8.153	**	**
<b>Pseudogenes</b>	97	41	161	**	**

\*La reducción en el número de cromosomas se debe a la fusión del cromosoma 20 y 34 [32].

\*\* Datos no conocidos

A pesar de una divergencia evolutiva de 20 a 100 millones de años de estas especies [33], el estudio genómico indica alta proximidad filogenética que se conserva en más de 99% de los genes. Las diferencias genómicas radican sólo en 78 genes especie específicos, 5 para *L. major*, 26 para *L. infantum* y 47 para *L. braziliensis*, con una expresión diferencial dependiendo del estadio del parásito (amastigote-promastigote) [32].

*Leishmania* se caracteriza por tener un organelo denominado cinetoplasto, ubicado cerca al cuerpo basal del flagelo (figura 5), donde se ubica el ADN mitocondrial que se encuentra organizado en maxicírculos (20-40 kb), que codifican para la mayoría de proteínas y en minicírculos (0,65-2,5 kb), que codifican para diversos ARNs [34].



**Figura 5.** Cinetoplasto de promastigote de *L. braziliensis*. A. Microscopía de luz de promastigote. La flecha indica la ubicación del cinetoplasto. B. Microscopía de fluorescencia marcación de ADN con el colorante Hoechst (1:10000). La barra representa 10  $\mu\text{m}$

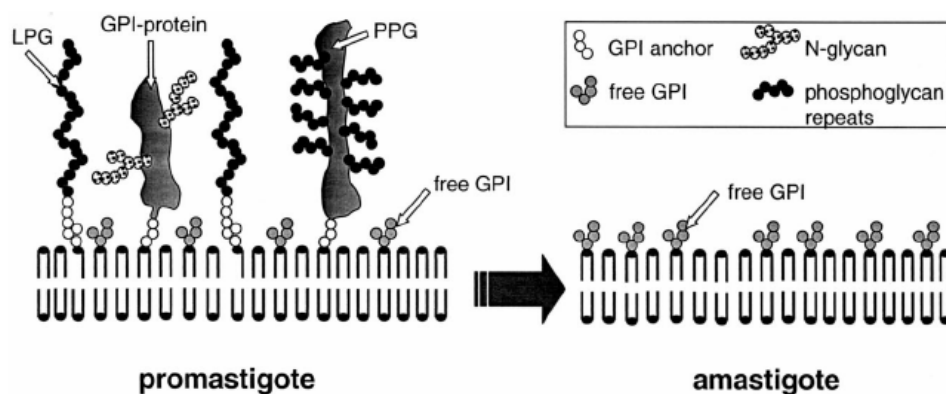
El genoma está organizado en estructuras denominadas policistrones que son genes agrupados en unidades de transcripción que codifican de 10 a cientos de proteínas arreglados secuencialmente en la misma hebra [35]. El proceso de transcripción se inicia por activación de regiones sobre cada cromosoma en ausencia de factores de iniciación de la transcripción. Este proceso se caracteriza por la utilización de ADN molde que no posee intrones (secuencias no codificantes), el cual se transcribe a ARN por la polimerasa II. El ARN producido por la transcripción (transcrito primario) es un precursor policistrónico (pre ARNm) que requiere control postranscripcional de un proceso de trans-empalme, (trans-splicing, corriente abajo) en el que se generan transcritos monocistrónicos con metil guanosina (*CAP*) en la región 5' final y poliadenilación con una cola de poli A en la región 3' final [36;37]. Debido a la ausencia de control transcripcional, la regulación en la expresión de genes estadio específica involucra secuencias dentro de las regiones 3'-no traducidas (3'-UTR) que determinan la abundancia de ARNm y estabilidad del transcrito [35].

## 1.6 Membrana plasmática

La membrana plasmática de *Leishmania* está compuesta principalmente por: lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicanos (PPG), glicoproteínas (GP63) y un grupo de glicoinositolfosfolípidos (GIPLS; figura 6). Los LPG son glicolípidos compuestos de unidades repetidas de disacárido fosforilado que se han asociado a procesos de adhesión al macrófago y al intestino del insecto vector [38], a resistencia a la acción del complemento e hidrolasas extracelulares y alteración de la maduración del fagolisosoma [39]. Debido a que los LPG se encuentran implicados en la inhibición de la fusión endosoma fagosoma en macrófagos [40] son ausentes en el estadio amastigote [41]. Los PPG son proteínas altamente glicosiladas constituidas por un esqueleto polipeptídico y

se encuentran implicadas en el proceso de infección e inmunomodulación del macrófago [42]. La proteína GP63 es la más abundante en la superficie del promastigote y amastigote, pertenece a la familia de las metaloproteasas con un tamaño de 63 kDa, se encuentra implicada en procesos de inhibición de lisis por complemento, facilita la unión a receptores del macrófago y evita la activación de factores de transcripción implicados en la respuesta inmune innata [43]. Los GIPLS están presentes en el estadio amastigote asociados a la reducción de la actividad leishmanicida por parte del macrófago debido a que inhiben la síntesis de óxido nítrico [44].

La cara citoplasmática de la membrana posee una red de microtúbulos que determinan la distribución de proteínas de membrana y moléculas de esteroles, esta red varía de acuerdo a la forma del parásito y termina cerca del bolsillo flagelar, en donde toma lugar los procesos de endocitosis y exocitosis [28].



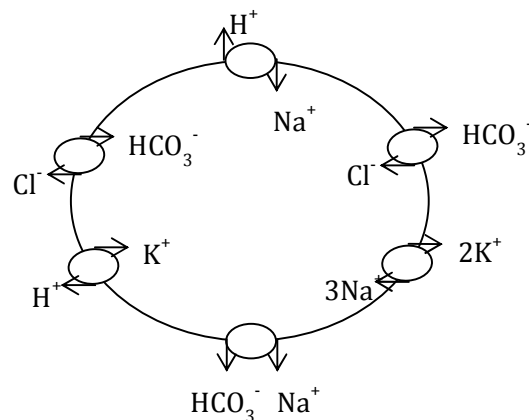
**Figura 6.** Membrana plasmática de *Leishmania*. LPG lipofosfoglicanos; *GPI -protein* Glicoproteínas; PPG proteofosfoglicanos; *free GPI* (moléculas intermediarias de la síntesis de glicoproteínas y glicoinositolfosfolípidos). En el amastigote se observa disminución en la expresión de proteínas ancladas a GPI [41].

Otras proteínas ubicadas en la membrana de *Leishmania* incluyen transportadores de glucosa, cuya función es permitir el ingreso glucosa, fructosa y manosa como fuente metabólica de energía; se encuentran ubicados en la membrana del bolsillo flagelar y en la membrana plasmática [45] [46]. El transportador mioinositol utiliza el gradiente electroquímico de protones para permitir el ingreso de una molécula de mioinositol, importante para la proliferación de *Leishmania* [47]. El transportador biopterina (BT1) que es una molécula precursora de folatos, importante para la proliferación de *Leishmania*, se ubica en la membrana del bolsillo flagelar y en la membrana plasmática [48] y los

transportadores de nucleósidos presentes en la membrana plasmática y bolsillo flagelar, incorporan bases nitrogenadas necesarias para los procesos de proliferación celular [49].

## 1.7 Regulación del pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) en *Leishmania*

Para muchas células eucariotas los mecanismos de regulación de  $\text{pH}_i$  involucran la activación selectiva de proteínas de membrana [50-52] (figura 7). Si el  $\text{pH}_i$  intracelular es ácido se activan transportadores de tipo antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que permiten la salida de  $\text{H}^+$  e ingreso de iones  $\text{Na}^+$  y además se activa el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  dependiente de  $\text{Na}^+$ , que toma  $\text{HCO}_3^-$  del medio extracelular y lo intercambia por  $\text{Cl}^-$  intracelular. Si ocurre una sobrecarga alcalina se activan mecanismos regulados por el ión  $\text{HCO}_3^-$ , como el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  independiente de  $\text{Na}^+$ , el cual toma iones  $\text{Cl}^-$  del medio extracelular y saca iones  $\text{HCO}_3^-$ , y el cotransportador simporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , el cual ingresa  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ . Estos mecanismos van acoplados a ATPasas electrogénicas para equilibrar y mantener la homeostasis de los iones intracelulares [13;53].



**Figura 7.** Principales mecanismos de transporte iónico en la membrana plasmática de eucariotes.

Estos mecanismos de regulación son aplicados por *Leishmania* debido al amplio rango de cambios en  $\text{pH}$  (de 2 unidades) que debe tolerar [54]. El estadio promastigote ubicado principalmente en el intestino del insecto vector soporta un  $\text{pH}$  entre 7,0 y 8,0 [8;9], mientras que el amastigote, que sobrevive dentro de una vacuola parasitófora del macrófago, resiste  $\text{pH}$ s entre 4,5 y 5,5 [10]. Sin embargo, el parásito es capaz de mantener su  $\text{pH}_i$  cercano a la neutralidad [55]. En la membrana del parásito se ha localizado una  $\text{H}^+$  ATPasa tipo P [8;56;57] cuya función es excretar protones al medio extracelular para mantener un  $\text{pH}_i$  intracelular cercano a la neutralidad [55], mantener el

potencial de membrana y generar un gradiente electroquímico que permita el transporte activo de sustratos como L-prolina y D- glucosa [55][58][12;59]. Se ha demostrado que esta H<sup>+</sup> ATPasa regula el pH<sub>i</sub> en promastigotes de *L. donovanni* [55;60], en amastigotes y promastigotes de *L. major* [12;13;55] y en promastigotes de *L. mexicana amazonensis* [8]. La H<sup>+</sup> ATPasa se encuentra acoplada funcionalmente a un canal aniónico sensible a 4-4-diisothiocianostilbeno-2-2-ácido disulfónico (DIDS; inhibidor de canales aniónicos) de naturaleza desconocida, y cuya función sería disipar el potencial de membrana generado por la activación de la bomba [8;13;59].

Diversos estudios han demostrado que las variaciones ambientales a las que se encuentra expuesto el parásito activa procesos de transporte de productos de desechos originados durante el metabolismo [14]; así como la expresión de genes que contribuyen a la diferenciación morfológica y expresión de proteínas estadio específicas. Un aumento de pH incrementa la tasa metabólica y proliferación celular; mientras que disminución en el pH incrementa el desacoplamiento entre actina y miosina reduciendo la movilidad de *Leishmania* en el proceso de diferenciación a amastigote [14;60-62].

## 1.8 Regulación del volumen celular en *Leishmania*

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* se enfrenta a factores de estrés fisiológico ocasionados por las variaciones en las condiciones osmóticas del tracto digestivo del insecto vector y por los cambios en la composición química presentes en la vacuola parasitófora al interior del macrófago [63].

Los promastigotes de *Leishmania* se desplazan por el sistema digestivo del insecto a través de un gradiente osmótico ( $\geq 300$  mOsm) que resulta de la ingesta de alimentos del vector y de la sección del tracto digestivo del mismo, lugar en el que se encuentra el parásito [64]. En la vacuola parasitófora la composición interna es altamente variable pero usualmente con una baja fuerza osmótica entre 150 y 250 mOsm [11]. Para enfrentarse a estas fluctuaciones y mantener constante el volumen celular, los parásitos activan un sistema regulador de volumen celular sensible a cambios osmóticos [65]. Frente a un medio hipotónico presentan aumento del volumen celular regresando al volumen original en un proceso denominado decremento del volumen regulado (RVD); durante este proceso se presenta liberación de una serie de solutos al medio intracelular,

entre los que se encuentran iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Cl}^-$  provenientes de acidocalcisomas [66] y algunos aminoácidos como glutamina, lisina, prolina y principalmente alanina [53;65]. Mientras que la exposición del parásito a estrés hipertónico genera como respuesta aumento en la síntesis de alanina [67]. Esta regulación incluye la activación de sistemas de transporte entre los que se encuentran canales aniónicos [53], modulados por proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA) y ácido araquidónico [68].

## 1.9 Potencial de membrana ( $V_m$ ) en *Leishmania*

El potencial de membrana aparece como consecuencia directa de las vías de transporte iónico usadas por la célula [12]. En condiciones normales el  $V_m$  en promastigotes de *Leishmania major* es  $-113 \pm 4$  mV [12] a  $-116 \pm 2$  mV [69], mientras que en amastigotes es  $-83$  mV [53], un potencial despolarizado con respecto al valor del promastigote; este fenómeno se explica por la activación de un canal aniónico acoplado a una  $\text{H}^+$  ATPasa tipo P [12]. La naturaleza del canal es desconocida; sin embargo, se ha reportado la presencia de canales aniónicos sensibles a DIDS en *L. major* y *L. amazonensis* que están involucrados en ajuste de  $V_m$  y osmolaridad [8;12;13;53]. Asimismo, estudios electrofisiológicos en bicapas lipídicas han revelado la presencia de canales aniónicos tipo cloruro en *L. mexicana* [70]. En promastigotes de *Leishmania amazonensis* se ha demostrado la presencia de una corriente de cloruro voltaje dependiente [7] que sugiere la presencia de canales cloruro tipo CLC en el parásito. Estos resultados indican que los canales aniónicos en *Leishmania* contribuyen de manera significativa a ajustar el  $V_m$  en el parásito para la toma de nutrientes y acumulación de aminoácidos requeridos para el proceso de osmoregulación [12;53;71].

## 1.10 Canales y transportadores de cloruro

Los canales y transportadores iónicos de cloruro son proteínas integrales de membrana que median principalmente la traslocación de iones  $\text{Cl}^-$  a través de la célula. Se clasifican de acuerdo a su habilidad para hacer un transporte pasivo o activo: el transporte pasivo mueve los solutos a favor de un gradiente electroquímico, mientras que el transporte activo utiliza energía externa para mover solutos en contra de un gradiente. El transporte pasivo se clasifican en tres tipos: uniportadores que transportan un tipo de molécula a favor de su gradiente y los antiportadores y simportadores que acoplan el movimiento de una molécula en contra de su gradiente electroquímico con el movimiento de otra

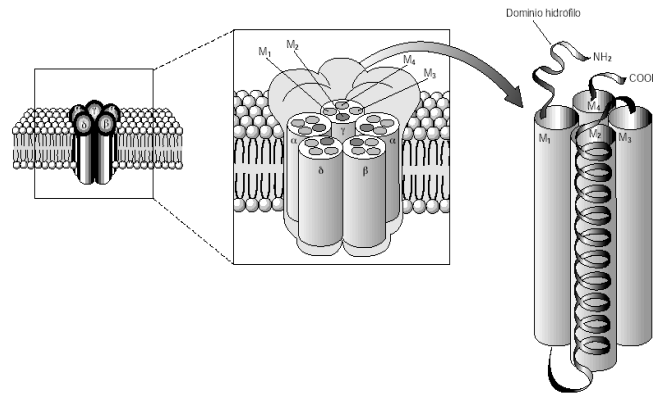
molécula a favor de su gradiente. De igual forma, los canales iónicos proporcionan a los iones un trayecto para que se transporten a una alta tasa sin gasto energético. En el transporte activo se encuentran los transportadores primarios (bombas ATPasas) que utilizan ATP para mover un soluto en contra del gradiente electroquímico [72].

La apertura de estas proteínas ocurre por un estímulo como el cambio de  $V_m$ , unión de un ligando, cambio en la temperatura o estrés en la membrana [73] y tienen como función principal mantener el  $V_m$ , la homeostasis iónica, la regulación de volumen, pH y excitabilidad eléctrica [74].

Los canales de cloruro corresponden a tres categorías dependiendo de su estructura molecular: receptores activados por ligando (receptor GABA: ácido gama aminobutírico y glicina), canales CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística) y proteínas CLC (canal de cloruro) [74].

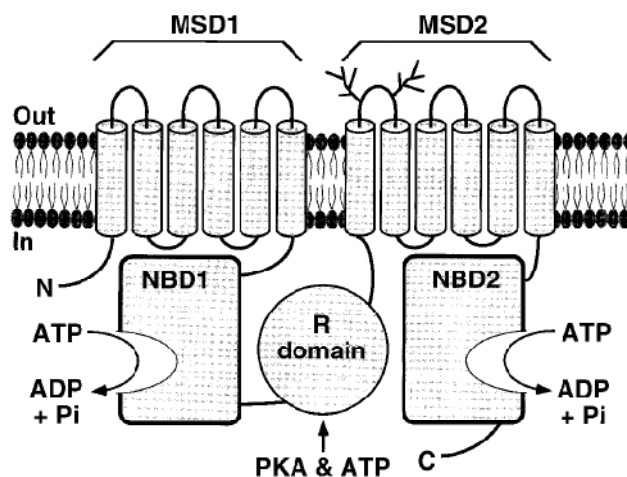
### **1.10.1 Receptores activados por ligando**

Los receptores GABA y glicina pertenecen a la familia de canales cloruro activados por ligando, que permiten el paso de iones  $Cl^-$  después de que un ligando se ha unido al receptor; se encuentran constituidos por 5 subunidades, cuya combinación generan un subtipo diferente de canal [75]. Los receptores GABA poseen 2 subunidades alfa, 2 subunidades beta y una subunidad gamma [76] y los receptores glicina poseen cuatro subunidades  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\alpha_3$  y  $\beta$  que constituyen el canal. Los receptores activados por ligando se encuentran constituidos de cuatro segmentos transmembrana (M1-M4) de los cuales el segmento M2 forma la pared del canal (figura 8). En mamíferos los receptores GABA se encuentran principalmente en cerebro, mientras que los receptores glicina están en médula espinal y tronco cerebral. Su función principal consiste en inhibir la transmisión neuronal en células del sistema nervioso central [74].



**Figura 8.** Característica estructural de los receptores activados por ligando [77]

Los canales CFTR son proteínas que pertenecen a la familia de transportadores ABC (*cassette* de unión a ATP) que utilizan la energía obtenida de la hidrólisis de ATP para transportar iones. A nivel estructural los canales CFTR se encuentran constituidos por dos motivos (MSD1, MSD2) cada uno compuesto de seis segmentos transmembrana (TM1-TM6) y dos dominios de unión a nucleótidos NBD (dominios de unión a nucleótidos; figura 9). Los motivos (MSD1, MSD2) se encuentran enlazados por un dominio regulador R, que controla la actividad del canal cuando es fosforilado por PKA. Estas proteínas se localizan en la membrana apical de las células epiteliales del sistema respiratorio y digestivo, glándulas sudoríparas, páncreas, y epidídimo [74]. Su función está implicada en regulación y secreción de electrolitos [74].



**Figura 9.** Estructura secundaria de los canales CFTR [78].



### 1.10.2 Proteínas CLC

Los CLC pertenecen a una familia de proteínas activadas por voltaje que incluye canales cloruro e intercambiadores  $H^+/Cl^-$  [5;6]. Estas proteínas se han identificado en procarionota y eucariota y en mamíferos se han descrito nueve miembros (CLC1-CLC7, CLCK1, CLCK2; tabla 3). Su función principal corresponde a estabilizar el  $V_m$  en células excitables y acidificar vesículas intracelulares [79]. Mutaciones en las proteínas CLC resultan en diferentes patologías en humanos como síndrome de Dent, síndrome de Barret, osteopetrosis y miotonías [6;80].

**Tabla 3.** Características electrofisiológicas de los principales canales tipo CLC [79][81][6].

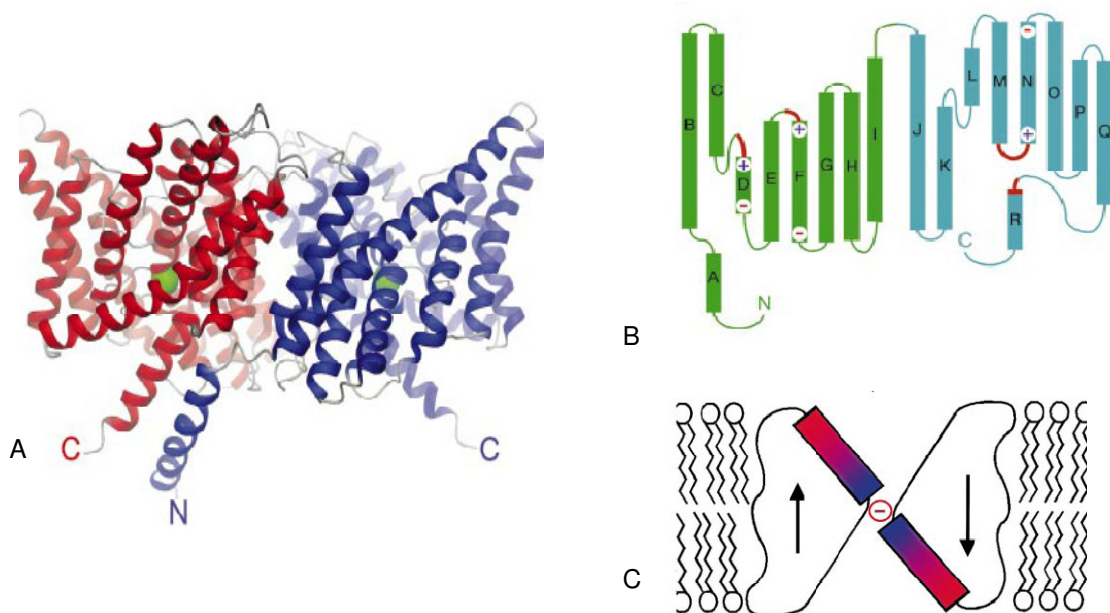
Tipo CLC	Ubicación	Función	Propiedades biofísicas		
			Activación	Selectividad aniónica	Inhibidores
CLC 1	Músculo esquelético	Estabilización del $V_m$	Activación a $V_m$ despolarizantes sensible a cambio de pH	$Cl^- > Br^- > I^-$	9 (AC)* PKC
CLC 2	Células de purkinje y piramidales	Transporte transepitelial, regulación de pH y volumen celular	Activación a $V_m$ hiperpolarizantes, variaciones de osmolaridad y cambios de pH (ácido)	$Cl^- > Br^- > I^-$	NPPB** 9 (AC) DIDS***
CLCK Barttin	Riñón y oído interno	Transporte transepitelial	Activación a $V_m$ despolarizantes	$Br^- > Cl^- > I^-$ $Br^- > I^- > Cl^-$	Desconocido
CLC 3	Endosomas y vesículas sinápticas	Acidificación de endosomas	Activación a $V_m$ despolarizantes	$I^- > Cl^- > Br^-$	DIDS PKC
CLC 4	Músculo esquelético, Corazón, hígado, riñón	Acidificación de endosomas	Inactivación por acidificación	$Cl^- > I^- > Br^-$	Desconocido
CLC5	Endosomas	Acidificación de endosomas	Inactivación por acidificación	$NO_3^- > Cl^- > I^-$	DIDS

\*9(AC): Ácido 9 antraceno carboxílico. \*\*NPPB: Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropil) aminobenzóico.

\*\*\*DIDS: ácido 4-4-diisotiocianostilbena-2-2-disulfonato.

### 1.10.2.1 Estructura de las proteínas CLC

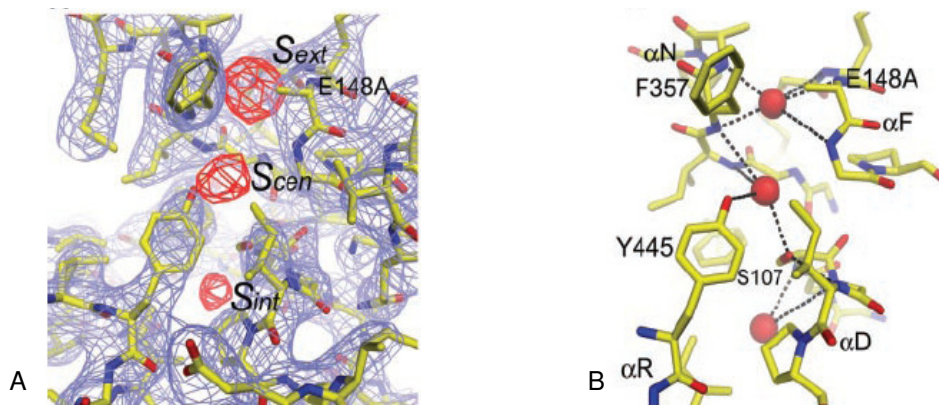
Los CLC tienen estructura dimérica, en la que cada monómero forma un poro funcional e independiente (figura 10A). Los primeros análisis estructurales en CLC-0 en el pez *Torpedo californica* hechos por Miller y colaboradores [82], determinaron dos conductancias equidistantes entre sí que corresponden a un complejo dimérico de subunidades idénticas cuya apertura y cierre son independientes. De igual forma, Bauer y colaboradores [83] observaron los mismos patrones de conductancia en el mismo canal de *T. marmorata* clonado y expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* sugiriendo un complejo funcional de doble barril. Estas observaciones se confirmaron con la primera estructura cristalográfica de CLC de *Escherichia coli* (*EcCLC* o *CLC-ec1*) y *Salmonella typhimorum* (*StCLC*) obtenidas por Dutzler en el año 2002 [84]. Se corroboró que esta proteína está constituida por dos monómeros (rojo y azul en la figura 10A), cada monómero posee 18 hélices alfa (A-R; figura 10B) configuradas en una estructura antiparalela (verde y azul en las figuras 10B y 10C) con dos dominios estructuralmente similares (hélices A-I, J-R) ubicados de manera pseudo-simétrica, formando un reloj de arena (figura 10C) [84]. Análisis posteriores confirmaron que esta proteína corresponde a un intercambiador  $H^+/Cl^-$  [85].



**Figura 10.** Estructura de un intercambiador CLC. A. Estructura dimérica (rojo y azul), cada punto verde corresponde a un ión cloruro. B. Estructura secundaria, los dos dominios estructurales están en color verde (hélices A-I) y azul (hélices J-R); la región que forma el filtro de selectividad es de color rojo. C. Estructura antiparalela [84].

### 1.10.2.2 Selectividad aniónica

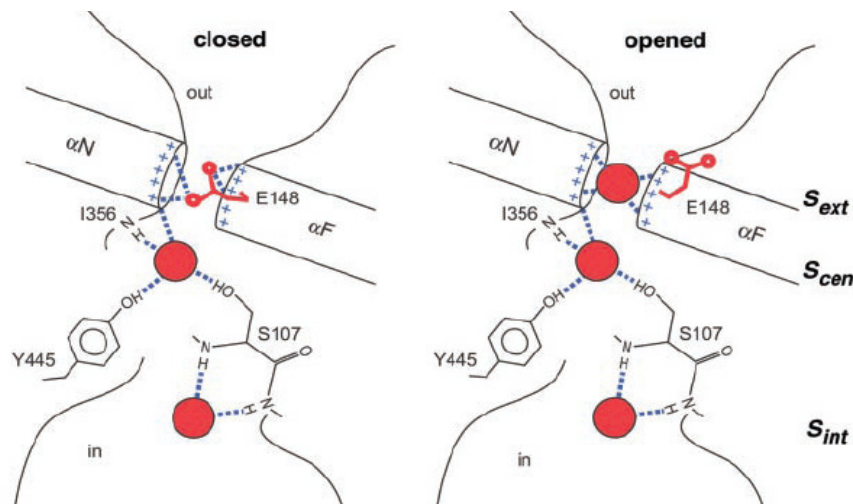
Con los estudios cristalográficos de CLC de *E. coli* (*EcCLC* o *CLC-ec1*) y *S. typhimorum* (*StCLC*) se identificó que el filtro de selectividad está constituido por 3 sitios de unión específicos con el ión  $\text{Cl}^-$ : S107, E148 y Y445 denominados  $S_{\text{ext}}$ ,  $S_{\text{cen}}$  y  $S_{\text{int}}$  respectivamente (figura 11), en donde las cargas positivas parciales de los átomos de nitrógeno de una isoleucina y de una fenilalanina y del grupo hidroxilo de una serina y tirosina, estabilizan el ión permitiendo que se transporte con una alta tasa de difusión (figura 11B) [86].



**Figura 11.** Filtro de selectividad del ión  $\text{Cl}^-$ . A. Regiones de unión al  $\text{Cl}^-$  ( $S_{\text{ext}}$ ,  $S_{\text{cen}}$  y  $S_{\text{int}}$ ). B. Los residuos que estabilizan al ión cloruro (esferas rojas) corresponden a los aminoácidos S107, E148, Y445 y F357;  $\alpha\text{D}$ ,  $\alpha\text{F}$ ,  $\alpha\text{N}$ ,  $\alpha\text{R}$ , corresponden a las hélices de la estructura secundaria [86].

### 1.10.2.3 Mecanismo de transporte

La compuerta que permite el paso del ión  $\text{Cl}^-$  por el filtro de selectividad está constituida por la cadena lateral del aminoácido glutamato (E148 en *EcCLC*), que bloquea el acceso del ión  $\text{Cl}^-$  desde el medio extracelular [84]. Cuando la conformación del canal es cerrada el ión  $\text{Cl}^-$  ocupa los sitios  $S_{\text{cen}}$  y  $S_{\text{int}}$ , mientras  $S_{\text{ext}}$  es ocupado por el grupo carboxilo de la cadena lateral de E148 [86][87]. Cuando la conformación cambia se mueve el E148 permitiendo el ingreso del ión  $\text{Cl}^-$  (figura 12).



**Figura 12.** Mecanismos de apertura y cierre del intercambiador *EcCLC*. En la conformación cerrada los sitios de unión a  $\text{Cl}^-$   $S_{\text{int}}$  y  $S_{\text{cen}}$  son ocupados por el ión y el sitio  $S_{\text{ext}}$  es ocupado por la cadena lateral de E148. En la conformación abierta la cadena lateral de E148 se ha movido y  $S_{\text{ext}}$  es ocupado por un tercer ión  $\text{Cl}^-$ . Las esperas rojas corresponden a los iones  $\text{Cl}^-$  [86].

No obstante, estudios cristalográficos recientes en la alga roja *Cyanidioschyzon merolae* han demostrado que la posición del glutamato cambia ocupando el sitio central ( $S_{\text{cen}}$ ) con un reorientación de la cadena lateral permitiendo el ingreso del ión  $\text{Cl}^-$  [88].

Sin embargo, existe la duda de cómo ésta proteína permite el intercambio de  $\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Estudios de mutagénesis en *EcCLC* han identificado el glutamato (E203) implicado en el movimiento de  $\text{H}^+$ . La mutación E203A afecta el transporte de  $\text{H}^+$  manteniendo el flujo de  $\text{Cl}^-$  a una tasa mucho más baja por lo que se sugiere un mecanismo de activación dependiente de pH en el que un protón extracelular se une a una cadena lateral de un glutamato y abre el canal, permitiendo el ingreso de  $2\text{Cl}^-$  y salida de  $1\text{H}^+$  [5]. Esta suposición es apoyada por la propuesta de Miller y colaboradores [89] en la que se plantean dos vías iónicas para el transporte de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}^+$ ; la vía del cloruro es activada por la cadena lateral de E148, con una conformación del poro cerrado-desprotonado o abierto-protonado y el aminoácido E203 media el movimiento del  $\text{H}^+$  entre la solución externa y el interior de la proteína [89]. Sin embargo, en la actualidad no se ha identificado cuál aminoácido está implicado en el transporte del protón al medio extracelular.

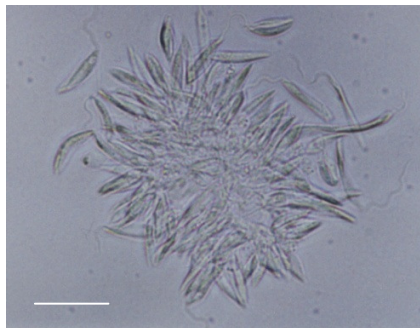
## 2. Metodología

### 2.1 Líneas celulares

#### 2.1.1 Cultivo de parásitos

Se cultivaron promastigotes de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* (cepas referenciadas por la Organización Mundial de la Salud FLA/BR/67/PH8, HOM/BR/75/M2903 y MHOM/CO/87CL412 respectivamente), donados por Nancy Gore Saravia, PhD (CIDEIM, Cali, Colombia), Lucy Gabriela Delgado, PhD (Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá) y Cristina Zapata, MSc (Universidad La Salle Bogotá, Colombia).

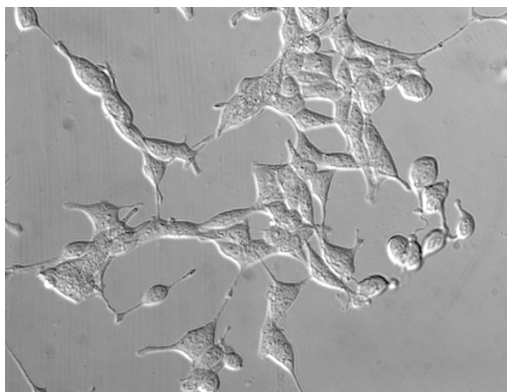
Los parásitos se sembraron en frascos de 25 cm<sup>3</sup> con 10 mL de medio *Schneider's* S9895 (Sigma-Aldrich) suplementado al 5% con suero fetal bovino SBF (*Danovo - Biowest*), se mantuvieron a 27°C hasta alcanzar una densidad de  $1 \cdot 10^7$  células/ mL con más del 80% de la población en forma de roseta (fase metacíclica; figura 13), a esta concentración se realizaron los ensayos de extracción de ARN, proteína e inmunofluorescencia.



**Figura 13.** Estructura en roseta de un cultivo de promastigotes de *L. amazonensis*. Agrupación característica de la fase metacíclica. Imagen de microscopía luz. La barra representa 10  $\mu$ m

### 2.1.2 Cultivo de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK)

Se cultivaron células HEK 293 (ATCC CRL-1573) donadas por la Doctora Yolima Torres (Pontificia Universidad Javeriana). El cultivo celular se realizó en medio DMEM (*Gibco®*) suplementado con 5% de SBF, en atmósfera húmeda a 35°C y 5% de CO<sub>2</sub>; las células se mantuvieron en monocapa a 80% de confluencia en frascos de 25 cm<sup>3</sup> con 10 mL de medio (figura 14).



**Figura 14.** Morfología característica de las células HEK 293. Imagen de microscopía de luz. La barra representa 10  $\mu$ m

## 2.2 Extracción de ARN de promastigotes de *Leishmania*

La extracción de ARN de promastigote de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* se realizó con una modificación del método de *Chomczynski y Sacchi* [90;91] usando el reactivo TRIzol<sup>®</sup> (*Invitrogen*). Este reactivo contiene una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que solubiliza y desnaturaliza proteínas preservando la integridad del ARN [92].

### 2.2.1 Fase de homogenización de la muestra

Se partió de un pellet de parásitos a una concentración de  $1 \times 10^7$  promastigotes/mL, este se lavó tres veces con PBS 1X (*Phosphate Buffered saline*) para retirar medio de cultivo, luego se adicionó 1 mL del reactivo TRIzol<sup>®</sup> y se homogenizó por pipeteo, la mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para completar la disociación de nucleoproteínas.

### 2.2.2 Fase de separación

La mezcla se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se colocó el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y el pellet se descartó por tener material insoluble con alto contenido de polisacáridos; al sobrenadante se le adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se incubó a 15°C por 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se formaron tres fases, en la parte inferior (orgánica) se encuentra la mezcla fenol-cloroformo con alto contenido de lípidos, en la fase intermedia se encuentra el ADN- proteínas y en la fase acuosa superior se encuentra el ARN total.

### 2.2.3 Fase de precipitación

La fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf y se adicionaron 400 µL de isopropanol para permitir la precipitación de ARN. El tubo se mezcló mediante agitación manual y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con 1 mL de etanol a 75%; para permitir la solubilización de sales mientras el ARN permanece precipitado. Se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C y se retiró el etanol. Una vez seco el pellet se resuspendió en 10 µL de agua estéril tratada con dietilpirocarbonato 0,1 % (Sigma-Aldrich) libre de ARNasas [92;93]. Se verificó la integridad del ARN en gel de agarosa a 1,0% en TAE, revelado con bromuro de etidio (0,5 µg/mL; figura 18; El ARN total se cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific); se midió la absorbancia a 280 nm para determinar contaminación con proteína y se calculó la relación 260/280 para estimar la pureza de ARN obtenido (el cociente de las absorbancias < 1,65 es indicativo de contaminación con proteína) [94]. Todas las muestras fueron almacenadas -20°C.

## 2.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADN complementario se realizó a partir de las muestras de ARN total de promastigote de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* utilizando la enzima retrotranscriptasa y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPS) suministrados en el *kit SuperScript™ II (Invitrogen)*. El proceso de obtención de la primera hebra de ADNc ocurre por la enzima retrotranscriptasa (ADN polimerasa) capaz de sintetizar ADNc

usando como molde ARN. Para el proceso de síntesis se requiere el uso de cebadores inespecíficos denominados oligonucleótidos polidT (polideoxitimidina) con un OH libre en el extremo 3', estos cebadores hibridan con las secuencias poliadenina (poliA) de los ARN mensajeros y brindan soporte para la síntesis de ADNc [95]. Para la síntesis de ADNc se prepararon las siguientes muestras:

**Tabla 4.** Reactivos y cantidades empleadas para la síntesis de ADNc

Componente	Muestra	Control RT	Control ARN
µg de ARN total*	5	5	-
Control ARN (50 ng/µL)	-	-	1 µL
10 mM mezcla dNTP	1 µL	1 µL	1 µL
Oligo(dT) (0,5 ug/ uL)	1 µL	1 µL	1 µL
Agua D.E.P.C	3 µL	3 µL	7 µL

\*Los µg de ARN total corresponden a las muestras de ARN de los promastigotes (*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. panamensis*).

Se incubó cada muestra a 65°C por 5 minutos y se colocó sobre hielo por 1 minuto.

En un tubo aparte se preparó la siguiente mezcla de reacción:

**Tabla 5.** Reactivos y cantidades empleadas para la mezcla de reacción en la síntesis de ADNc

Componente	Cada reacción
10X <i>Buffer</i> RT	2 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
ARNasa OUT	1 µL

Se adicionaron 9 µL de la mezcla anterior a cada muestra, se mezcló suavemente y se centrifugó a 4000 rpm por 1 minuto, se incubó a 42°C por 2 minutos y se adicionó 1 µL de la enzima *SuperScrip II Retrotranscriptasa* a cada tubo, exceptuando el tubo control RT, se mezcló e incubó a 42°C por 50 minutos y se terminó la reacción a 70°C por 15 minutos con la primera hebra de ADNc sintetizada. La mezcla se colocó sobre hielo y se adicionó



1 µL de ARNasa H a cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37°C. La ARNasa H digiere el ARN molde dejando la muestra con ADNc necesario para la amplificación por RT-PCR. La muestra restante se almacenó a -20°C.

## 2.4 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos con los programas PRIMER 3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) y PRIMER BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la secuencia putativa (GeneDB (LbrM01\_V2.0210) o GeneBank (Genel.D 5412354)) de *L. braziliensis*. El primer par de oligonucleótidos se diseñó teniendo en cuenta que el oligonucleótido directo tuviera la secuencia Kozak GAG, para que el fragmento amplificado se pudiera ligar al vector de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (*Invitrogen*). Para el diseño del oligonucleótido reverso se tuvo en cuenta que la secuencia no terminara en un triplete que codificara un codón de parada TGA lo que asegura que se transcriba la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (*GFP*) ubicada en la región C-terminal. El segundo par de oligonucleótidos se diseñó usando las regiones más conservadas de la secuencia codificante, generando un producto de 950 pb que fue utilizado como control en las amplificaciones de PCR y junto al primer par permitió la secuenciación de la totalidad del inserto.

**Tabla 6.** Características de los oligonucleótidos diseñados.

Código	Secuencia (5'->3')	longitud	inicio	stop	Tm	GC%
Lb (Fw)	GCGGCATCCCTGATGT	18	1	18	52,28	61,11%
Lb (Rv)	CTCCGATGAGGGCAAATA	15	2307	2293	53,47	68,33%

Longitud del producto: 2307 pb

Código	Secuencia (5'->3')	longitud	inicio	stop	Tm	GC%
1.1 (Fw)	TGGCATTGCGGAGGT	15	537	551	57,98	60
1.3 (Rv)	CGCCTACAATCGCGTACA	18	1486	1469	59,41	55,56

Longitud del producto: 950 pb

Para cada par de oligonucleótidos se confirmó la ausencia de estructuras secundarias como horquillas y dímeros con el programa *Oligo Analyzer* Versión 3.1. ([www.idtdna.com/Analyzer](http://www.idtdna.com/Analyzer)).

### 2.4.1 Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Se utilizó como molde el ADNc sintetizado a partir de ARN de promastigote de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Se estandarizaron las siguientes condiciones:

**Tabla 7.** Reactivos y cantidades empleadas para PCR del fragmento *LbrM01\_V2.0210*

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
PCR Buffer 10 X sin Mg	5
50 mM de $\text{MgCl}_2$	1,5
10 mM de dNTP's mix	1
10 $\mu\text{M}$ de <i>Primer</i> Directo	1
10 $\mu\text{M}$ de <i>Primer</i> reverso	1
<i>Taq DNA polimerase*</i> (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,4
ADNc	2
Agua destilada autoclavada	38,1
Volumen final	50

\*Se utilizaron dos *Taq DNA polimerase*: recombinante para el fragmento de 950 pb y *platinum* para el fragmento de 2307pb.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador (*Techne Progene Thermal Cycler PCR Machine*) programado con las siguientes condiciones previamente estandarizadas:

Número de ciclos: 30

Iniciación: 94°C \* 5 min

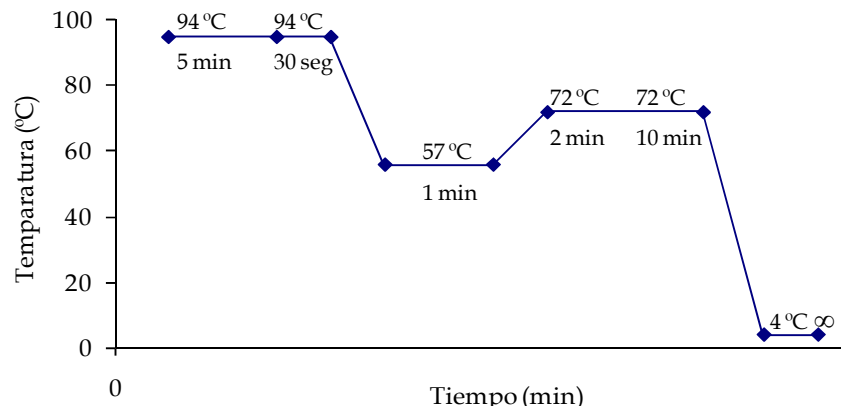
Desnaturalización: 94°C \* 30 s

Anillaje: 57°C \* 1 min

Extensión: 72°C \* 2 min

Elongación final: 72°C \* 10 min

Conservación: 4°C \*  $\infty$



**Figura 15.** Perfil de amplificación para la reacción de RT- PCR.

El producto de PCR fue corrido en un gel de agarosa a 1,0% a un voltaje de 70V por 1 hora. Las muestras se visualizaron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en un transiluminador con luz ultravioleta.

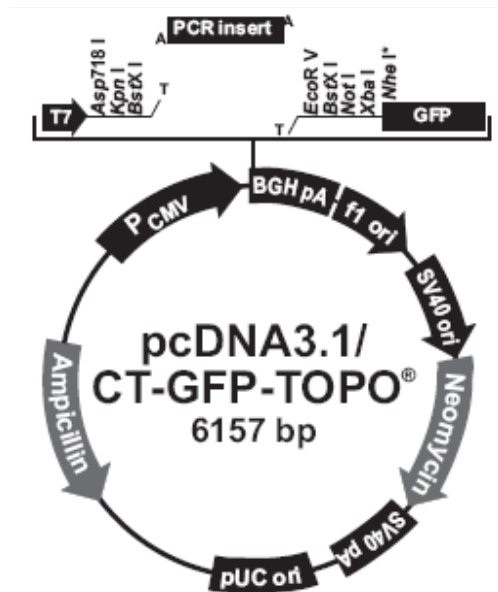
## 2.5 Purificación del fragmento *LbrM01\_V2.0210*

Teniendo las bandas del peso esperado (2307 pb) se realizó una electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1,5% en *Buffer TAE* (Tris – acetato - EDTA); se sembró la totalidad del producto de PCR (80-100 µL) y se corrió a un voltaje de 70 V por 1 hora. Las muestras se visualizaron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en un transiluminador con luz ultravioleta el menor tiempo posible para evitar daños en el producto amplificado. Las bandas de interés fueron extraídas y purificadas con el *kit Concert Gel Extraction Systems* (Gibco BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la amplificación se cuantificó usando el *kit* de fluorescencia *Quant-iT ADN Assay (Invitrogen)*. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

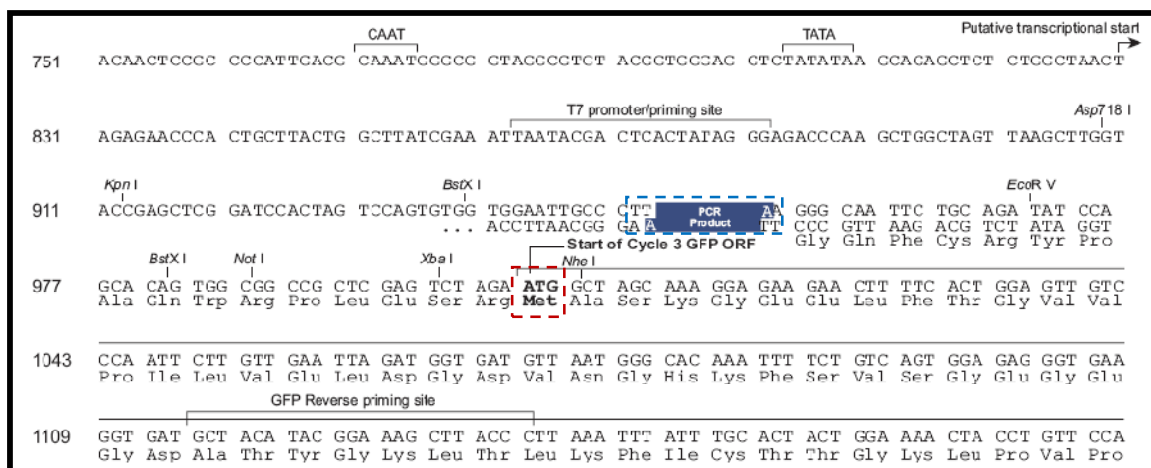
## 2.6 Clonación de los productos de PCR

### 2.6.1 Ligación del producto de PCR al vector de expresión.

Teniendo las bandas purificadas y cuantificadas se preparó la mezcla de ligación (tabla 8) con el vector de expresión pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO (*Invitrogen*) que permite la fusión directa del producto de PCR a la proteína fluorescente verde (*GFP*).



**Figura 16.** Mapa del vector de expresión pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO (*Invitrogen*). El tamaño del plásmido es 6157 pares de bases (pb). En el mapa se indica el origen de replicación (*F1 ori*), el gen que confiere resistencia a ampicilina y a neomicina; el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa del fago T7 y SV40; el promotor de la ARN polimerasa de T7, CMV y SV40 y una región de clonación múltiple (sitios de reconocimiento para las diferentes enzimas de restricción).



**Figura 17.** Secuencia del vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO. Las líneas punteadas azules indican el sitio de inserción del producto de PCR, las líneas punteadas rojas indican el inicio de la proteína fluorescente verde ubicada a nivel C-terminal.

### 2.6.2 Transformación química de bacterias competentes

Se utilizaron bacterias TOP 10 competentes por el método químico suministradas en el *kit GFP Fusion TOPO® TA Expression*. Para la transformación de las bacterias con el plásmido recombinante se tuvo en cuenta la siguiente mezcla de reacción:

**Tabla 8.** Reactivos y cantidades empleadas para la ligación de los fragmentos purificados

Reactivos	Cantidad (µL)
Producto de PCR fresco (50-100ng)*	2
Solución salina (1,2 M NaCl - 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )	1
Agua estéril	2
TOPO® Vector (10 ng/µL)	1
Volumen Total	6

\*El producto de PCR corresponde a los fragmentos amplificados de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. panamensis*.

La mezcla de reacción (6 µL) se incubó por 35 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 2 µL de la mezcla a un vial de células químicamente competentes *One Shot® TOP 10 (Invitrogen)*; se mezcló e incubó a 4°C por 30 minutos; se llevó la reacción a choque térmico por 30 segundos a 42°C e inmediatamente se transfirió sobre hielo; estos

cambios de temperatura aseguran la incorporación del plásmido recombinante al interior de la bacteria. Para recuperar la viabilidad bacteriana se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de medio SOC y se incubó a 37°C por 1 hora, se sembraron por duplicado 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción para cada producto de PCR en cajas con medio LB (*Luria- Bertoni*) suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. Se dejaron crecer colonias durante 24 horas a 37°C. Se hizo el recuento de colonias del control positivo para determinar la eficiencia de la transformación.

### 2.6.3 Análisis de clones positivos (PCR de colonia)

Se seleccionaron al azar 10 colonias por caja sembrada y se preparó la mezcla de reacción para una PCR convencional con un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ ; estas colonias se resuspendieron en la mezcla de reacción para PCR, se incubó la reacción por 10 minutos a 94 °C para lisar las células e inactivar nucleasas y se continuó con las condiciones previamente descritas para la amplificación de los fragmentos de PCR usando los oligonucleótidos universales (oligonucleótido directo T7

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' y oligonucleótido reverso GFP

5'-GGGTAAGCTTTCCGTATGTAGC-3').

Se preparó un gel de agarosa a 1,0% para identificar los clones positivos de acuerdo al tamaño esperado (figura 31). Las colonias que tienen el inserto se inocularon en 10 mL de medio LB líquido con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina (medio de cultivo), se dejaron crecer toda la noche a 37°C (densidad óptica 600nm: 0,5-0,7). A 5 mL del cultivo se le extrajo ADN plasmídico con el *kit* de extracción *Axygen Plasmid Miniprep®* (Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante y los 5 mL restantes se mezclaron con 882  $\mu\text{L}$  de glicerol estéril (medio de congelamiento). Las muestras se almacenaron a -70°C.

La verificación de la secuencia clonada se hizo con ADN plasmídico (tres por cada especie) a través del servicio de MacroGen U.S.A (secuenciación de extensión simple) siguiendo las condiciones establecidas en la página [www.macrogenusa.com](http://www.macrogenusa.com). Cada ADN plasmídico fue secuenciado en sus dos hebras utilizando los oligonucleótidos universales T7 y GFP junto a los oligonucleótidos internos (*fw\_0210*): 5'- TGGCATTGCGGAGGT -3' y (*Rv\_0210*): 5'- CGCCTACAATCGCGTACA -3'. De cada una de las secuencias

reportadas por Macrogen USA se obtuvo una secuencia consenso necesaria para los análisis bioinformáticos.

## **2.7 Transfección en células HEK (*Human Embryonic Kidney*)**

De acuerdo a los resultados reportados por Macrogen en los que se confirmaron las secuencias de los plásmidos recombinantes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*, se emplearon para transfectar células HEK 293 de manera transitoria usando *Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen)*; este reactivo forma liposomas cargados positivamente que evitan la repulsión electrostática de la membrana celular permitiendo el ingreso de ADN plasmídico al interior de la célula [96].

El día anterior a la transfección se platearon en cajas de 24 pozos 0,5-1,25 x 10<sup>5</sup> células en 500 µL de medio DMEM más 5% de SFB sin antibiótico. Se esperó hasta que las células estuvieran entre 90 - 95% de confluencia (evaluación por microscopio de luz) y se cambió el medio por 500 µL de medio DMEM sin SFB y sin antibiótico. En tubo eppendorf se preparó la mezcla A: Se diluyeron 0,8 µg de cada plásmido recombinante (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*), en 50 µL de medio DMEM sin SFB y sin antibiótico y se mezcló suavemente. Se preparó la mezcla B con 2 µL de lipofectamina™ 2000 en 50 µL de medio DMEM sin SFB y sin antibiótico. La mezcla B se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se combinó la mezcla A y B, se agitó suavemente y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (volumen final 100 µL). Se adicionaron los 100 µL del complejo formado a la caja de 24 pozos. La caja con células y complejo se mezcló suavemente por agitación en forma circular. Las células se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> por 4 horas. Se cambió el medio por 500 µL de medio DMEM al 5% de SFB sin antibiótico. Las células se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> por 24 horas. Se evaluó la expresión de plásmido recombinante con microscopía de fluorescencia (Zeiss) y microscopía confocal (Nikon). Se seleccionaron células de 24 a 48 horas postransfección para registros electrofisiológicos.

## 2.8 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se tuvo en cuenta la secuencia nucleotídica consenso obtenidas de los ADNs recombinantes de cada especie evaluada *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Para la edición y ensamblaje de las secuencia consenso se usó el *software* Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y Bioedit [97].

Teniendo la secuencia nucleotídica consenso y su traducción a una secuencia de aminoácidos; se hizo búsqueda de secuencias con similaridad significativa usando el programa *BLAST* (herramienta de búsqueda y alineamiento local básico, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [98]. Para la selección se emplearon las secuencias no redundantes (*Non redundant protein sequence nr*); teniendo como organismo base *Homo sapiens* (taxid:9606) y las secuencias cristalográficas reportadas; con una similitud significativa (E value  $\leq 0,0001$ ) [99]. Todos los códigos de identificación de las proteínas se encuentran en la tabla 12.

### 2.8.1 Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

El alineamiento se construyó utilizando el servidor ClustalW [100], teniendo en cuenta las secuencias de proteínas relacionadas (Tabla 12) con la secuencia proteica consenso. El árbol filogenético se construyó utilizando el programa MEGA 4 [101] con el método *neighbor joining* y se evaluó con un *bootstrap* de 100000 repeticiones

### 2.8.2 Predicción de la estructura secundaria y perfil de hidrofobicidad

La predicción de las regiones transmembrana, topología y perfil de hidrofobicidad de la secuencia proteica consenso, se obtuvo con el servidor *Expasy*, usando el programa *PredictProtein* [102;103], Profsec [104] y Toppred [105] empleando la escala Kyte y Doolittle basada en el carácter hidrofóbico de los aminoácidos [106]. Se compararon los resultados con los obtenidos con el programa HMMTOP [107;108] basado en modelos ocultos de Markov. De igual forma, se utilizó el programa *Psort II predictor* para predecir la localización celular de la proteína estudiada [109].



### 2.8.3 Modelamiento de la proteína

La estructura terciaria de la secuencia proteica consenso se modeló usando el servidor PHYRE 2 (*protein structure prediction-art*) [110] usando como homólogo estructural la proteína cristalina *Cyanidioschyzon merolae* (alga roja; código PDB: 3ORG), la minimización energética del modelo se hizo con el programa Swiss-PdbViewer [111]. La visualización y superposición de las estructuras terciarias se hicieron con el *software UCSF Chimera*.

### 2.8.4 Validación

La validación se realizó de dos maneras:

1. utilizando el gráfico de Ramachandran [112], generado por el servidor RAMPAGE. (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).
2. Usando el método de alineamiento estructural DALI [113;114] y SSAP [115].

## 2.9 Identificación y análisis de proteínas

### 2.9.1 Obtención de proteínas totales

Para obtener el extracto de las proteínas totales se partió de un cultivo de promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* en fase metacíclica con una concentración de  $1 \times 10^7$  parásitos/mL y de un cultivo de células HEK 293 sin transfectar y transfectadas se partió de un cultivo con una confluencia de  $2 \times 10^5$  células/mL.

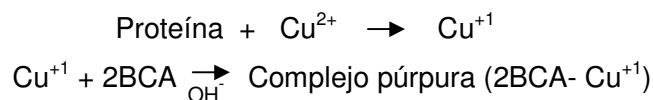
Los parásitos se centrifugaron a 1800 r.p.m y las células a 400 r.p.m a 4°C durante 10 minutos, los pellets obtenidos se lavaron con 1 mL de PBS 1X y se centrifugaron nuevamente; se retiró el sobrenadante y al pellet se le agregó 100 µl de *Buffer* de lisis.

Se evaluaron 3 tipos de *Buffers*: *Buffer* RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay Buffer*), indicado para solubilizar proteínas que se encuentran unidas a membrana. *Buffer* NP40 (Nonidet-P40) solubiliza proteínas citoplasmáticas y unidas a membrana. *Buffer* Tris-Tritón solubiliza proteínas citoplasmáticas. Cada uno de estos *Buffers* fue suplementado con un *cocktail* de inhibidores (Aprotinina 2µg/mL, Leupeptina 5µg/mL, Pepstatina 1µg/mL, PMSF 1 mM y EDTA 1 mM). Los pellets se homogenizaron con una jeringa de

insulina, la mezcla obtenida se incubó por 1h 30 minutos a -20°C, luego se centrifugó a 14.000 r.p.m por 10 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se cuantificó proteína total. Las muestras se guardaron a -20°C.

## 2.9.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación se realizó con el método del ácido bicinconínico (BCA; Sigma) que se fundamenta en la reducción de sulfato de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ ) en medio básico por el enlace peptídico y los aminoácidos cisteína, cistina, triptófano y tirosina [116]; el  $\text{Cu}^{+1}$  reacciona con 2 moléculas de BCA formando un complejo de color púrpura cuya absorbancia máxima es a 562 nm por lo tanto la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  reducida es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra [117].



Para determinar la cantidad de proteína presente en la muestra se realizó una curva de calibración con un patrón estándar (*Bovine Serum Albumin*) a un rango de concentración lineal de 200-1000  $\mu\text{g/mL}$ . Con la ecuación lineal de la curva de calibración se determinó la concentración de la proteína presente en la muestra.

## 2.9.3 Dot blot

Esta técnica es un procedimiento simplificado de *western blot* en el que no se realiza separación electroforética de proteínas, es un método de tamizaje rápido cuya finalidad es evaluar parámetros que pueden afectar el inmunoblot (condiciones de bloqueo, dilución del anticuerpo primario, buffer de lavado) [118]. El ensayo se hizo con los siguientes grupos experimentales:

Grupo experimental 1: Dilución de anticuerpo primario 1:50

Grupo experimental 2: Dilución de anticuerpo primario 1:250

Grupo experimental 3: Dilución de anticuerpo primario 1:500

Control 1: Solución de bloqueo sin anticuerpo primario

Control 2: Solución de bloqueo sin anticuerpo secundario

Control 3: Solución de bloqueo sin anticuerpo primario y sin secundario

Sobre una membrana de nitrocelulosa se demarcaron 6 pozos en los que se sembraron 6 µg de muestra en cada uno (aproximadamente 2 µl). La membrana se incubó con una solución de bloqueo a 37°C. Cada pozo se incubó con la dilución del anticuerpo o solución de bloqueo de acuerdo a los grupos experimentales; se incubó por 1 hora a 37°C; se hicieron 5 lavados con solución de lavado (PBS1X 0,2% tween 20) por 5 minutos cada uno. Se preparó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, INC) en solución de bloqueo a una concentración de 1:2000. Se incubó a 37°C durante una hora, luego se hicieron 5 lavados con solución de lavado por 5 minutos cada uno. La membrana de nitrocelulosa se reveló con el *kit* de revelado para peroxidasa *Vector Vip substrate* (VECTOR Laboratories).

#### **2.9.4 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE**

Se realizó la separación de proteínas utilizando un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE); este es un método en el que las proteínas cargadas negativamente se separan de acuerdo a su masa molecular a través de un campo eléctrico [119]. La separación se realizó en geles discontinuos con un gel concentrador a 3,9% de acrilamida/bisacrilamida y un gel separador a 7,5% acrilamida/bisacrilamida. Los porcentajes utilizados corresponden a los indicados para la separación de proteínas de un tamaño molecular entre 30-150 kDa [119].

Se utilizó un peine separador de 1,0 mm y se sembraron 30 µg de cada muestra. Se utilizó el sistema de electroforesis Mini-Protean (Bio Rad) a un voltaje de 80 V (gel concentrador) y 100 V (gel separador).

#### **2.9.5 Transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa**

Las proteínas separadas en el gel de acrilamida/bisacrilamida se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa (Bio Rad) por acción de un campo eléctrico [120]. Una vez finalizada la electroforesis el gel se empapó en un *Buffer* de transferencia. Se cortó la membrana de nitrocelulosa y varios papeles Whatman del mismo tamaño del gel que también fueron empapados en *Buffer* de transferencia. El sándwich de transferencia se

hizo colocando el gel junto a la membrana de nitrocelulosa entre papeles Whatman, este montaje se humedeció con *buffer* de transferencia y se colocó sobre la cámara de transferencia *Owl separation system* (Bio Rad; transferencia semiseca) por 1 hora a 10 V y aproximadamente 40 mA (se utiliza un rango de 0,8 a 2 mA por centímetro cuadrado del gel). Para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se le realizó una tinción con una solución de rojo Ponceau, se destiñó con lavados sucesivos de agua destilada.

### **2.9.6 Western blot (Inmunoblot)**

Para la detección de la proteínas que se encuentran inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa, se utilizó una reacción inmuno-específica entre el anticuerpo primario y la proteína de interés [119]. La membrana de nitrocelulosa se incubó con una solución de bloqueo de sitios inespecíficos (PBS1X 0,2% tween 20-leche descremada 5%) a 37°C por 1 hora. Se preparó el anticuerpo primario (CLC 3/4/5: sc-28762) en solución de bloqueo a una concentración de 1:250, se incubó a 4°C toda la noche, luego se hicieron 3 lavados con solución de lavado por 15 minutos cada uno. Se preparó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004) en solución de bloqueo a una concentración de 1:2000. Se incubó a 37°C durante una hora, luego se hicieron 3 lavados con solución de lavado por 15 minutos cada uno. La membrana de nitrocelulosa se reveló con el *kit* de revelado para peroxidasa *Vector Vip substrate*.

Los ensayos se hicieron en los siguientes grupos experimentales:

Control positivo: membrana de cerebro de ratón

Grupos experimental 1: Extractos proteicos de las diferentes especies de *Leishmania*

Grupos experimental 2: Extractos proteicos de células HEK transfectadas y sin transfección.

### **2.9.7 Inmunolocalización de proteínas sobre parásitos y células HEK 293**

La localización del canal CLC en parásitos y células HEK 293 (control y transfectadas) se hizo con inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo secundario marcado con AlexaFluor 488. El ensayo se realizó a partir de parásitos en fase estacionaria  $1 \times 10^7$

parásitos/mL y células HEK con una confluencia de  $2 \times 10^5$  células/mL en láminas de 12 pozos.

### **2.9.7.1 Preparación de las láminas**

Se utilizaron láminas provistas con 12 pozos de 5 mm de diámetro cada uno. Se colocaron las láminas en alcohol ácido (1% de HCl en 70% de etanol) durante 30 minutos. Se hicieron 3 lavados cada uno de 5 minutos con agua destilada y posteriormente 3 lavados con agua desionizada. Se sumergieron las láminas en una solución de poli L Lisina (0,1% w/v) por 5 minutos. Se escurrieron y se secaron a 60°C por 1 hora.

### **2.9.7.2 Preparación de las muestras**

Se depositaron 50 µl de la suspensión celular en cada pozo de las láminas, los promastigotes se incubaron 30 minutos a 26°C y las células HEK se incubaron a 37°C por 15 minutos. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos cada uno.

El ensayo se hizo en los siguientes grupos experimentales:

Grupo control negativo (-):

Células marcadas con anticuerpo primario sin anticuerpo secundario

Células marcadas sin anticuerpo primario con anticuerpo secundario

Células marcadas sin anticuerpo primario sin anticuerpo secundario

Células tratadas sin permeabilizante (Triton 0,1% en PBS 1X)

Grupo experimental:

Titulación: Células marcadas con anticuerpo primario y secundario a concentraciones de 1:50, 1:100, 1:250; 1:500 y 1:1000

Células marcadas con anticuerpo primario en la máxima dilución con señal de fluorescencia.

### **2.9.8 Inmunofluorescencia**

Se colocaron 50 µL de paraformaldehído a 3% en cada pozo por 30 minutos a 37°C para fijar las células manteniendo la integridad celular. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X cada uno de 15 minutos. Las láminas se colocaron en una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM en PBS

1X por 10 minutos (preparación fresca) para disminuir la autofluorescencia debido al proceso de fijación. Se retiró la solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se colocó una solución de glicina 100 mM en PBS 1X durante 10 minutos, para eliminar residuos de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Se lavó 3 veces con PBS 1X por 15 minutos. Se permeabilizó con Tritón 0,1% en PBS 1X (Tritón *stock*: 1% en metanol al 90%) por 10 minutos. Se lavó 3 veces con PBS 1X por 15 minutos. Se colocó en solución de bloqueo (suero fetal bovino al 10% con PBS 1X) por 1 hora a 37°C. Sin lavar se incubó con el anticuerpo primario (CLC 3/4/5: sc-28762, Santa Cruz Biotechnology, INC) en dilución 1:100 (el anticuerpo primario se preparó en solución de bloqueo). Se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavó con PBS 1X 5 veces cada una de 5 minutos. Se incubó con anticuerpo secundario durante 1 hora a 37°C. Los cubre objetos se montaron sobre láminas con *Gel Mount* (Sigma) y se examinaron en microscopios de fluorescencia (Zeiss) y confocal (Nikon).

## 2.10 Caracterización funcional de un canal de cloruro

### 2.10.1 Registro de corrientes cloruro en células HEK

Con las células HEK transfectadas de manera transitoria, se midieron propiedades electrofisiológicas usando la técnica de *Patch Clamp* en configuración de célula entera (*whole-cell*) [121]. Los registros se hicieron con dos grupos experimentales:

1. Grupo control (-): células sin transfectar.
2. Grupo experimental: células transfectadas con el plásmido recombinante.

Las células se situaron dentro de una cámara de registro a temperatura ambiente y fueron observadas a través de un microscopio invertido Zeiss IM35. La composición del medio extracelular fue (mM): 100 cloruro de N-metil D-glucamina (NMDGCl), 0,5  $\text{MgCl}_2$ , 1,3  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES, ajustado a pH 7,4 con HCl 1,0 M. La osmolaridad fue corregida a 300 mOsmol/Kg con manitol. La solución intracelular de la pipeta fue de (mM): 100 NMDGCl, 1,2  $\text{MgCl}_2$ , 1 EGTA, 10 HEPES, 2 ATP ajustada a pH 7,4 con HCl 1,0 M. La osmolaridad fue ajustada a 280 mOsmol/Kg con manitol. Los registros se hicieron usando un amplificador Axopatch -1C (Molecular Devices), interfase AD DigiData 1200 y los datos almacenados usando el *software* pClam6. Las pipetas de registro se hicieron a partir de capilares de hematocrito (borosilicato), utilizando un estirador de pipetas, y presentaron resistencia entre 2,5-3,5 M $\Omega$ . Los protocolos de adquisición de datos

permitieron determinar propiedades eléctricas pasivas como capacitancia de membrana ( $C_m$ ) y potencial de membrana ( $V_m$ ) y propiedades activas como corrientes iónicas; estos protocolos van desde un potencial sostenido (*holding potencial*) de -30 mV, hasta diferentes intervalos de voltaje dependiendo del protocolo utilizado.

La medición de capacitancia de membrana ( $C_m$ ) se hizo de dos maneras 1. Realizando una lectura directa del circuito amplificador empleado para compensar los valores capacitancia. 2. Utilizando un protocolo con un pulso hiperpolarizante de -10 mV que permitió determinar la constante de tiempo de carga del capacitor ( $\tau$ ) y la resistencia de acceso de la pipeta a la célula; con estos datos se determinó  $C_m$  a partir del ajuste de una exponencial al trasiente capacitivo. El potencial de membrana se midió con el amplificador en modo *Current Clamp*, donde el flujo de corriente en el sistema es cero; su registro se hizo inmediatamente después de entrar al citoplasma de la célula para evitar la difusión de solución interna proveniente de la pipeta.

Las corrientes iónicas se determinaron con un protocolo estándar con pulsos de voltaje desde -90 a 130 mV, cada 20 mV, con una duración de 250 ms.

Las corrientes de cola (*tail currents*) se registraron con un protocolo de prepulsos desde -60 a 30 mV, cada 10 mV, con una duración de 80 ms; seguidos de un protocolo despolarizante desde -60 a 30 mV cada 10 mV, con una duración de 40 ms.

## **2.10.2 Caracterización de las corrientes de cloruro**

Se usó el inhibidor de corrientes aniónicas (ácido 4-4-diisothiocianostilbeno-2-2-ácido disulfónico (DIDS) a una concentración de 200  $\mu$ M [122], adicionándose a la solución del baño donde se encuentran las células. Se esperó 5 minutos para estabilizar el sistema y se hicieron registros con el protocolo estándar. De igual forma, se usó una solución externa a pH ácido (pH 5.0).

El análisis de los registros se hizo con el programa Clampfit 8.0 Todas las corrientes registradas fueron corregidas con substracción de corrientes de fuga. Se empleó el valor de corriente en su punto máximo ( $I_p$ ) y en estado estacionario ( $I_{ss}$ ), estos parámetros

fueron normalizados por la capacitancia de la membrana, lo que permitió corregir el incremento en el área de la superficie para cada célula.

## **2.11 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student para datos pareados o no pareados. Se consideró un nivel de  $p < 0.05$  como punto de mínima diferencia significativa en cada comparación.

Para evaluar la normalidad de los datos se usó la prueba de Shapiro Wilk y para los datos que no presentan una distribución normal se realizó la prueba no paramétrica Mann Whitney. También se realizó ANOVA de dos vías y prueba post-hoc de Tukey.



### 3. Resultados y Discusión

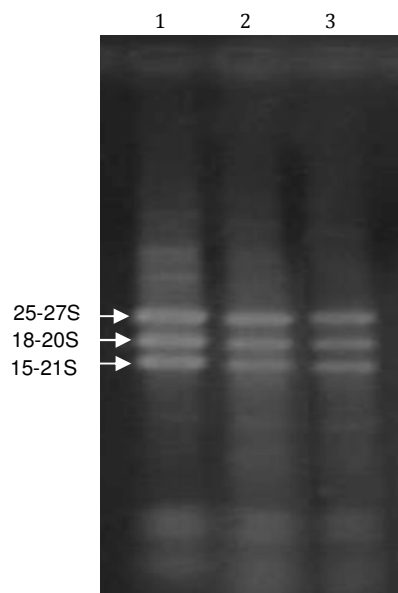
Al igual que los eucariontes superiores *Leishmania* debe expresar canales y transportadores aniónicos que contribuyen de manera significativa a la regulación de pH interno ( $\text{pH}_i$ ) y osmolaridad. Estudios en *Leishmania* y *Trypanosoma* han mostrado que estos parásitos son capaces de mantener su  $\text{pH}_i$  cercano a la neutralidad cuando han sido expuestos a amplios rangos de pH extracelular; entonces ¿cuáles son las proteínas implicadas en este mecanismo de regulación?. Zilberstein y colaboradores [123;124] identificaron una  $\text{H}^+$  ATPasa en *L. donovani* cuya función estaría implicada en la regulación de  $\text{pH}_i$  y en la creación de un gradiente electroquímico de protones para generar transporte activo de glucosa y prolina. Vieira y colaboradores [12;69;125] han implicado a un canal aniónico y un transportador  $\text{HCO}_3^-$  en la disipación del gradiente electroquímico generado por la bomba  $\text{H}^+$  ATPasa. Ponte-Sucre y colaboradores [126] evaluaron el efecto de bloqueadores de transporte iónico reportando susceptibilidad de *Leishmania* (disminución en la tasa de crecimiento e infectividad) a bloqueadores de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Estos resultados demuestran que *Leishmania* utiliza sistemas de transporte iónico fundamentales para su supervivencia; sin embargo, a pesar de las implicaciones funcionales de estas proteínas las propiedades moleculares y bioquímicas no han sido esclarecidas. Más recientemente Lagos y colaboradores [7] demostraron la presencia de una corriente de cloruro voltaje-dependiente tipo CLC que se puede estar expresando en *L. amazonensis*, resultado que orienta hacia la presencia de canales tipo CLC en la membrana de *Leishmania* involucrados en la homeóstasis del parásito.

Dado que no se sabe si las secuencias de ADN genómico de *Leishmania*, reportadas en las bases de datos como canales de cloruro putativos realmente se expresan en el parásito, nuestro primer objetivo fue investigar este punto, para lo cual se realizó un estudio de expresión génica donde se identificaron canales de cloruro expresados en el estado promastigote del parásito.

### 3.1 Análisis de la expresión de un canal de cloruro.

Como primera aproximación se evaluó la expresión génica mediante análisis de ARN mensajero, empleando la técnica RT-PCR (transcripción reversa acoplada a PCR). Para ello se partió del cultivo de promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* en fase metacíclica (infectiva) debido a que presentan alta expresión de proteínas estadio específicas entre las que se incluyen transportadores iónicos [126-129].

Teniendo los cultivos de las tres especies de *Leishmania* se procedió a extraer ARN total para la síntesis de ADNc; este ARN se caracteriza por presentar similitud con el ARN de eucariontes superiores, constituido principalmente por 85-90% de ARN ribosomal (25–27S, 18–20S y 5,8S), 15-10% de ARN de transferencia y el porcentaje restante es ARN mensajero. Sin embargo, el ARN de *Leishmania* y en general de la familia Trypanosomatidae se caracteriza por presentar un rompimiento de la subunidad de ARN ribosomal lo que genera un valor de sedimentación de 15-21S [130;131]. La figura 18 muestra el ARN extraído de las tres especies de *Leishmania* con las tres bandas que han sido descritas para la familia Trypanosomatidae y que corresponden a ARN ribosomal 25–27S, 18–20S y 15-21S; se observan bandas difusas que son indicativas de la presencia de ARNs mensajeros de diferente peso molecular.



**Figura 18.** ARN total de *Leishmania*. ARN total aislado de *L. amazonensis* (carril 1), *L. braziliensis* (carril 2), *L. panamensis* (carril 3). El ARN ribosomal está indicado con las flechas y el ARN mensajero migra como bandas difusas.

Las concentraciones obtenidas para los ARNs de las diferentes especies se reportan en la tabla 9.

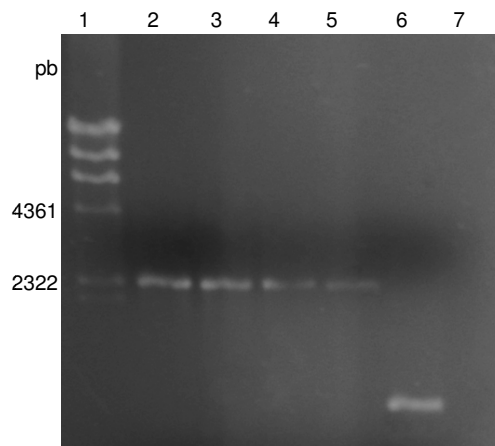
**Tabla 9.** Concentraciones (ng/μL) de ARN total para las diferentes especies estudiadas.

Especie	Concentración (ng/μL) ± E.S
<i>L. amazonensis</i>	55 ± 0,6
<i>L. braziliensis</i>	40 ± 0,5
<i>L. panamensis</i>	48 ± 0,7

Paralelo al proceso de extracción de ARN total se utilizaron las bases de datos *GenBank* y *GeneDB* para buscar secuencias de potenciales canales de cloruro de diferentes especies de *Leishmania* cuyos genomas se encontraban completamente reportados (*L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum*). Se seleccionó la secuencia *LbrM01\_V2.0210* que codifica a un canal putativo tipo CLC de *L. braziliensis* debido a que los hallazgos previos de Lagos y colaboradores [7] indican la presencia de una corriente de cloruro voltaje-dependiente en *L. amazonensis*.

Usando la secuencia codificante *LbrM01\_V2.0210* se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR. El par de oligonucleótidos que amplifica la totalidad de la secuencia (2307 pb) tienen como característica insertar una secuencia consenso Kozak (junto al codón de iniciación ATG) al producto de la amplificación para que durante los procesos de transfección el segmento sea reconocido por el ribosoma y se inicie la traducción [132;133] .

Durante la estandarización de la PCR se probaron diferentes condiciones en la amplificación (variación en temperatura de anillamiento y concentración de MgCl<sub>2</sub>), además se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa *Platinum®* (Invitrogen) de alta eficiencia y especificidad para evitar amplificaciones inespecíficas. El resultado de la estandarización se reportó en la tabla 7 y figura 19.



**Figura 19.** RT- PCR de *Leishmania*. Carril 1. Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III. Producto PCR de: Carril 2. *L. amazonensis*. Carril 3. *L. braziliensis*. Carril 4. *L. panamensis*. Carril 5. *L. major*. Carril 6. Control positivo 950pb. Carril 7. Control negativo.

En la figura 19 se observó la amplificación de un producto de 2,3 kb que podría corresponder a la transcripción del gen *LbrM01\_V2.0210* que codifica una secuencia para un canal/transportador putativo tipo CLC. La transcripción de este gen en las cuatro especies de *Leishmania* que pertenecen a diferentes subgéneros sugeriría conservación evolutiva e importancia funcional.

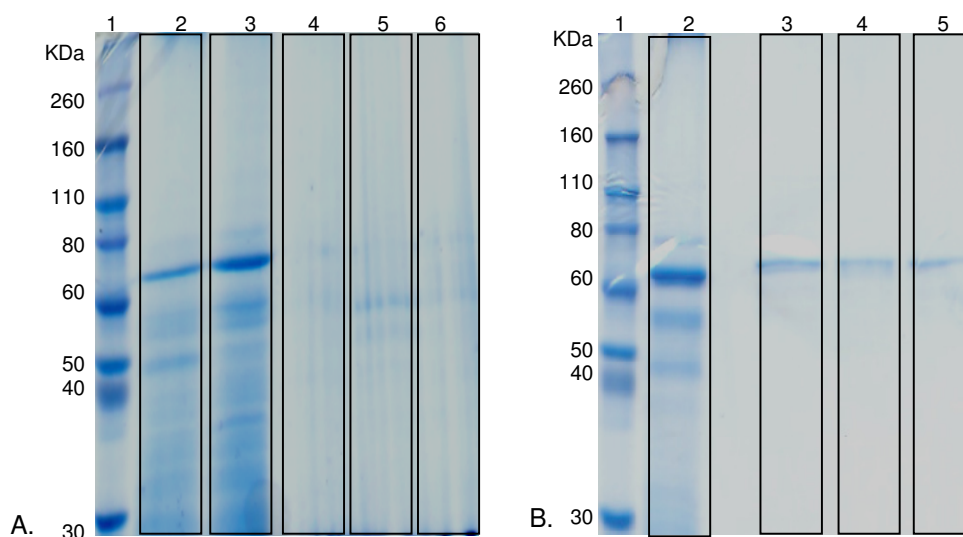
Para confirmar estos resultados, la secuencia se clonó en un vector de clonación y se envió a secuenciar (Ver ítem 3.2)

La confirmación de la expresión del canal CLC putativo se hizo con las técnicas inmunoblot e inmunofluorescencia. Para inmunoblot se partió de un extracto total de proteínas de promastigote en fase estacionaria solubilizado en cuatro tipos de *buffer* de lisis: Tris-Tritón 1%, RIPA, NP-40 y 5P8 (figura 20); estos buffers difieren en su capacidad de solubilizar diferentes proteínas (asociadas a membrana o citoplasmáticas) sin desnaturalizar los sitios de unión del anticuerpo [134]. Teniendo las proteínas solubilizadas se determinó la concentración por el método del ácido bicinconínico (Tabla 10).

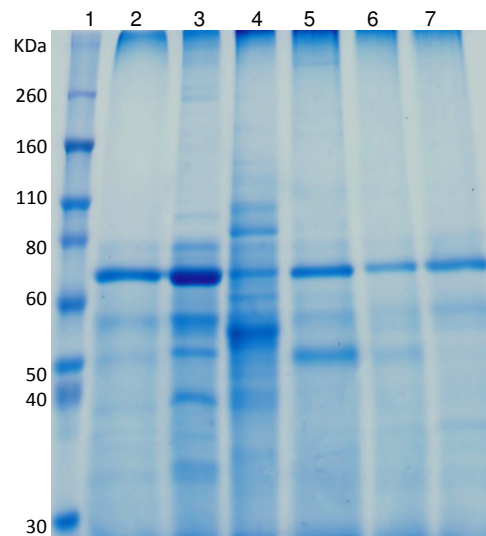
**Tabla 10.** Concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de proteína total para las especies estudiadas.

Especie	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ E.S
<i>L. amazonensis</i>	1475 $\pm$ 0,6
<i>L. braziliensis</i>	1669 $\pm$ 0,5
<i>L. panamensis</i>	1548 $\pm$ 0,7

Se corrieron 40  $\mu\text{g}$  de proteína total en geles de acrilamida/bisacrilamida (figura 20); el resultado mostró que los *buffers* de lisis RIPA y NP-40 generan separación en bandas con una mayor resolución que los *buffers* Tris-Tritón 1% y 5P8. Para determinar cuál de los dos *buffers* se utiliza para la extracción final se corrió otro gel de acrilamida/bisacrilamida (figura 21).



**Figura 20.** Geles de electroforesis SDS-PAGE al 8,0%. Evaluación de los extractos proteicos en diferentes buffer de lisis. A. Carril 1. Marcador de peso molecular, 2. *L. braziliensis* (buffer RIPA). 3. *L. panamensis* (buffer RIPA). 4. *L. amazonensis* (buffer Tris-Triton 1%). 5. *L. braziliensis* (buffer Tris-Triton 1%). 6. *L. panamensis* (buffer Tris-Triton 1%). B. Carril 1. Marcador de peso molecular, 2. *L. panamensis* (buffer NP-40). 3. *L. amazonensis* (buffer 5P8). 4. *L. braziliensis* (buffer 5P8). 5. *L. panamensis* (buffer 5P8).

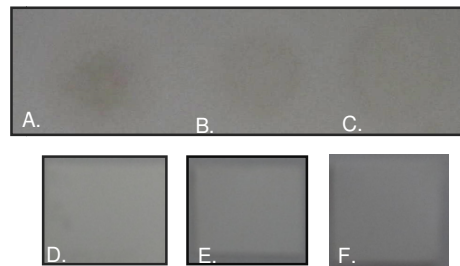


**Figura 21.** Gel de electroforesis SDS-PAGE a 8,0%. Evaluación de los extractos proteicos en buffer de lisis RIPA y NP-40. A. Carril 1. Marcador de peso molecular, 2. *L. amazonensis* (buffer RIPA). 3. *L. braziliensis* (buffer RIPA). 4. *L. panamensis* (buffer RIPA). 5. *L. amazonensis* (buffer NP-40). 6. *L. braziliensis* (buffer NP-40). 7. *L. panamensis* (buffer NP-40).

RIPA fue el *buffer* de lisis que presentó una mayor resolución; se observó mayor separación en las bandas, especialmente aquellas que corresponden al tamaño de 80kDa en el que se ubica la proteína de interés (figura 21). Se observa una banda de gran intensidad entre 60 y 80 kDa que puede corresponder a la glicoproteína GP63 (peso 63 kDa), siendo la proteína más abundante sobre la superficie del promastigote [43].

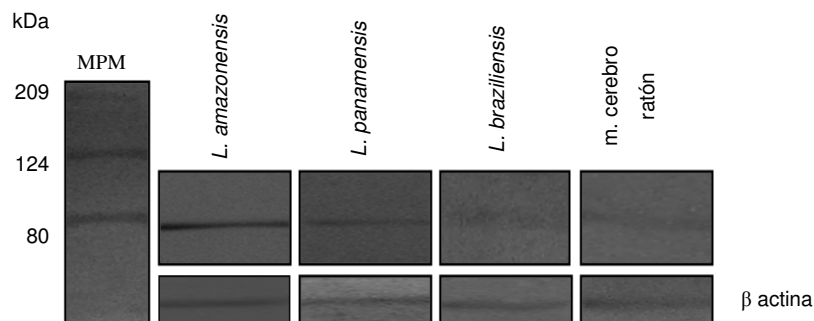
Se utilizó la técnica *dot blot* para estimar de una manera semicuantitativa la dilución del anticuerpo primario a utilizar en *western blot*. El anticuerpo primario reconoce los aminoácido 563 al 762 de la región C terminal del canal CIC-3 de origen humano cuya identidad con la secuencia de *Leishmania* es de 27,7%. Sin embargo, la especificidad de los anticuerpos permite distinguir grupos químicos con diferencias mínimas, por lo tanto, a pesar de la reducida identidad de la secuencia antigénica de *Leishmania*, se presenta reacción antígeno-anticuerpo específica.

De acuerdo a los resultados (figura 22) se seleccionó la dilución del anticuerpo primario 1:250 siendo la máxima dilución en la que se observó detección de la proteína; no se observó señal para los controles lo que garantizó que la inmunodetección fuera específica.



**Figura 22.** Dot blot. A. Dilución de anticuerpo primario 1:50. B. Dilución de anticuerpo primario 1:250. C. Dilución de anticuerpo primario 1:500. D. Control: inmunodetección sin anticuerpo primario. E. Control: inmunodetección sin anticuerpo secundario. F. Control: inmunodetección sin anticuerpos primario y secundario

Teniendo los resultados de *buffer* de lisis (RIPA) y dilución de anticuerpo primario (1:250) se procedió a realizar el *western blot* usando el anticuerpo policlonal de conejo anti CIC-3/4/5 (figura 23).

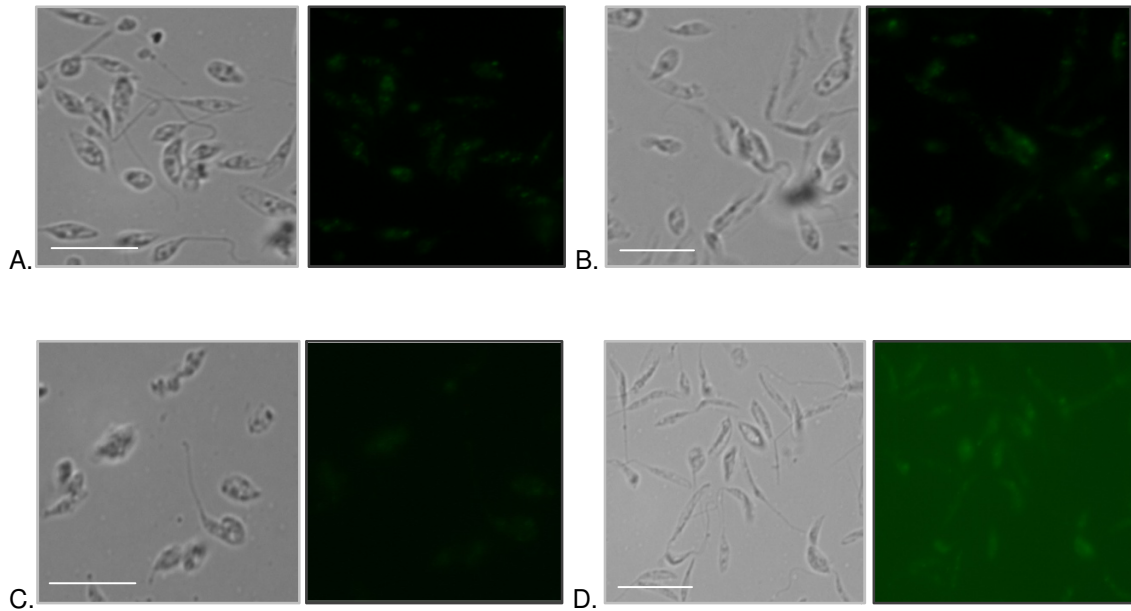


**Figura 23.** Western blot de extractos proteicos totales de *Leishmania*. Se detectó una banda de 84kDa en *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*. El control positivo corresponde a membrana de cerebro de ratón y el control de carga fue β actina.

Estos resultados confirman la expresión de una proteína de un tamaño aproximado de 84kDa en *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* que podría corresponder al canal de cloruro putativo LbrM01\_V2.0210. Al comparar la intensidad de las bandas se observa que es menor para *L. braziliensis* lo que puede indicar una baja expresión de la proteína y por lo tanto una expresión diferencial dependiente de la especie.

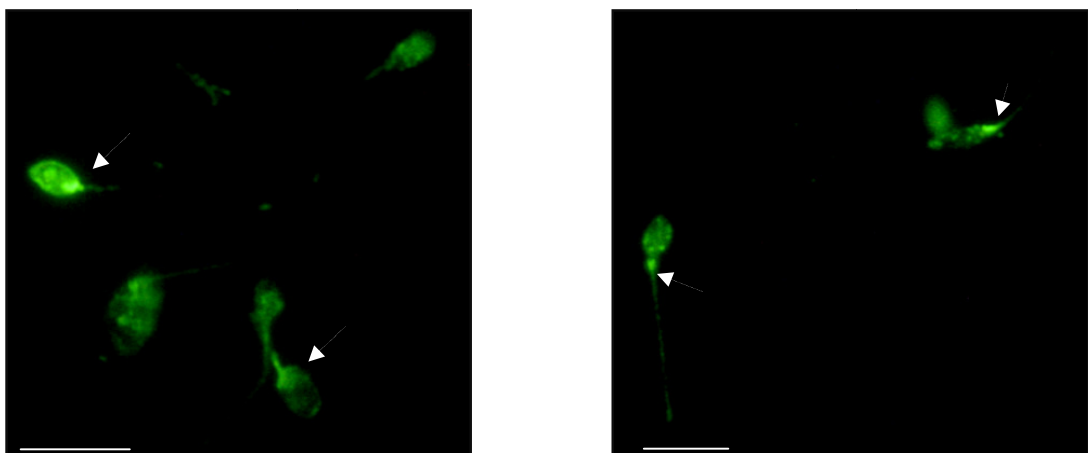
Para dar una aproximación de la localización de la proteína de interés se utilizó la técnica de inmunofluorescencia usando el anticuerpo policlonal de conejo CIC-3/4/5 y el anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo (AlexaFluor 488). Primero se

determinó la dilución del anticuerpo primario a utilizar en los experimentos, para ello se evaluaron cuatro diluciones: 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500 (figura 24).

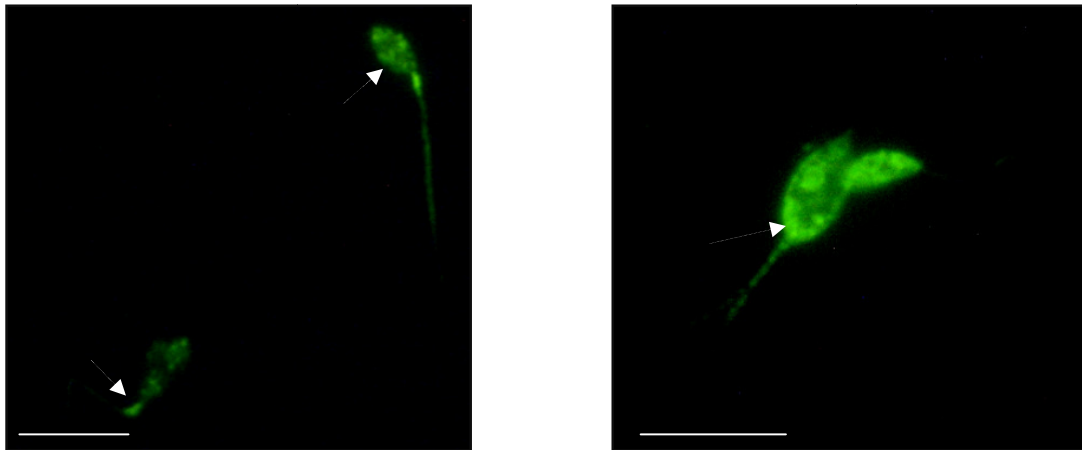


**Figura 24.** Microscopía de luz e inmunofluorescencia de *L. amazonensis*. A. Dilución 1:50. B. Dilución 1:100. C. Dilución 1:250. D. Dilución 1:500. Se utilizó anticuerpo secundario Alexa 448 dilución 1:2000. La barra representa 10  $\mu\text{m}$

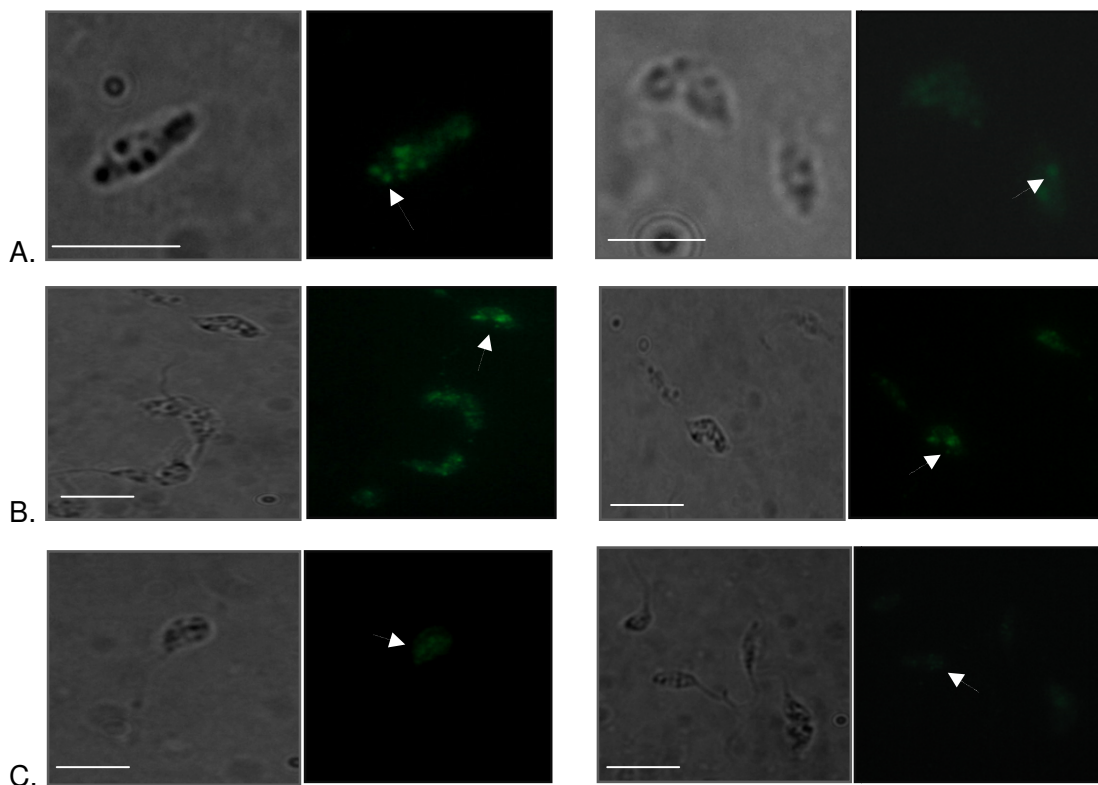
Los resultados de microscopía de fluorescencia indican que la dilución 1:100 permite una visualización definida de las estructuras fluorescentes presentes en el parásito con una baja autofluorescencia. Con este resultado se hicieron las evaluaciones correspondientes para cada uno de las especies estudiadas (figuras 25 y 26).







**Figura 25.** Microscopía de fluorescencia de *L. braziliensis*. Localización de la proteína en la membrana plasmática, bolsillo flagelar, organelos (flechas blancas). Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo CIC-3/4/5 1:100 y el anticuerpo secundario Alexa 1:2000. La barra representa 10  $\mu\text{m}$



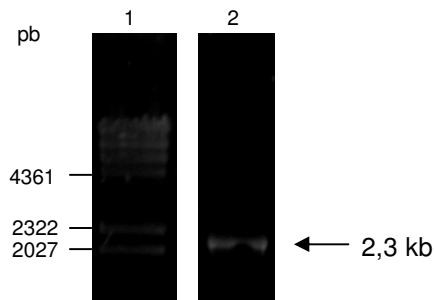
**Figura 26.** Microscopía de luz e inmunofluorescencia de las especies evaluadas. A. *L. amazonensis*. B. *L. braziliensis* y C. *L. panamensis*. Las flechas blancas indican la localización de la proteína. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

Los resultados de la expresión de la proteína indican que se transcribe, se expresa y se localiza a nivel de membrana plasmática, bolsillo flagelar (base del flagelo) y en organelos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Esta diversidad en la localización de la proteína puede estar indicando un proceso de tráfico vesicular en el que la proteína se localiza temporalmente en la membrana plasmática para luego ubicarse en organelos endosomales. Resultados reportados para células COS-7 muestran un tráfico continuo de proteínas CIC-3, donde una pequeña fracción está presente en membrana plasmática y posteriormente es endocitada; el resto de la fracción se ubica en endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, donde su función está implicada en acidificación del compartimiento endolisosomal, proceso necesario para llevar a cabo activación enzimática y posterior degradación de proteínas [135]. En *Leishmania*, una ruta para la incorporación de nutrientes es a través de los procesos de endocitosis y exocitosis que se realizan exclusivamente en el bolsillo flagelar [28]; las vesículas implicadas tienen pH ácido (4,5 a 6,5) requerido para la degradación de macromoléculas provenientes del hospedero. Es posible entonces, que la proteína estudiada pueda estar implicada en acidificación de compartimientos endolisomales proceso necesario para la adquisición de nutrientes por parte del parásito.

### **3.2 Clonación de un canal de cloruro de *Leishmania*.**

La amplificación por PCR dio un producto del tamaño esperado (2,3 kb) que puede estar codificando el canal de cloruro CLC putativo para *Leishmania*. Nuestro segundo objetivo fue generar un plásmido recombinante que permitiera hacer estudios funcionales en un sistema heterólogo de expresión; para lo cual se realizaron dos clonaciones, en un vector de clonación y en un vector de expresión.

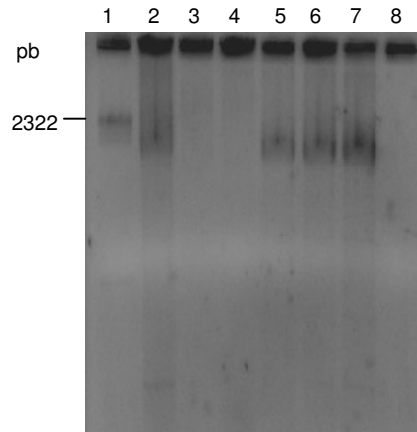
Dado que la secuencia reportada corresponde a *L. braziliensis* se clonó inicialmente el producto de PCR (figura 27) de esta especie en el vector pGEM-T-easy para su verificación por secuenciación. La concentración del producto de PCR obtenido fue de 6,79 µg/mL.



**Figura 27.** Producto de PCR de *Leishmania braziliensis*. Carril 1. Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III. Carril 2. Producto PCR de *L. braziliensis*.

El producto purificado se ligó al vector de clonación y se realizó la reacción de transformación con bacterias competentes TOP 10 (invitrogen) que incorporaron el plásmido recombinante mediante un proceso de choque térmico [136]. Las bacterias se dejaron crecer 24 horas a 37°C y se contaron las bacterias de color blanco (colonias transformadas) para determinar la eficiencia de transformación; este parámetro indica una medida de la cantidad de células bacterianas que han incorporado el producto de PCR (ADN).

El resultado de  $4,6 \times 10^7$  ufc/ $\mu$ g ADN mostró que la eficiencia está por debajo del valor esperado ( $1,0 \times 10^9$  ufc/ $\mu$ g ADN) [137], lo que puede explicarse por 2 razones: 1. la eficiencia de la enzima polimerasa Taq *platinum* (invitrogen) para incorporar las adeninas terminales no fue óptima y 2. se pudieron generar fotorreacciones durante el proceso de extracción de las bandas del gel que fueron expuestas a U.V facilitando la formación de dímeros de pirimidina [138]. Debido a que se necesitaba evaluar la inserción de la secuencia en el vector, la disminución de la eficiencia no es un parámetro crítico para continuar con el proceso; por lo tanto se hizo PCR de colonia. Se seleccionaron siete colonias de bacterias recombinantes, se utilizó el oligonucleótido directo T7 (suministrado por el fabricante) y el oligonucleótido reverso (*Rv\_0210*). El resultado obtenido permitió evaluar la direccionalidad del inserto en el plásmido recombinante (figura 28).



**Figura 28.** Evaluación de los productos de PCR de colonia. Carril 1. Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III. Cada carril está marcado con el número de la colonia seleccionada.

En la figura 28 se observa que las colonias 2, 5, 6 y 7 tienen la secuencia de interés. Las colonias que no amplificaron pueden tener el inserto (secuencia de nucleótidos codificante) sin la direccionalidad adecuada o dado la baja eficiencia de transformación es posible que los dímeros de pirimidina se pudieran insertar en el vector. Con la selección de las bacterias transformadas se hizo extracción del plásmido recombinante. Se seleccionaron tres muestras de ADN plasmídico que fueron enviadas a secuenciar utilizando los servicios de MacroGen USA; este proceso se realizó para verificar la totalidad de la secuencia de nucleótidos incorporada en el vector.

Las secuencias reportadas para las tres muestras de ADN plasmídico se analizaron con el programa *Bioedit* en el que se determinó una secuencia nucleotídica consenso (figura 29).

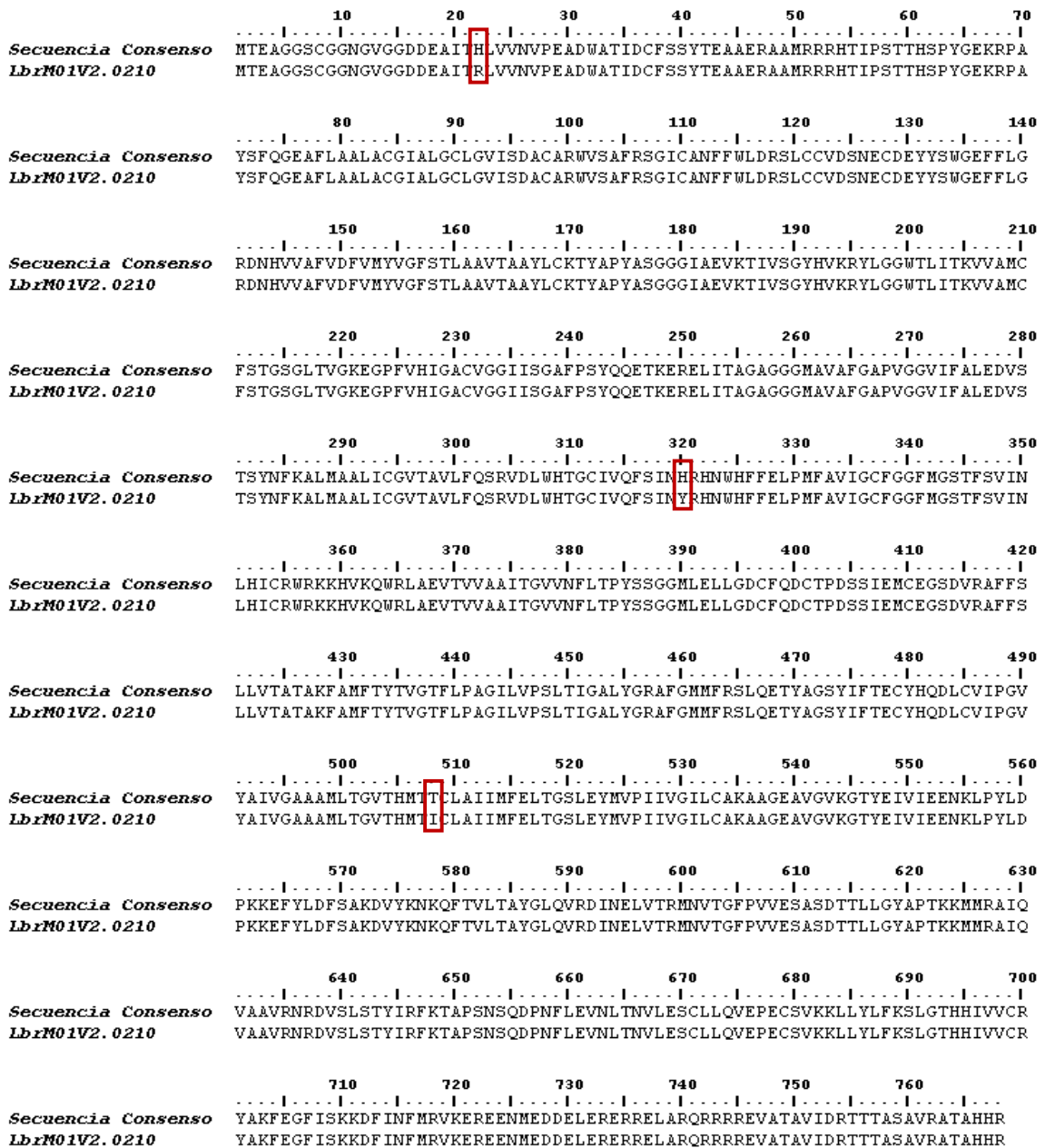
```

ATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCAC
TTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGGCG
GCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATAACCATAACCTACTACCACTCACTCGCCATACGGAGAG
AAGCGTCCC GCGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGTGCGGAATCGCGCTC
GGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGCGTTGGGTGAGCGCCTTCCGCGAGTGGGATTTGC
GCGAACTTTTTCTGGCTGGATCGCAGCCTGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCGATGAGTACTAC
TCCTGGGGCGAATTCTTTCTCGGCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTGTGACTTCGTCATGTAT
GTCGGCTTCTCCACCCTGGCGGCAGTCACGGCGGCGTACCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCC
TCTGGCGGTGGCATTGCGGAGGTGAAGACGATCGTGTGCGGCTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGT
GGCTGGACACTCATCACGAAGGTGCGTGGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTTGACGGTGGGG
AAGGAGGGCCCCCTTTGTCCACATCGGCGCCTGCGTCGGCGGCATCATCTCCGGAGCCTTTCCGAGC
TATCAGCAGGAGACCAAGAGCGCGAACTCATTACCGCCGGCGCGGGCGGTGGCATGGCCGTCGCC
TTTGGTGCCCCGTCGGCGGCGTCATTTTCGCCCTTGGAGGATGTCTCCACATCGTACAACCTCAAG
GCCCTCATGGCTGCACTCATCTGCGGCGTGACGGCGGTGCTTTTCCAGTCACGCGTGATCTCTGG
CACACCGGCTGCATTGTGCAGTTCAGCATCAACACCGGCACAACCTGGCACTTCTTTGAGCTCCCC
    
```

ATGTTTGCGGTGATCGGGTGCTTTGGCGGGTTCATGGGGTCCACCTTCAGCGTTATCAATCTGCAC  
 ATCTGCCGGTGGCGCAAGAAGCATGTGAAGCAGTGGCGACTCGCCGAGGTGACTGTCGTGGCTGCC  
 ATCACTGGTGTTCGTGAACCTTCTTGACGCCATACAGCTCCGGTGGCATGCTGGAGCTGCTCGGCGAC  
 TGCTTCCAGGACTGCACTCCAGATTCCAGCATCGAGATGTGTGAGGGCAGCGACGTGCGCGCCTTT  
 TTCTCCCTTCTCGTCAACGCCACGGCGAAGTTTGCCATGTTTACGTACACCGTTGGCACATTCCCTG  
 CCCGCCGGCATCCTTGTGCCGTCCTCACGATCGGCGCTCTGTACGGCCGCGCTTTCCGGTATGATG  
 TTTTCGCTCGCTGCAGGAAACCTACGCAGGCTCGTATATCTTACGGAGTGCTACCACCAGGACCTG  
 TCGTTCATCCCTGGCGTGTACGCGATTGTAGGCGCGGCTGCTATGCTGACCGGCGTCACCCACATG  
 ACCA**C**CTGCCTAGCGATTATCATGTTTCGAGCTCACAGGCTCGCTAGAGTACATGGTTCCCATCATT  
 GTAGGGATCCTCTGCGCCAAAGCGGCTGGCGAGGCGGTGCGGGTGAAGGGCACGTACGAGATCGTC  
 ATCGAGGAGAACAAGTTGCCCTACCTCGACCCAAAAGAAAGAGTTCTACCTTGACTTCTCTGCCAAG  
 GACGTCTACAAGAACAACAGTTTACCGTCTTGAC**G**GCGTACGGACTGCAGGTGCGCGACATCAAC  
 GAGCTCGTCACAAGGATGAACGTTACCGGCTTCCCGTGGTTCGAGTCGGCCAGTGACAC**A**ACGCTG  
 CTCGGCTACGCGCTACAAAGAAGATGATGCGGGCGATTACAGGTGGCTGCGGTGCGCAACAGAGAC  
 GTGAGCCTAAGCACGTACATTTCGCTTCAAGACAGCACCGTCCAACCTCGCAAGACCCAAACTTTCTT  
 GAGGTGAACCTAACGAACGTCTTAGAGAGCTGCCTGCTGCAGGTGGAGCCGGAGTGCTCCGTGAAG  
 AAGCTGCTGTACCTCTTCAAGTCCCTCGGCACCCACCACATCGTTCGTCTGCCGCTACGCGAAATTC  
 GAGGGCTTTATTAGCAAGAAGGATTTCACTTAACCTCATGCGCGTCAAGGAGCGCGAGGAGAACATG  
 GAGGACGATGAGCTGGAGCGAGAGCGGCGTGAG**G**GAGCGCGACAGCGGCGTTCGTTCGCGAAGTGGCA  
 ACCGCAGTGATCGACAGGACGACGACGGCTAGTGCCGTCCGTGCGACTGCCACCACCGCTGA

**Figura 29.** Secuencia nucleotídica consenso de *L. braziliensis*. Los nucleótidos de color rojo difieren de la secuencia reportada en las bases de datos.

Al comparar la secuencia consenso con la reportada en las bases de datos (anexo 1) se observó que los nucleótidos G65A, T958C, T1523C, A1752G, G1842A y T2213G difieren. Estos nucleótidos al traducirlos generan 3 cambios en la secuencia de aminoácidos (recuadro rojo, figura 30).



**Figura 30.** Comparación de la secuencia consenso con la secuencia reportada en bases de datos (GeneID: 5412354). En el recuadro rojo se observa el cambio del aminoácido en la secuencia de la proteína.

Los aminoácidos que cambiaron fueron H22R, H320Y y T508I; estas variaciones pueden ser el resultado de la utilización de una cepa de *L. braziliensis* diferente a la reportada en las bases de datos.

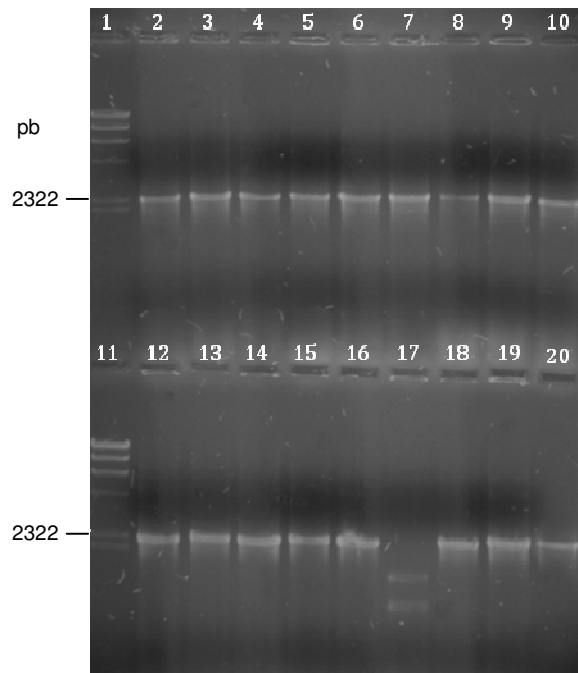
Dado que la secuencia insertada en el vector de clonación tiene un porcentaje de identidad de 99% con la secuencia reportada en la base de datos (GeneID: 5412354), se continuó con el procedimiento de clonación en el vector de expresión pcDNA™3.1/CT-GFP-TOPO (invitrogen). Se amplificaron productos de PCR para cada una de las especies, se purificaron y ligaron para el proceso de clonación directa. La concentración obtenida del producto purificado se reporta en la tabla 11.

**Tabla 11.** Concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de producto de PCR para las diferentes especies estudiadas.

Especie	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b><i>L. amazonensis</i></b>	22,50
<b><i>L. braziliensis</i></b>	11,79
<b><i>L. panamensis</i></b>	13,90

El producto se ligó al vector de expresión y se realizó la reacción de transformación con bacterias competentes TOP 10 (invitrogen). Las bacterias se dejaron crecer 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y se contaron las colonias blancas para determinar la eficiencia de transformación. El resultado fue de  $1,34 \times 10^9$  ufc/ $\mu\text{g}$  ADN lo que indica que está cercano al valor esperado  $1,0 \times 10^9$  ufc/ $\mu\text{g}$  ADN [137], por lo tanto fue efectiva la incorporación del plásmido recombinante por las bacterias competentes.

El análisis del plásmido recombinante se hizo mediante una reacción de PCR de colonia. Se seleccionaron por cada especie de *Leishmania* 6 colonias de bacterias recombinantes (figura 31).



**Figura 31.** Productos de PCR de colonia. Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III (carriles 1, 11). Producto PCR de colonia, *L. amazonensis* (carriles 2-7), *L. braziliensis* (carriles 8-14), *L. panamensis* (carriles 15-20).

En la figura 31 se observa que la colonia 3 de *L. panamensis* (carril 17) no amplificó con los oligonucleótidos, lo que indica que la colonia no insertó la secuencia o la direccionalidad del inserto no es la adecuada.

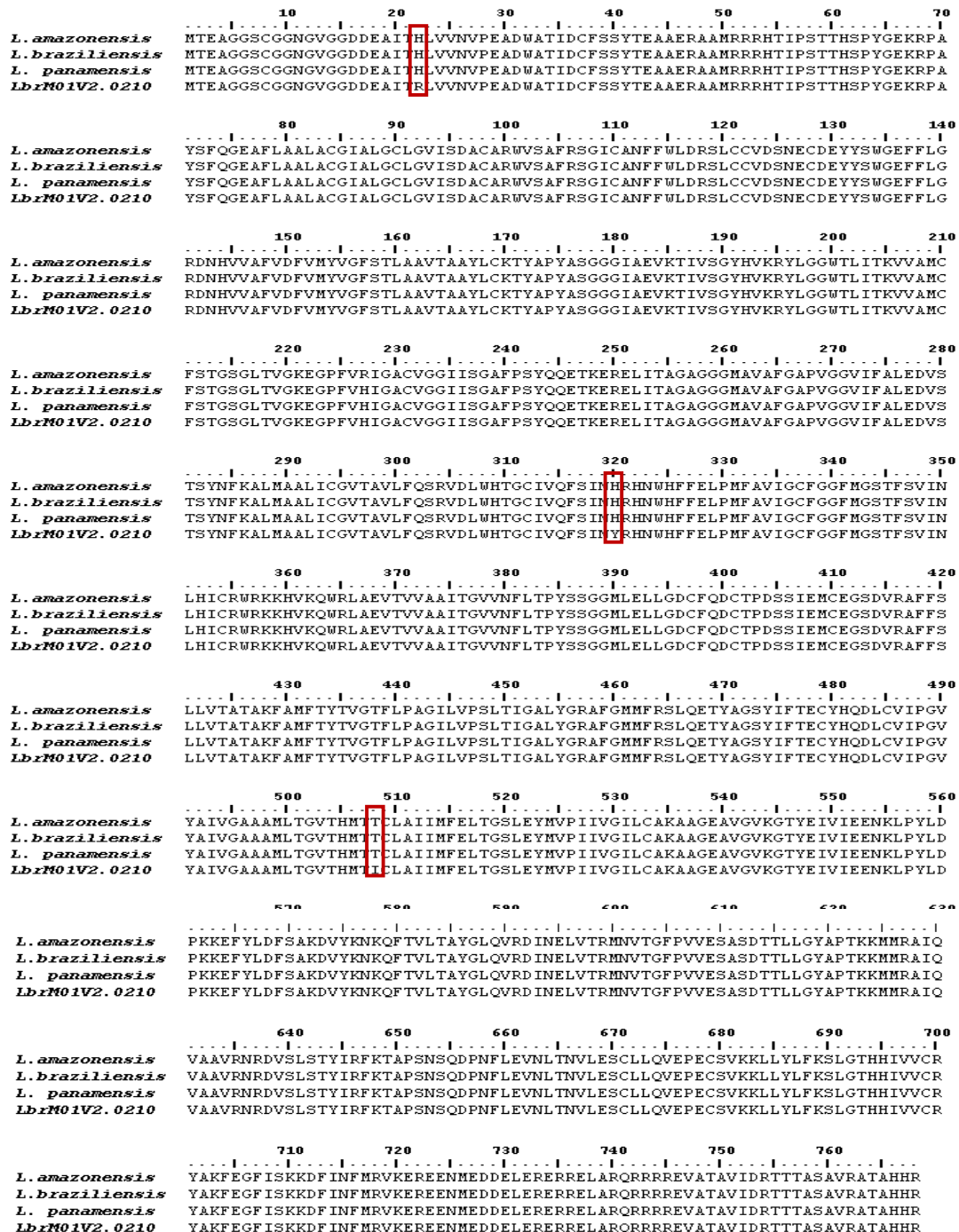
Con la selección de los clones para cada especie de *Leishmania*, se hizo extracción y conservación del plásmido recombinante para análisis de secuenciación y transfección.

Los plásmidos recombinantes de *Leishmania* (tres de cada especie) fueron enviados a secuenciar a través del servicio de MACROGEN, USA. Las secuencias reportadas se analizaron con el programa *BioEdit* con el que se determinó una secuencia nucleotídica consenso para cada especie (anexo 2).

Las tres secuencias nucleotídicas consenso (una por cada especie) se compararon entre sí presentando una identidad del 100 %. Al traducir estas secuencias y compararlas con la secuencia proteica reportada en las bases de datos (figura 32); se observó que los aminoácidos H22R, H320Y y T508I difieren con respecto a la secuencia reportada; este



mismo resultado se obtuvo con el análisis de la secuencia proteica de *L. braziliensis* clonado en el vector pGEM-T-easy; es decir que estas variaciones son conservadas para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*.



**Figura 32.** Comparación de las secuencias proteicas para cada una de las especies evaluadas con la secuencia reportada (*LbrM01V2.0210*). En el recuadro rojo se observa el cambio de los aminoácidos.

Al tener las tres especies de *Leishmania* la misma secuencia nucleotídica y proteica se sugiere una conservación evolutiva de esta proteína. Este resultado es confirmado con análisis genómico comparativo en especies de diferente subgénero (*L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*), donde se ha mostrado una conservación en más del 99% de los genes, por lo tanto la conservación en las secuencias codificantes es alta [33]. De igual forma, estudios hechos en perfiles proteómicos de diferentes estadios de *L. mexicana* han mostrado que aproximadamente el 90% del proteoma se mantiene [139]. En *Leishmania* las proteínas altamente conservadas se han asociado a procesos fundamentales en el metabolismo celular [140], en la protección de la actividad microbicida durante el establecimiento de la infección [141;142] y en la respuesta inmunogénica [143]. Por lo tanto se sugiere que esta proteína al estar presente en especies de diferente subgénero es de relevancia biológica para el parásito.

### 3.2.1 Análisis bioinformático

#### 3.2.1.1 Análisis de la estructura primaria de la proteína de *L. (V.) braziliensis*

La utilización del programa *Blast* (*Basic local alignment search tool*) con el algoritmo *blastp* (*protein-protein BLAST*) permitió identificar las secuencias que presentan una similitud significativa a la secuencia proteica consenso (tabla 12).

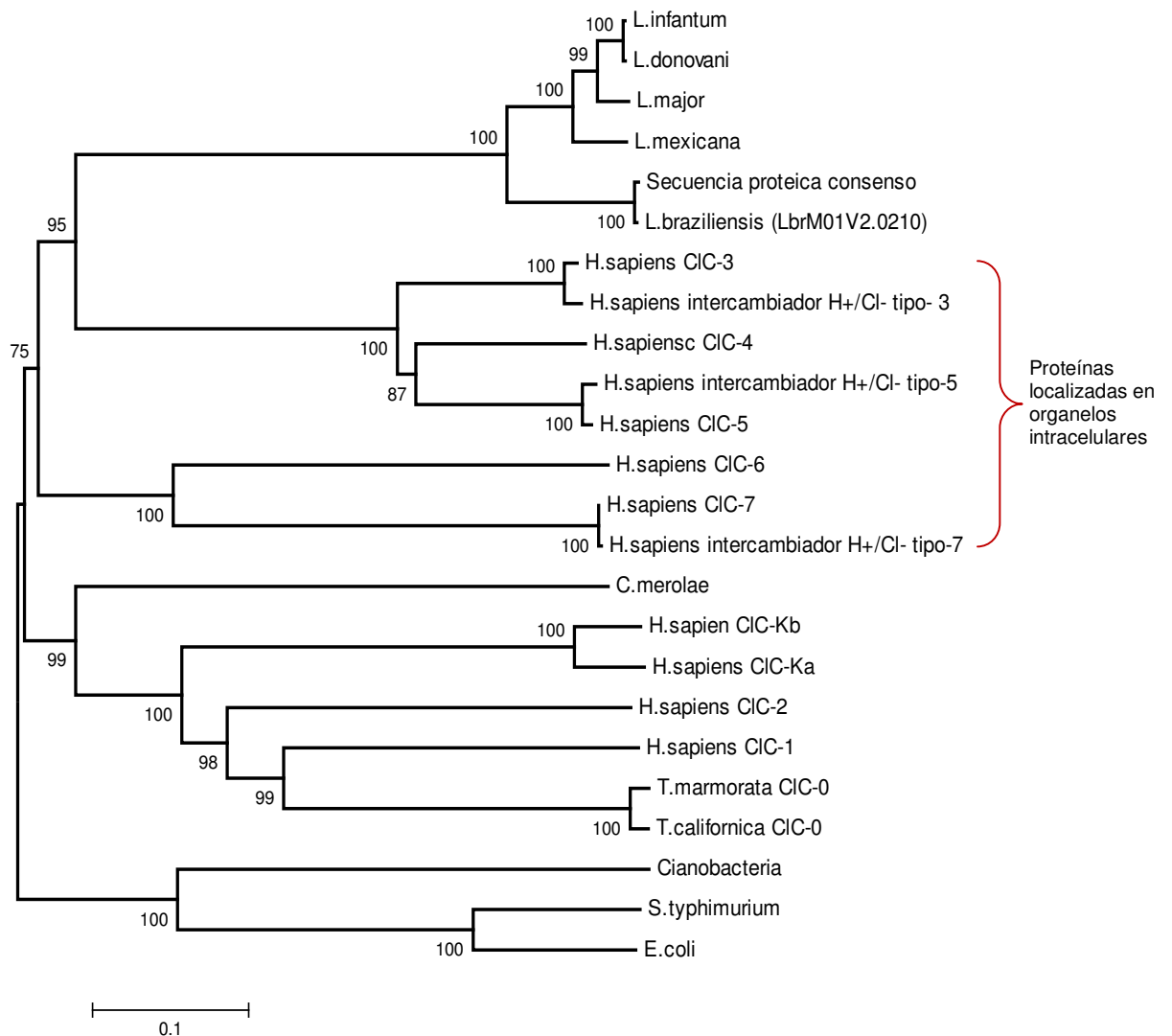
**Tabla 12.** Secuencias que presentan similitud a la secuencia consenso.

No de acceso	Descripción	E value	Identidad (%)
<a href="#">XP_001561462.1</a>	CLC-type chloride channel [ <i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	0,0	99
<a href="#">XP_001462631.1</a>	CLC -type chloride channel [ <i>Leishmania infantum</i> JPCM5],	0,0	86
<a href="#">CBZ31105.1</a>	CLC-type chloride channel, putative [ <i>Leishmania donovani</i> ]	0,0	86
<a href="#">XP_001687410.1</a>	CLC -type chloride channel [ <i>Leishmania major</i> strain Friedlin],	0,0	87
CBZ23001.1	putative CLC-type chloride channel [ <i>Leishmania mexicana</i> ]	0,0	86
NP_001230303.1	H(+)/Cl(-) exchange transporter 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]	2e-126	32%
CAA55281.1	chloride channel 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]	4e-126	32%
EAW89929.1	chloride channel 5 [ <i>Homo sapiens</i> ]	1e-117	32%

AAH36068.1	Chloride channel 4 [ <i>Homo sapiens</i> ]	2e-117	31%
NP_001121370.1	H(+)/Cl(-) exchange transporter 5 [ <i>Homo sapiens</i> ]	4e-117	32%
CAA80996.1	human ClC-1 muscle chloride channel [ <i>Homo sapiens</i> ]	2e-43	27%
NP_001164560.1	chloride channel protein 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]	7e-42	27%
CAB53065.1	chloride channel 7 [ <i>Homo sapiens</i> ]	3e-41	28%
NP_001278.1	H(+)/Cl(-) exchange transporter 7 [ <i>Homo sapiens</i> ]	4e-41	28%
gb EAW71716.1	chloride channel 6 [ <i>Homo sapiens</i> ]	7e-37	30%
EAW51764.1	chloride channel Kb [ <i>Homo sapiens</i> ]	1e-24	26%
AAH48282.1	Chloride channel Ka [ <i>Homo sapiens</i> ]	2e-21	26%
3ORG A	Chain A, <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	4e-33	26
1KPL A	Chain A, <i>Salmonella typhimurium</i>	5e-23	23
3NDO A	Chain A Cyanobacterium	8e-18	24
1KPK A	Chain A, <i>Escherichia coli</i>	5e-13	24

La secuencia consenso tiene una identidad de 99% con el canal de cloruro tipo CLC de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 que se ha reportado como una secuencia putativa generada por comparación al genoma de *Leishmania major* (<http://genedb/lbraziliensis/>) en el cual también se ha reportado como canal de cloruro putativo.

Para determinar la proximidad evolutiva de la proteína estudiada se realizó un árbol filogenético con secuencias que codifican canales de cloruro tipo CLC de diferentes especies (figura 33).



**Figura 33.** Árbol filogenético obtenido usando el método *Neighbor-joining* [144]. Se utilizaron los canales CLC descritos para los organismos filogenéticamente más cercanos a la secuencia proteica consenso; de igual forma se tuvo en cuenta canales e intercambiadores H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> descritos para *H. sapiens* y las secuencias de las estructuras cristalográficas filogenéticamente más cercanas (Ver tabla 13). El análisis filogenético tiene un *Bootstrap* de 100000 y fue conducido por el programa MEGA 4 [101].

En la figura 33 se observa que la secuencia proteica consenso se agrupa en un clado con proteínas ortólogas de la familia Trypanosomatidae; además se aprecia la relación de proximidad entre la secuencia proteica consenso con los canales e intercambiadores que se han descrito en organelos intracelulares en *Homo sapiens* [145-148]. Esta información se corroboró con una búsqueda de dominios conservados en la base de datos *CCD* (*Conserved Domain Database CDD*) de NCBI, en el que se reportó que la

secuencia consenso es similar a un canal de cloruro tipo ClC-3 con tres características conservadas; el filtro de selectividad al ión cloruro, basado en la similitud a otros miembros de la familia CLC [84]; el residuo glutamato que controla el acceso del ión cloruro al filtro de selectividad [86] y un residuo aminoacídico que está involucrado en el proceso de intercambio  $H^+ / Cl^-$  [5] (ver figura 34).

	240	250	260	270	280	290
Secuencia proteica consenso	YLCRKYAPYASGGGIAE	VKTIVSGYH--VKRYLGG	TLITKVVAMCFSTG	SGLTVGHEGPF		
<i>L. braziliensis</i>	YLCRKYAPYASGGGIAE	VKTIVSGYH--VKRYLGG	TLITKVVAMCFSTG	SGLTVGHEGPF		
<i>L. infantum</i>	YLCRKYAPYASGGGIAE	VKTIVSGHH--VKRYLGG	TLITKVVAMCFSTG	SGLTVGHEGPF		
<i>L. donovani</i>	YLCRKYAPYASGGGIAE	VKTIVSGHH--VKRYLGG	TLITKVVAMCFSTG	SGLTVGHEGPF		
<i>L. major</i>	YLCRKYAPYASGGGIAE	VKTIVSGHH--VKRYLGG	TLITKVVAMCFSTG	SGLTVGHEGPF		
<i>L. mexicana</i>	YLCRKYAPYASGGGIAE	VKTIVSGHH--VKRYLGG	TLITKVVAMCFSTG	SGLTVGHEGPF		
<i>H. sapiens H+/Cl- tipo-3</i>	SLVRVFAPYACSSGIPE	IKTILSGFI--IRGYLCK	OTLMIKTTITLV	LAVASGLSLGHEGPI		
<i>H. sapiens ClC-3</i>	SLVRVFAPYACSSGIPE	IKTILSGFI--IRGYLCK	OTLMIKTTITLV	LAVASGLSLGHEGPI		
<i>H. sapiens ClC-5</i>	SLVRVFAPYACSSGIPE	IKTILSGFI--IRGYLCK	OTLMIKTTITLV	LAVASGLSLGHEGPI		
<i>H. sapiens ClC-4</i>	SLVRVFAPYACSSGIPE	IKTILSGFI--IRGYLCK	OTLMIKTTITLV	LAVASGLSLGHEGPI		
<i>H. sapiens H+/Cl- tipo-5</i>	SLVRVFAPYACSSGIPE	IKTILSGFI--IRGYLCK	OTLMIKTTITLV	LAVASGLSLGHEGPI		
<i>C. merolae</i>	FWCAVLSTEAECSGLP	QMSILSGFYDKM	RSALRLVFAKAL	ELICAI	GGCLPVGHEGPN	
<i>S. typhimurium</i>	FLVRKFAPEAGSSGIPE	IEGALEELR--PVRWUR	--VLPVKFF	CGMGTLAG	EMVLSGHEGPI	
Cianobacteria	WLMRFAPDTS	CSGIPQIEGHLE	EKL--PLWQR--VLP	PIKLVGGFL	SLGACMLAGHEGPI	
<i>E. coli</i>	FLVRKYAPEAGSSGIPE	IEGALEEDQR--PVRWUR	--VLPVKFF	GLGTLG	EMVLSGHEGPI	
<i>T. marmorata ClC-0</i>	LFCQIVSPQAVSSGIPE	LKTIIRCAV--LHE	YTLRFVAKTV	GLTVALSAC	FPLGHEGPF	
<i>T. californica ClC-0</i>	LFCQIVSPQAVSSGIPE	LKTIIRCAV--LHE	YTLRFVAKTV	GLTVALSAC	FPLGHEGPF	

\*

	340	350	360	370	380	390
Secuencia proteica consenso	GAGGEMAVAFGAPVGGV	IFALEDVSTSYN	FRALMAALICGVT	AVLQSRVDLWHTG	CIIVQF	
<i>L. braziliensis</i>	GAGGEMAVAFGAPVGGV	IFALEDVSTSYN	FRALMAALICGVT	AVLQSRVDLWHTG	CIIVQF	
<i>L. infantum</i>	GAGGEMAVAFGAPVGGV	IFALEDVSTSYN	FRALMAALICGVT	AVLQSRVDLWHTG	CIIVQF	
<i>L. donovani</i>	GAGGEMAVAFGAPVGGV	IFALEDVSTSYN	FRALMAALICGVT	AVLQSRVDLWHTG	CIIVQF	
<i>L. major</i>	GAGGEMAVAFGAPVGGV	IFALEDVSTSYN	FRALMAALICGVT	AVLQSRVDLWHTG	CIIVQF	
<i>L. mexicana</i>	GAGGEMAVAFGAPVGGV	IFALEDVSTSYN	FRALMAALICGVT	AVLQSRVDLWHTG	CIIVQF	
<i>H. sapiens H+/Cl- tipo-3</i>	ASAAQVSVAFGAPVGGV	IFALEDVSYFFPL	ETLWRSFFAALV	AAFTLRSINP	FGNSRLVLF	
<i>H. sapiens ClC-3</i>	ASAAQVSVAFGAPVGGV	IFALEDVSYFFPL	ETLWRSFFAALV	AAFTLRSINP	FGNSRLVLF	
<i>H. sapiens ClC-5</i>	AAAAQVSVAFGAPVGGV	IFALEDVSYFFPL	ETLWRSFFAALV	AAFTLRSINP	FGNSRLVLF	
<i>H. sapiens ClC-4</i>	AAAAQVSVAFGAPVGGV	IFALEDVSYFFPL	ETLWRSFFAALV	AAFTLRSINP	FGNSRLVLF	
<i>H. sapiens H+/Cl- tipo-5</i>	AAAAQVSVAFGAPVGGV	IFALEDVSYFFPL	ETLWRSFFAALV	AAFTLRSINP	FGNSRLVLF	
<i>C. merolae</i>	ACAVGLASSFGAPVGGV	IFALEDVSYFFPL	ETLWRSFFAALV	AAFTLRSINP	FGNSRLVLF	
<i>S. typhimurium</i>	AAAACLSAARNA	PLAGVLFIEEMRP--Q	RYNLISIKAVFTG	VIMSSIVFR	IFNGEAPII	
Cianobacteria	GAGACLATARNAP	LAGVLFIEEMRP--Q	RYNLISIKAVFTG	VIMSSIVFR	IFNGEAPII	
<i>E. coli</i>	AAAACLSAARNA	PLAGVLFIEEMRP--Q	RYNLISIKAVFTG	VIMSSIVFR	IFNGEAPII	
<i>T. marmorata ClC-0</i>	GCALGISCCFC	PLAGVLFIEEMRP--Q	RYNLISIKAVFTG	VIMSSIVFR	IFNGEAPII	
<i>T. californica ClC-0</i>	GCALGISCCFC	PLAGVLFIEEMRP--Q	RYNLISIKAVFTG	VIMSSIVFR	IFNGEAPII	

\*

	560	570	580	590	600
Secuencia proteica consenso	LPAGILVPSLITIGALYGRAFGMMFRS	QETYAGSYIFTECYHQ-DL	CVIPGVYAIVGA		
<i>L. braziliensis</i>	LPAGILVPSLITIGALYGRAFGMMFRS	QETYAGSYIFTECYHQ-DL	CVIPGVYAIVGA		
<i>L. infantum</i>	LPAGILVPSLITIGALYGRAFGMMFRS	QETYASSYIFTECYDQ-DL	CVIPGVYAIVGA		
<i>L. donovani</i>	LPAGILVPSLITIGALYGRAFGMMFRS	QETYASSYIFTECYDQ-DL	CVIPGVYAIVGA		
<i>L. major</i>	LPAGILVPSLITIGALYGRAFGMMFRS	QETYASSYIFTECYDQ-DL	CVIPGVYAIVGA		
<i>L. mexicana</i>	LPAGILVPSLITIGALYGRAFGMMFRS	QETYASSYVFTTECYDQ-DL	CVIPGVYAIVGA		
<i>H. sapiens H+/Cl- tipo-3</i>	VPSGLEIPSMALGAIAGRIVGI	AVEQLAYYHHDWFI	EKEWCEVGAD	CITPGLYAMVGA	
<i>H. sapiens ClC-3</i>	VPSGLEIPSMALGAIAGRIVGI	AVEQLAYYHHDWFI	EKEWCEVGAD	CITPGLYAMVGA	
<i>H. sapiens ClC-5</i>	IPSGLEIPSMAYGAIAGRLLG	VGMELAYYHQEWTV	FNSWCSQGAD	CITPGLYAMVGA	
<i>H. sapiens ClC-4</i>	IPSGLEIPSMAYGAIAGRLLG	VGMELAYYHHDWII	ERNWCRPGAD	CVTPGLYAMVGA	
<i>H. sapiens H+/Cl- tipo-5</i>	IPSGLEIPSMAYGAIAGRLLG	VGMELAYYHQEWTV	FNSWCSQGAD	CITPGLYAMVGA	
<i>C. merolae</i>	LPAGVFPVPSFLIGAGFGRL	YCELMRVVFGNAI			VPSYAVVGA
<i>S. typhimurium</i>	APGGIFAPMLALGTLTLLG	TAFEMAAAVL	FPQYH		LEAGTFAIAGM
Cianobacteria	AIGGIFAPMLGLASIVSW	MARHFHL	FPYSQI		PEPAVMAIAGM
<i>E. coli</i>	APGGIFAPMLALGTLVLT	AFGMVAVE	FPQYH		LEAGTFAIAGM
<i>T. marmorata ClC-0</i>	WPCCAFVVPVFNLCVVLGR	FRVCELMAL	FPDGLVS		NGNLYHILPGEYAVIGA
<i>T. californica ClC-0</i>	WPCCAFVVPVFNLCVVLGR	FRVCELMAL	FPDGLVS		NGNLYHILPGEYAVIGA

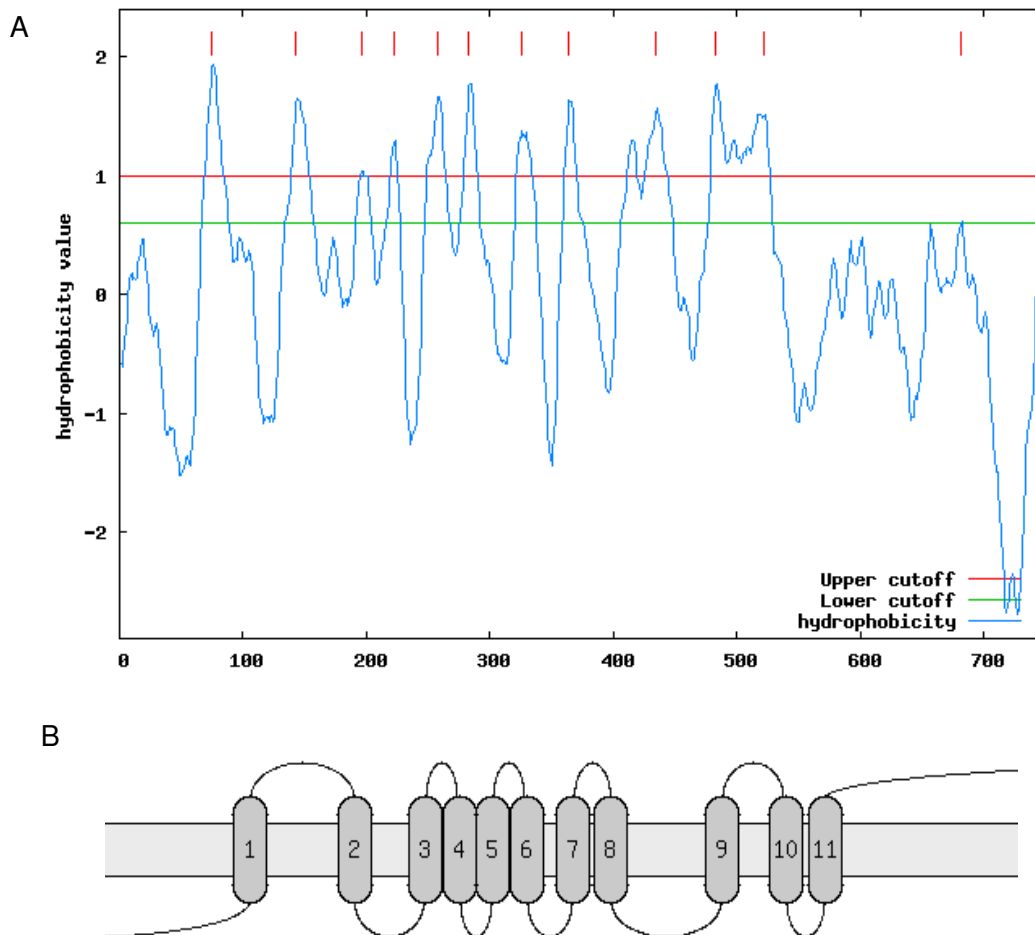
**Figura 34.** Alineamiento de las secuencias codificantes para canales e intercambiadores CLC. En color gris se observan los dominios conservados. Los dominios que conforman el filtro de selectividad están subrayados; en los recuadros están el glutamato que controla el acceso del ión cloruro al filtro de selectividad y el aminoácido (D, E) asociado a procesos de intercambio iónico [5].

Estos resultados indican que la secuencia proteica consenso posee dominios conservados que están asociados a la conducción del ión cloruro en un canal tipo ClC-3. Estos canales se han descrito en vesículas sinápticas de neuronas en donde actúan acidificando el organelo para disipar el potencial de membrana generado por la bomba V ATPasa [149]; de igual forma se han asociado a procesos de acumulación de ion Cl<sup>-</sup> y acidificación de endosomas en hepatocitos [150], regulación del volumen celular en epitelio gástrico [151] y regulación de pH en endosomas de células HEK293 [152]; estos procesos de acidificación promueven la activación enzimática necesaria para la degradación de macromoléculas. En *Leishmania* es posible que esta proteína esté asociada a la acidificación de compartimentos endolisosomales siendo un proceso necesario para la degradación de sustancias y adquisición de nutrientes provenientes del hospedero.

### 3.2.1.2 Análisis de la estructura secundaria

La utilización del programa *PredictProtein* permitió predecir la topología de la secuencia proteica consenso con una exactitud mayor a 95% [102;103]. Esta proteína se caracteriza por tener 11 hélices transmembrana, con el extremo N-terminal intracelular y

el C-terminal extracelular. Usando el programa Profsec [104] se determinó que la proteína tiene 45% de hélices alfa transmembrana, 11,46% de hojas beta y 42,97 % de *loops* [153]. En la figura 35 se aprecian 11 segmentos hidrofóbicos que constituyen los segmentos transmembrana.

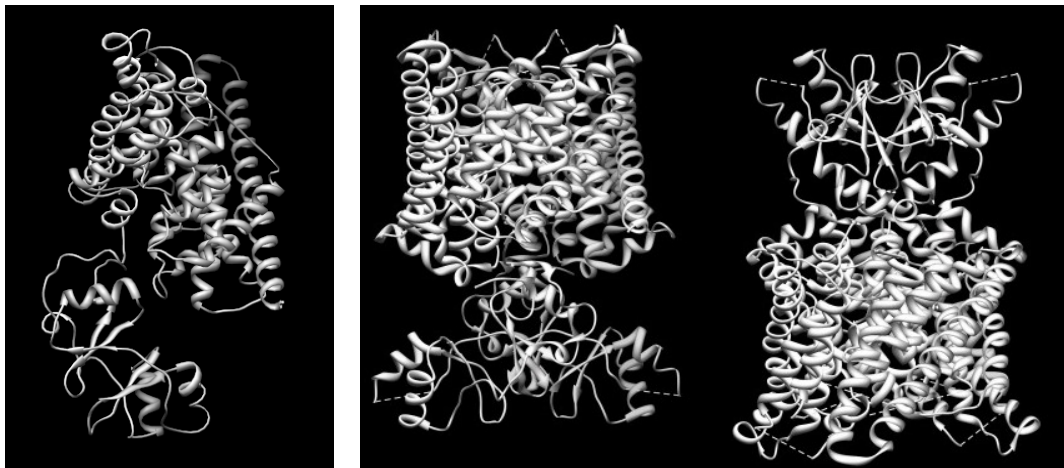


**Figura 35.** Perfil de hidrofobicidad (A) y esquema topológico (B) de la secuencia proteica consenso. Las líneas rojas indican los segmentos hidrofóbicos. El perfil y el esquema fueron elaborados con el programa Toppred [105].

Se usó el predictor de localización subcelular *Psort II predictor* [109] para determinar la ubicación celular de la secuencia consenso de *L. braziliensis*; se reportó 65,2% de probabilidad que la secuencia consenso se expresará en la membrana plasmática, 13,0% en retículo endoplasmático, 8,7% a nivel vacuolar y un 4,3% a nivel nuclear. Este programa se basa en la composición de aminoácidos presentes en la secuencia, las características de hidrofobicidad, y el perfil filogenético.

### 3.2.1.3 Modelo tridimensional

La secuencia proteica consenso se utilizó para la construcción del modelo tridimensional. Se realizó una búsqueda de la proteína de referencia con el programa BLASTp (*database* PDB) en donde se reportó a la cadena B del eucarionte *Cyanidioschyzon merolae* (alga roja; código PDB: 3ORG figura 36) como la estructura más adecuada para la construcción del modelo, presentando una identidad de 26% y un valor E de  $4,0 \times 10^{-33}$ .



**Figura 36.** Estructura del canal de *Cyanidioschyzon merolae*. A. Estructura monomérica de la cadena B. B Estructura multimérica del canal.

La elaboración del modelo tridimensional requirió de la metodología *threading* “diseño por homología remota” debido a la baja homología (menor a 30%) entre la secuencia consenso y la proteína de referencia [154]. Se seleccionó el programa PHYRE 2 [110] basado en perfiles estructurales de proteínas cristalizadas; al modelo obtenido se le hizo minimización energética usando el programa Swiss-PdbViewer [111] obteniendo una estructura termodinámicamente más estable (figura 37).





**Figura 37.** Modelo estructural de la secuencia proteica consenso obtenido con el programa PHYRE 2.

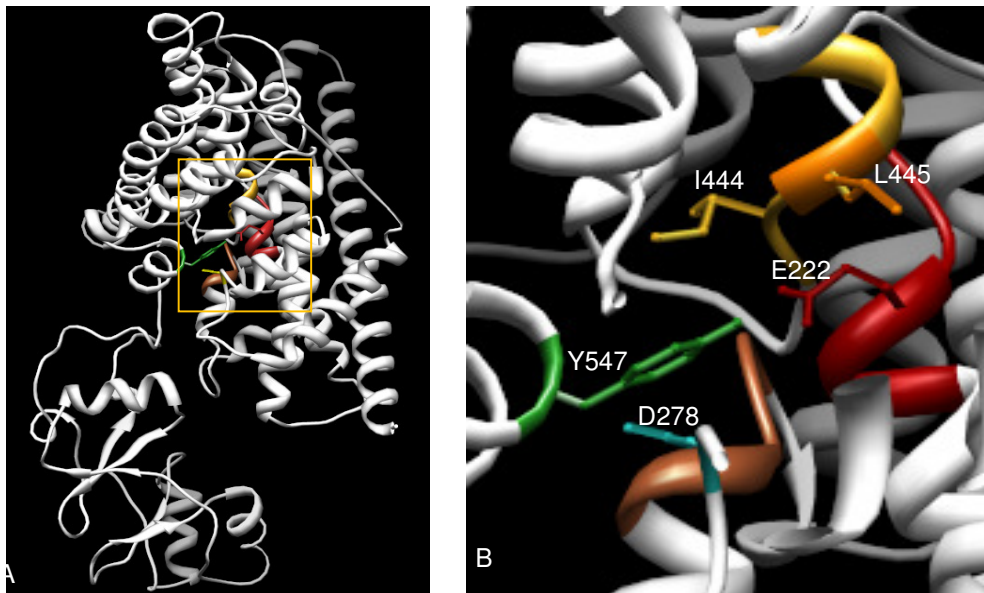
#### 3.2.1.4 Validación del modelo tridimensional

La utilización del gráfico de Rachamandran [112] (anexo 4) para evaluar el modelo minimizado energéticamente indicó sólo 2,1% de residuos en regiones no permitidas; el porcentaje restante, se encuentra en regiones permitidas (7,0%) y favorecidas (90,9%); lo que indica que 97,9% de los residuos presentes en el modelo no presentan impedimento estérico en la estructura; además el elemento mayoritario en el modelo son  $\alpha$  hélices; por lo tanto los criterios estereoquímicos utilizados para validar la estructura, es decir, las distancias interatómicas y los ángulos de enlace phi ( $\psi$ ) y psi ( $\phi$ ) dan un resultado aceptable para el modelo [112].

Usando los métodos de alineamiento estructural DALI [113;114] y SSAP [115] basados en la comparación de la conformación tridimensional entre el modelo de la proteína de interés y la proteína de referencia se obtiene un valor de RMSD (desviación cuadrática media) de 0,8 Å y 0,75 Å respectivamente, lo que indica que las proteínas son homólogas y por lo tanto el modelo minimizado es aceptable dado que el valor RMSD reportado es menor a 3,0 Å [155;156]

### 3.2.1.5 Análisis topológico del modelo tridimensional

Los canales/transportadores tienen una estructura dimérica en donde cada subunidad posee un filtro de selectividad. Para *E. coli* (*EcCLC* o *CLC-ec1*) y *S. typhimorum* (*StCLC*) el filtro está constituido por regiones conservadas que incluyen las secuencias GSGIP (I06-110), G(K/R)EGP (146-150) y GXFXP (355-359) [84]; en *C. merolae* (*CmCLC*) se ha descrito la tirosina Y515 y la serina S165 [88]. El análisis de estas regiones en la secuencia proteica codificante de *Leishmania* mostró que las regiones GGGIA (178-182), GKEGP (220-224), GILVP (443-447) y Y (547) podrían estar conformando el filtro de selectividad (figura 38).



**Figura 38.** Vía de transporte iónico. A. Regiones que conforman el filtro de selectividad GGGIA (café), GKEGP (rojo), GILVP (amarillo) y Y (verde). B. Ampliación del filtro de selectividad. En color verde Y 547; amarillo I444; naranja L445; azul D278 y rojo E222.

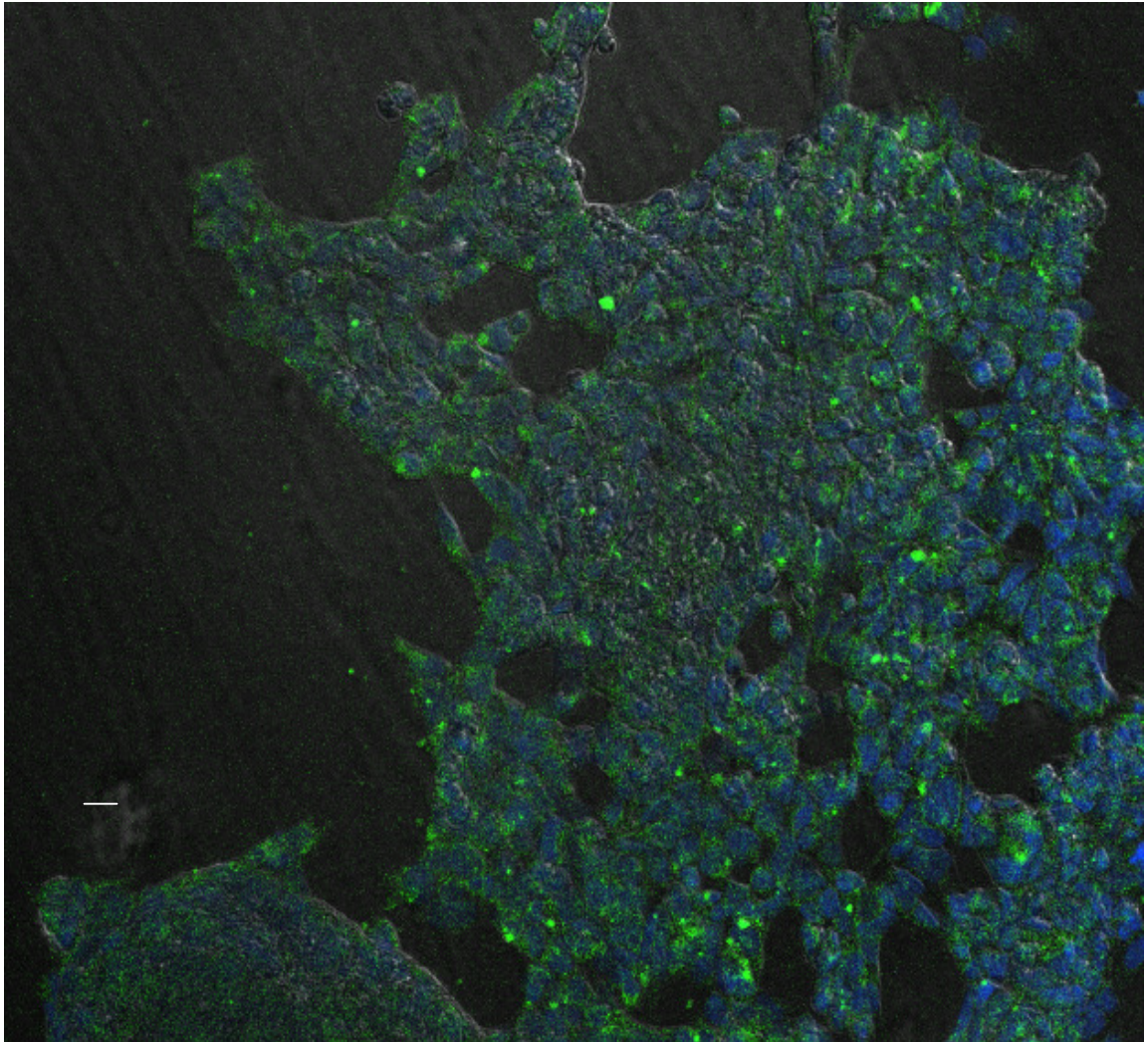
Al extrapolar los hallazgos de Dutzler [84] y Feng [88] en *Leishmania* el átomo de nitrógeno del grupo amida (cadena principal) de los aminoácido I444; L445 y el grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido Y547, están coordinando al átomo de cloruro (figura 38B); estos aminoácidos se localizan en la región N-terminal de la proteína con una densidad de carga positiva que favorece electrostáticamente la unión con el anión [84;88] .

Estudios en *EcCLC* demostraron que esta proteína, se comporta como un intercambiador de  $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$  [85], en el que los aminoácidos E148 y E203 intervienen en el proceso de transporte del ion cloruro y del protón respectivamente [5]. Análisis sobre la estructura tridimensional obtenida para *Leishmania* demuestran la presencia del homólogo a E148 (E222); sin embargo, el aminoácido homólogo a E203 se encuentra sustituido por D278. Este ácido aspártico presenta una naturaleza similar al ácido glutámico debido a que poseen un grupo carboxilo en el extremo de la cadena lateral por lo que podría servir como aceptor de protones. Estudios hechos en mutantes de *EcCLC* demostraron que la sustitución E203D no afecta el mecanismo de transporte de protones [5]; por lo tanto es probable que la proteína estudiada de *Leishmania* codifique para un intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ .

### 3.2.2 Transfección transitoria de células HEK 293

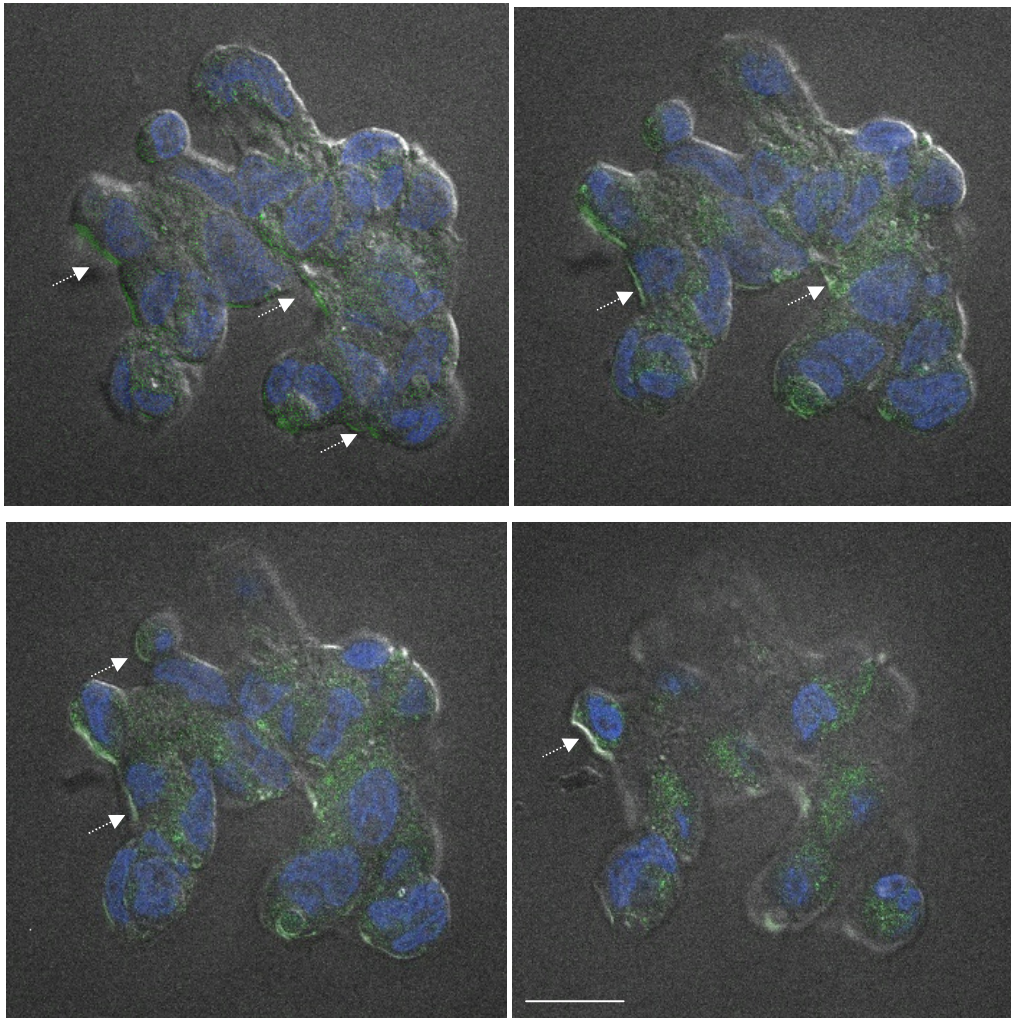
La línea celular HEK 293 derivada de un cultivo primario transformado [157] de células de epitelio renal humano, ha sido ampliamente usada por ser un sistema eficiente para el estudio de proteínas [158;159]. Estas células se caracterizan por presentar una baja expresión endógena de canales catiónicos [160;161] y aniónicos [161;162] convirtiéndolas en un modelo de expresión heteróloga adecuado para la transfección del canal de cloruro de *Leishmania*.

El proceso de transfección se hizo de acuerdo al procedimiento estandarizado indicado en el numeral 6.7, en células que no presentaran un tiempo mayor de cultivo a 2 meses debido a que la viabilidad se veía comprometida. Se calculó la eficiencia de la transfección para las células  $\text{GFP}^+$  usando microscopía de fluorescencia (Zeiss), evaluando varios campos y contabilizando el número de células transfectadas por campo, el resultado indica que 80-85% de las células HEK293 son transfectadas por el método de lipofectamina (figura 39); sin embargo, se utilizó microscopía confocal (Nikon) para determinar la localización de la proteína de interés (figura 40).



**Figura 39.** Microscopía de fluorescencia de células HEK transfectadas. Azul corresponde a núcleos (tinción con Hoescht 1:1000), verde: proteína GFP. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

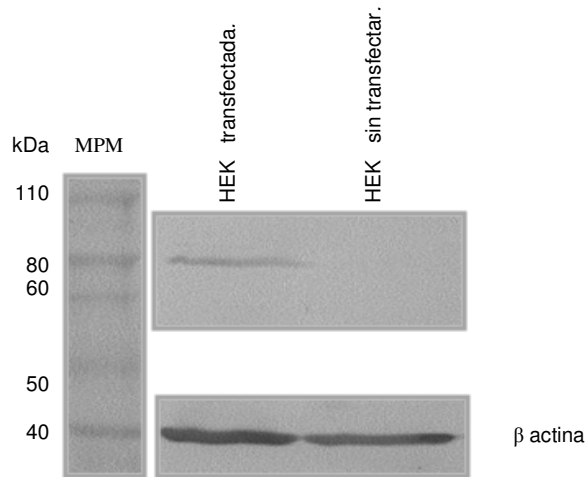




**Figura 40.** Microscopía confocal de células HEK transfectadas en diferentes planos. Azul corresponde a núcleos (tinción con Hoesch 1:1000), verde: proteína GFP. La flecha indica expresión de la proteína en membrana plasmática. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

Los resultados de microscopía confocal en diferentes planos del eje Z indican que la proteína se expresa a nivel intracelular y en membrana plasmática, lo que confirma los resultados observados en inmunofluorescencia del parásito (figuras 25 y 26) y los predichos por el programa *Psort II predictor*.

Además de la verificación por microscopía, se realizó *western blot* del extracto de proteína total de células transfectadas y sin transfectar (figura 41); estos resultados indican que la transfección produjo la expresión de la proteína de interés.



**Figura 41.** Western blot de células HEK 297 transfectadas y sin transfectar.

Teniendo estos resultados se procedió a realizar los estudios de función mediante la técnica de *Patch Clamp* en modalidad de célula entera.

### 3.3 Análisis electrofisiológico

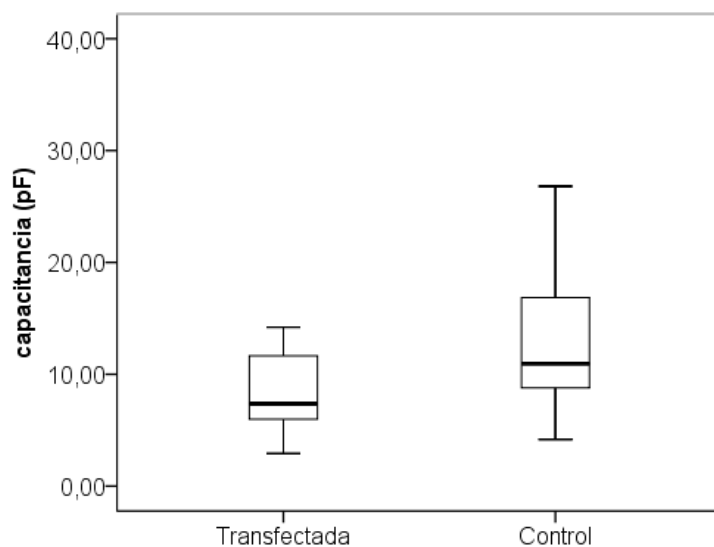
#### 3.3.1 Propiedades eléctricas pasivas

##### 3.3.1.1 Capacitancia de membrana ( $C_m$ )

La capacitancia de membrana ( $C_m$ ) proporciona una medida indirecta del área de la célula; su estudio da información sobre procesos en los que la superficie se encuentra comprometida, mecanismos de fusión, interiorización de vesículas y fagocitosis [163-165]. En las células HEK se han reportado valores de  $C_m$  de  $13 \pm 1$  pF [166].

**Tabla 13.** Valores de capacitancia para los grupos evaluados (células control y células transfectadas)

Grupos	Capacitancia (pF)	Error estándar	n
C. control	13,16	1,99	15
C. transfectadas	9,93	1,92	11



**Figura 42.** Capacitancias de membrana ( $C_m$ ) de las células control y células transfectadas.

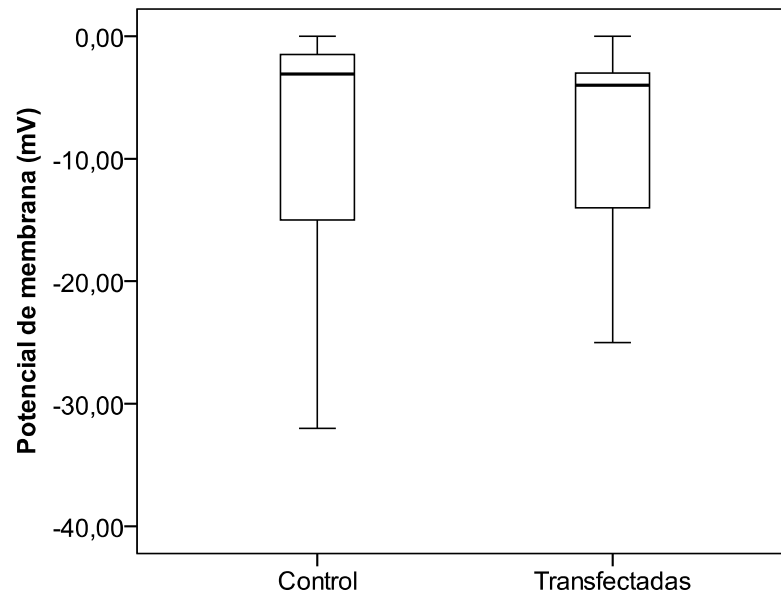
De acuerdo a la tabla 13 no se presentan diferencias significativas ( $p=0,132$ ;  $\alpha=0,05$ ; prueba de Mann-Whitney) entre los valores de  $C_m$  para células transfectadas y el grupo control lo que indica que la expresión de la proteína CLC no está incrementando el área superficial de las células HEK 293. Este resultado junto a lo encontrado en inmunofluorescencia (figuras 25 y 26) y microscopía confocal (figura 40) indican un tráfico de la proteína entre la membrana plasmática y organelos intracelulares. Varios estudios han localizado a canales/transportadores CLC-3 en endosomas [167], lisosomas [168], vesículas sinápticas [149] y vesículas de secreción [169], sugiriendo que esta proteína está en tráfico permanente hacia la membrana cuando las células son estimuladas.

### 3.3.1.2 Potencial de membrana ( $V_m$ )

El potencial de membrana ( $V_m$ ) da una medida indirecta de la permeabilidad de la célula en reposo y está determinado por la actividad metabólica celular [161].

**Tabla 14.** Valores de potencial de membrana para los grupos evaluados

Grupos	P. de membrana (mV)	Error estándar	n
C. control	-10,85	2,70	13
C. transfectadas	-7,85	4,88	6



**Figura 43.** Potencial de membrana ( $V_m$ ) de las células control y células transfectadas.

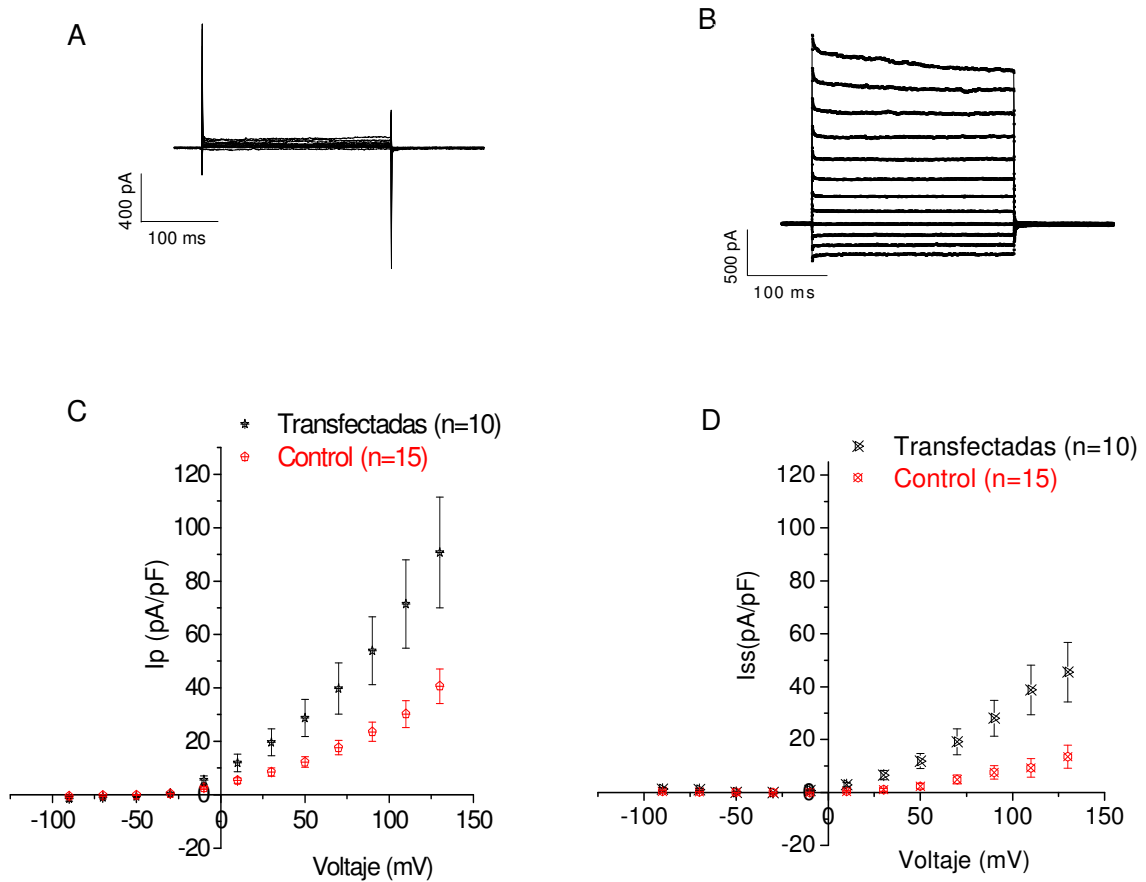
Los valores de  $V_m$  para las células control y transfectadas no difieren significativamente ( $p=0,328$ ;  $\alpha=0,05$ ; prueba de Mann-Whitney); Sin embargo, son bajos con respecto a valores estándar de una célula (-50 a -70 mV), este fenómeno se debe a que las células se registran en una solución libre de ión  $K^+$ , con alto contenido de ión  $Cl^-$  por lo tanto se aumentan las corrientes de salida de cationes lo que ocasionaría despolarización de la membrana.

### 3.3.2 Propiedades eléctricas activas

#### 3.3.2.1 Corrientes iónicas

Para evaluar la función en células HEK 293 transfectadas con el canal de *Leishmania* fue necesario la caracterización previa de las corrientes endógenas de las células HEK sin transfectar (células control). Las células control en condiciones isotónicas (300 mOsmol/Kg) presentaron pequeñas corrientes rectificadoras de salida ( $I_{OUT}$ ; figura 44A), con activación a potenciales más positivos de -30 mV (figura 44C y D).





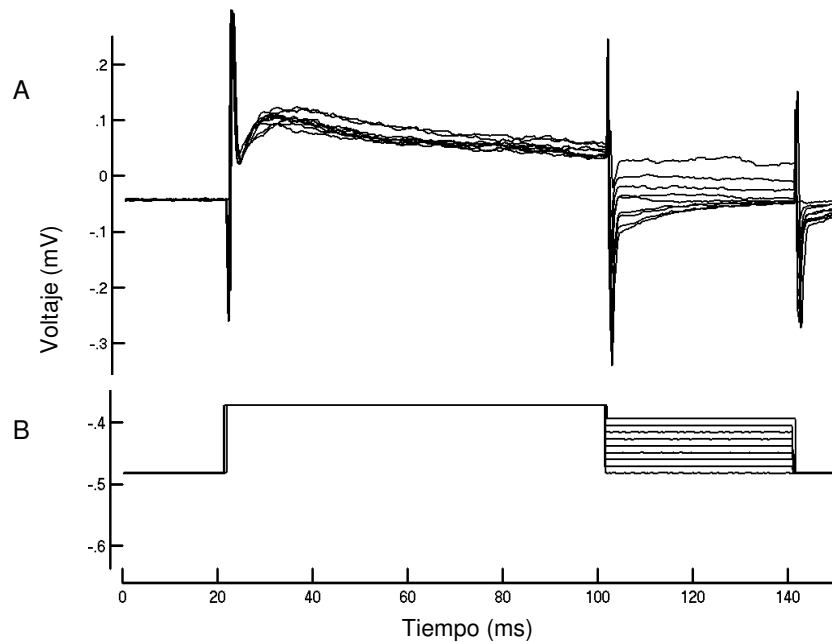
**Figura 44.** Propiedades de las corrientes de células control y transfectadas en condiciones isotónicas. Relación corriente  $I$  (pA) vs tiempo  $t$  (ms) para una célula control A y transfectada B. C. Promedio de densidad de corriente  $I_p$  (pA/pF) para controles y transfectadas. D. Promedio de densidad de corriente  $I_{ss}$  (pA/pF) para controles y transfectadas. Los datos representan promedio  $\pm$  error estándar.

Las células transfectadas en condiciones isotónicas presentaron corrientes rectificadoras de salida de mayor magnitud que las células control (figura 44B), específicamente a voltajes despolarizantes de 50, 70, 90, 110 y 130 mV. Para otros valores no hay diferencias estadísticamente significativas. Este análisis se realizó mediante ANOVA de dos vías y prueba post-hoc de Tukey.

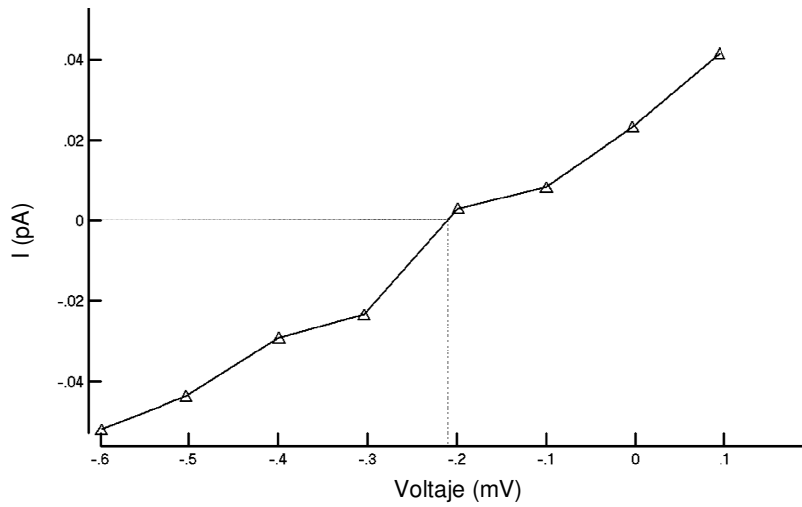
Estos resultados indican que las células transfectadas podrían estar expresando canales que generan corrientes rectificadoras de salida activadas a potenciales despolarizantes. Las corrientes registradas pueden ser resultado de: salida de cationes o ingreso de aniones. Dado que las células HEK transfectadas se encuentran expuestas a un medio

libre de  $K^+$  en donde el único ión permeante es  $Cl^-$ , el único mecanismo que explica estas corrientes está dado por el ingreso de  $Cl^-$ .

Para corroborar la naturaleza de las corrientes aniónicas se determinó el potencial de reversión  $V_{rev}$ ; este valor indica el voltaje en el que el flujo neto de corriente a través de la membrana es cero y se espera para un canal de cloruro que sea igual al potencial de equilibrio ( $E_{eq,Cl^-}$ ) del ión  $Cl^-$ . Para ello, se realizó un protocolo de colas (*tail currents*) en el que se determinó la conductancia de los canales, abriéndolos con un prepulso despolarizante (figura 45). El valor obtenido de  $V_{rev}$  es de -22 mV (figura 46) y el de  $E_{eq,Cl^-}$  es de -53 mV. La diferencia en estos datos se explica por la presencia de otras corrientes iónicas (transporte de aniones o protones) que influyen en el corrimiento de  $V_{rev}$ . Estudios hechos en el intercambiador  $Cl^-/H^+$  de *E. coli* (*CLC-ec1*) [85] demostraron que al imponer un gradiente de 4 unidades de pH la proteína nativa presenta un corrimiento en el  $V_{rev}$  de 62 mV con respecto al  $V_{rev}$  de 0 mV del mutante E203Q; este resultado se explica por el transporte de  $H^+$  debido a que la proteína actúa como un intercambiador.

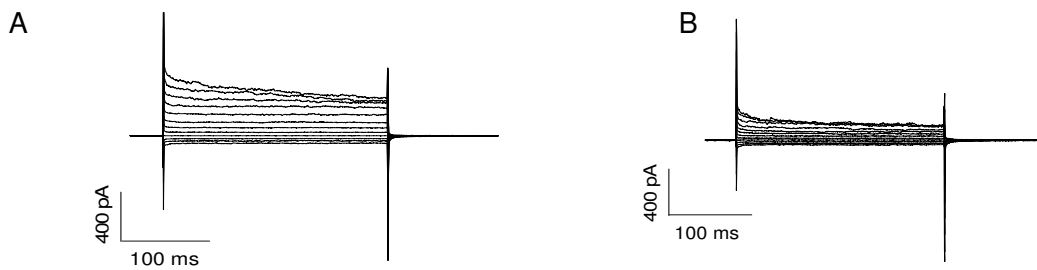


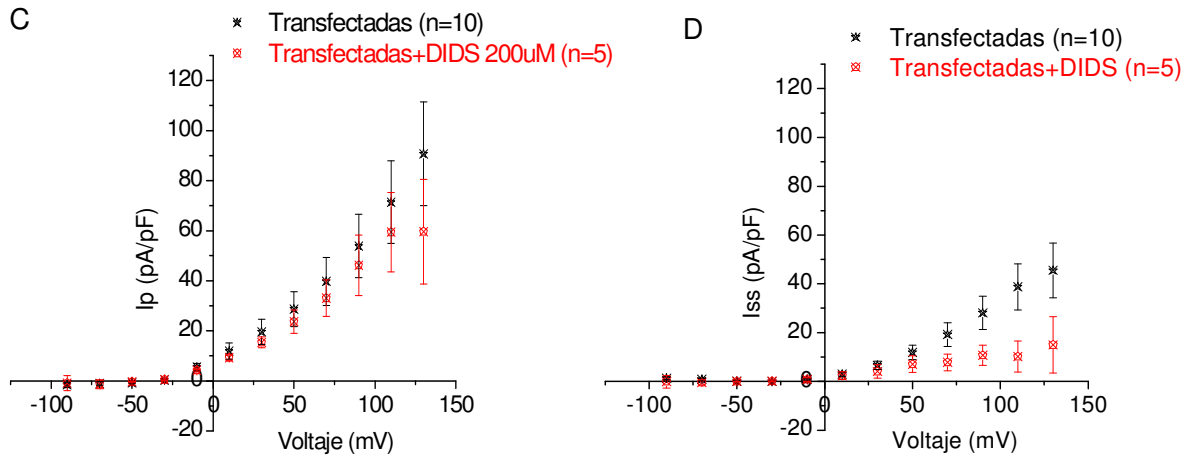
**Figura 45.** Corriente de cola para una célula HEK transfectada. A. Registro de corriente de cola. B. Protocolo de estímulo con pulsos de voltaje de -60 a 30 mV.



**Figura 46.** Relación corriente (pA) vs voltaje (mV). Determinación del potencial de reversión ( $V_{rev}$ ).

Para sustentar la naturaleza aniónica de las corrientes que se expresan en células HEK 293 transfectadas se utilizó el inhibidor DIDS a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  [122]. La evaluación de las células transfectadas con DIDS muestra inhibición a los voltajes más despolarizantes (110 y 130 mV) y al final del pulso ( $I_{ss}$ ; figura 47D, tabla 16). Este análisis se realizó mediante ANOVA de dos vías y prueba post-hoc de Tukey.



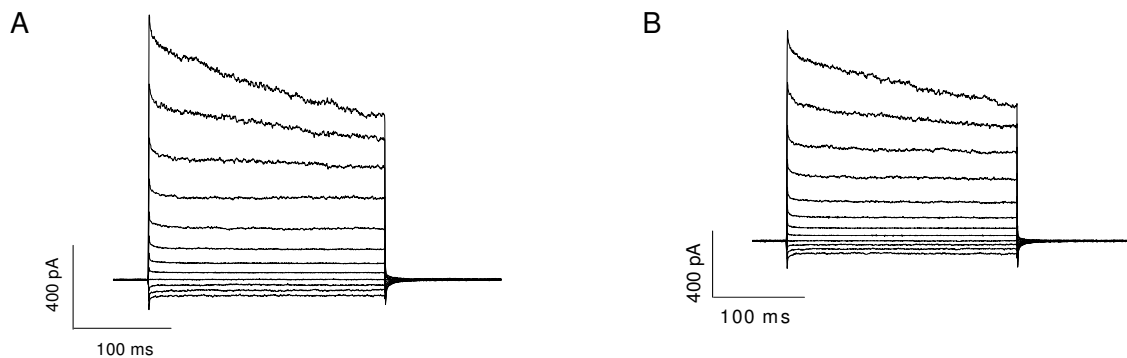


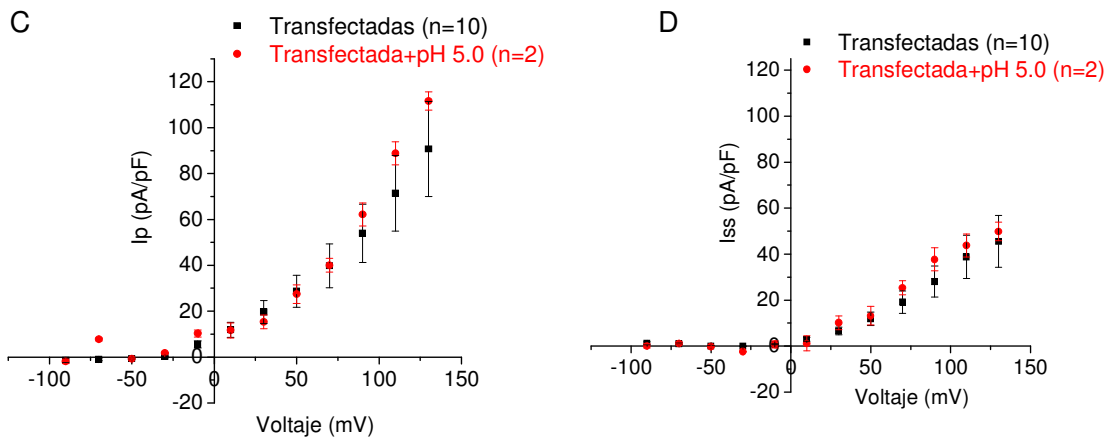
**Figura 47.** Propiedades de las corrientes de células transfectadas con y sin inhibidor. A. Relación  $I$  (pA) vs  $t$  (ms) sin DIDS. B. Con DIDS. C. Gráfica comparativa de densidad de corrientes  $I_p$  (pA/pF) para las células transfectadas con y sin DIDS. D. Promedio comparativo de densidad de corriente  $I_{ss}$  (pA/pF) para células transfectadas sin y con DIDS. Los datos representan promedio  $\pm$  error estándar.

**Tabla 15.** Efecto de DIDS (200  $\mu$ M) sobre promedio de corriente ( $I_{ss}$ )

Voltajes	Porcentaje de inhibición
+110	73,7 $\pm$ 32,4
+130	67,0 $\pm$ 29,9

Los resultados obtenidos con DIDS indican que un porcentaje importante de los iones transportados son aniones. En mamífero las corrientes de cloruro  $ClC-3$  se caracterizan por ser rectificadoras de salida ( $I_{out}$ ), inhibidas con DIDS y activadas a pH ácido [152;170]. Para iniciar la evaluación de esta propiedad se expusieron células HEK transfectadas a medio ácido (pH 5,0).





**Figura 48.** Propiedades de las corrientes de células transfectadas expuestas a diferente pH. Relación  $I$  (pA) vs  $t$  (ms) para células transfectadas: A. solución externa a pH 7,3. B. solución externa a pH 5,0. C. Promedio comparativo de densidad de corrientes  $I_p$  (pA/pF) para células transfectadas registradas en soluciones a diferentes pH. D. Promedio comparativa de densidad de corrientes  $I_{ss}$  (pA/pF) para las células transfectadas registradas en soluciones a diferentes pH. Los datos representan promedio  $\pm$  error estándar.

Los resultados indican que no se presentan variaciones estadísticamente significativas en la amplitud de las corrientes cuando las células son registradas en soluciones a pH ácido con respecto a los valores de referencia; por lo tanto, este estímulo no parece incrementar la amplitud de las corrientes activadas por voltaje. Estos resultados difieren de lo reportado para células mamíferas en las que se ha descrito cambios en la amplitud de las corrientes y del potencial de reversión en respuesta a cambios de pH extracelular [152].

Con los resultados obtenidos se puede indicar que la proteína tipo CIC-3 genera expresión de corrientes de  $\text{Cl}^-$  en HEK 293, las cuales son bloqueadas por DIDS un inhibidor de canales aniónicos. Si consideramos las funciones que se han descrito para el canal CIC-3 el cual se ha encontrado acoplado a la bomba  $\text{H}^+$  ATPasa se puede sugerir que en *Leishmania* esta proteína podría ayudar a mantener electroneutralidad, debido a que disiparía el potencial de membrana generado por la activación de la bomba; además de mantener un gradiente electroquímico que favorezca la entrada de nutrientes.

## 4. Conclusiones

Con este trabajo se logró la primera descripción y caracterización funcional de un canal de cloruro tipo CIC-3 en *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*.

La localización de este canal tipo CIC-3 en las especies de *Leishmania* estudiadas está a nivel de la membrana plasmática (bolsillo flagelar) y a nivel citoplasmático; en donde se asocia con las membranas encargadas del tráfico vesicular en procesos de endocitosis. Es posible entonces, que el canal pueda estar implicado en la acidificación de compartimientos endolisosomales, proceso indispensable para la adquisición de nutrientes desde el hospedero.

El comportamiento electrofisiológico en el sistema de expresión heteróloga sugiere que *Leishmania* expresa al menos un canal de cloruro voltaje-dependiente que podrían asociarse al mantenimiento del potencial de membrana y con ello al gradiente electroquímico que favorece la entrada de nutrientes.

## 5. Perspectivas

A partir de los hallazgos de este trabajo se inició la revisión de otras secuencias putativas para canales de cloruro descritas en el genoma de *Leishmania braziliensis*: *LbrM04 V2.1010*, *LbrM32 V2.3670* y *Lbr M33\_V2.1260*. Se diseñaron *primers* y se hicieron experimentos piloto encontrándose transcripción de estos genes en promastigote de *Leishmania*. Por lo tanto se sugiere continuar con los experimentos para evaluar expresión génica y funcionalidad de estos canales en *Leishmania*.

Se recomienda la realización de ensayos de inhibición o sobreexpresión del canal de cloruro tipo CIC-3 como un método que permita confirmar la función del canal en *Leishmania*; de igual forma se puede explorar la realización de estudios electrofisiológicos directamente sobre el promastigote.

Para determinar la actividad de la proteína como intercambiador, se recomienda la elaboración de mutaciones puntuales de los aminoácidos que se han reportado asociados al filtro de selectividad. Para cumplir con este objetivo se ha generado la mutación E278A y D279A [171]. Se espera ligar este producto al vector de expresión y transfectar HEK293 para estudios funcionales de la proteína resultante.

A nivel metodológico se propone la elaboración anticuerpos anti CIC-3, específicos para el canal caracterizado lo que complementaría y confirmaría los resultados arrojados por este estudio en los ensayos de expresión del canal. Para cumplir con este objetivo se está clonando la secuencia *LbrM01.V20210* en el sistema de expresión pET champion (invitrogen) para la producción de altos niveles de proteína que serán utilizadas para producción de anticuerpos en ratones.

Sería conveniente explorar tanto la expresión génica de este canal de cloruro tipo CIC-3 como la expresión de la proteína en amastigotes de *Leishmania* lo que daría información de expresión diferencial en los diferentes estadios del parásito. Para estudiar la expresión de este gen en el estadio amastigote se cultivaron promastigotes y se hicieron infecciones de la línea J774.A1 (macrófago-like de ratón). Se diseñaron *primers* específicos para la secuencia *LbrM01 V2.0210* [172]. Los resultados indican una transcripción del canal en diferentes tiempos posinfección. Para corroborar estos hallazgos y evaluar si hay diferencias en la expresión de este gen en el estadio amastigote se espera hacer cuantificación de transcripción por PCR en tiempo real.



## 6. Anexo 1.

Secuencia de *Leishmania braziliensis* reportada por GENEDB

>LbrM01\_V2.0210 |||CLC-type chloride channel, putative|*Leishmania braziliensis*|chr  
1|||Manual

```
ATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGA
CGAGGCCATCACGCGCTTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGA
CGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGGCGGCAGAGCGGGCCGCGATG
CGGCGTCCGACATACCATAACCATCTACCACTACTCGCCATACGGAGAGAA
GCGTCCC GCGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGT
GCGGAATCGCGCTCGGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGCGT
TGGGTGAGCGCCTTCCGCAGTGGGATTTGCGCGAACTTTTTCTGGCTGGA
TCGCAGCCTGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCGATGAGTACTACTCCT
GGGGCGAATTTCTTCTCGGCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTTGTTGAC
TTCGTATGTATGTCGGCTTCTCCACCCTGGCGGCAGTCACGGCGGCGTA
CCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCCTCTGGCGGTGGCATTGCGGAGG
TGAAGACGATCGTGTGCGGGTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGTGGCTGG
ACACTCATCACGAAGGTGCGTGGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTT
GACGGTGGGGAAGGAGGGCCCCCTTGTCCACATCGGCGCCTGCGTGGCGG
GCATCATCTCCGGAGCCTTTCCGAGCTATCAGCAGGAGACCAAAGAGCGC
GAACTCATTACCGCCGGCGCGGGCGGTGGCATGGCCGTCGCCTTTGGTGC
CCCCGTGGCGGGCGTCATTTTTCGCTTGGAGGATGTCTCCACATCGTACA
ACTTCAAGGCCCTCATGGCTGCACTCATCTGCGGCGTGACGGCGGTGCTT
TTCCAGTCACGCGTGGATCTCTGGCACACCGGCTGCATTGTGCAAGTTCAG
CATCAACTACCGGCACAACCTGGCACTTCTTTGAGCTCCCCATGTTTGGCG
TGATCGGGTGCTTTGGCGGGTTCATGGGGTCCACCTTCAGCGTTATCAAT
CTGCACATCTGCCGGTGGCGCAAGAAGCATGTGAAGCAGTGGCGACTCGC
CGAGGTGACTGTCGTGGCTGCCATCACTGGTGTGCTGAACTTCTTGACGC
CATAAGCTCCGGTGGCATGCTGGAGCTGCTCGGCGACTGCTTCCAGGAC
TGCCTCCAGATTCCAGCATCGAGATGTGTGAGGGCAGCGACGTGCGCGC
CTTTTTCTCCCTTCTCGTACCCGCCACGGCGAAGTTTGCCATGTTACAGT
ACACCGTTGGCACATTCCCTGCCCGCCGGCATCCTTGTGCCGTCACTCAG
ATCGGCGCTCTGTACGGCCGCGCTTTCGGTATGATGTTTCGCTCGCTGCA
GGAAACCTACGCAGGCTCGTATATCTTACGGAGTGCTACCACCAGGACC
TGTGCGTCATCCCTGGCGTGTACGCGATTGTAGGCGCGGCTGCTATGCTG
ACGGCGTCAACCCACATGACCATCTGCCTAGCGATTATCATGTTTCGAGCT
CACAGGCTCGCTAGAGTACATGGTTCATCATGTTAGGGATCCTCTGCG
CCAAAGCGGCTGGCGAGGCGGTCGGGGTGAAGGGCACGTACGAGATCGTC
ATCGAGGAGAACAAGTTGCCCTACCTCGACCCAAAGAAAGAGTTCTACCT
TGACTTCTCTGCCAAGGACGTCTACAAGAACAACAGTTCACCGTCCTGA
CAGCGTACGGACTGCAGGTGCGCGACATCAACGAGCTCGTCACAAGGATG
AACGTTACCGGCTTCCCGGTGGTTCGAGTCCGCCAGTGACACGACGCTGCT
CGGCTACGCGCTTACAAGAAGATGATGCGGGCGATTACGGTGGCTGCGG
TGCGCAACAGAGACGTGAGCCTAAGCACGTACATTCGCTTCAAGACAGCA
CCGTCCAACCTCGCAAGACCCAAACTTTCTTGAGGTGAACCTAACGAACGT
```

CCTAGAGAGCTGCCTGCTGCAGGTGGAGCCGGAGTGCTCCGTGAAGAAGC  
TGCTGTACCTCTTCAAGTCCCTCGGCACCCACCACATCGTTCGTCTGCCGC  
TACGCGAAATTCGAGGGCTTTATTAGCAAGAAGGATTCATTAACCTCAT  
GCGCGTCAAGGAGCGCGAGGAGAACATGGAGGACGATGAGCTGGAGCGAG  
AGCGGCGTGAGCTAGCGCGACAGCGGCGTCGTCGCGAAGTGGCAACCGCA  
GTGATCGACAGGACGACGACGGCTAGTGCCGTCCGTGCGACTGCCACCA  
CCGCTGA

## 7. Anexo 2.

### Resultados de las secuenciaciones de los clones

#### Secuencia consenso de *L. (L.) amazonensis*

ATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGA  
CGAGGCCATCACGCaCTTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGA  
CGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGGCGGCAGAGCGGGCCGCGATG  
CGGCGTCCGACATACCATAACCATCTACCACTCACTCGCCATACGGAGAGAA  
GCGTCCCAGCTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGT  
GCGGAATCGCGCTCGGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGCGT  
TGGGTGAGCGCCTTCCGCAGTGGGATTTGCGCGAACTTTTTCTGGCTGGA  
TCGCAGCCTGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCATGAGTACTACTCCT  
GGGCGAAATCTTTCTCGGCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTGTGAC  
TTCGTCAATGATGTCGGCTTCTCCACCCTGGCGGCAGTCACGGCGGCGTA  
CCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCCTCTGGCGGTGGCATTGCGGAGG  
TGAAGACGATCGTGTGCGGGTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGTGGCTGG  
ACACTCATCACGAAGGTGCTGGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTT  
GACGGTGGGGAAGGAGGGCCCCCTTGTCCgCATCGGCGCCTGCGTCCGGC  
GCATCATCTCCGGAGCCTTTCCGAGCTATCAGCAGGAGACCAAAGAGCGC  
GAACTCATTACCGCCGGCGCGGGCGGTGGCATGGCCGTCGCCTTTGGTGC  
CCCCGTCCGGCGGCGTCATTTTCGCCTTGGAGGATGTCTCCACATCGTACA  
ACTTCAAGGCCCTCATGGCTGCACTCATCTGCGGCGTGACGGCGGTGCTT  
TTCCAGTCACGCGTGGATCTCTGGCACACCGGCTGCATTGTGCAATTGAG  
CATCAACcACCGGCACAACCTGGCACTTCTTTGAGCTCCCCATGTTTGGG  
TGATCGGGTGCTTTGGCGGGTTCATGGGGTCCACCTTACGCGTTATCAAT  
CTGCACATCTGCCGGTGGCGCAAGAAGCATGTGAAGCAGTGGCGACTCGC  
CGAGGTGACTGTCGTGGCTGCCATCACTGGTGTGCTGAACCTTCTTGACGC  
CATAAGCTCCGGTGGCATGCTGGAGCTGCTCGGCGACTGCTTCCAGGAC  
TGCACTCCAGATTCCAGCATCGAGATGTGTGAGGGCAGCGACGTGCGCGC  
CTTTTTCTCCCTTCTCGTCAACGCCACGGCGAAGTTTGCCATGTTACAGT  
ACACCGTTGGCACATTCCTGCCCGCCGGCATCCTTGTGCCGTCACTCACG  
ATCGGCGCTCTGTACGGCCGCGCTTTCGGTATGATGTTTCGCTCGCTGCA  
GGAAACCTACGCAGGCTCGTATATCTTACGGAGTGCTACCACCAGGACC  
TGTGCGTATCCCTGGCGTGTACGCGATTGTAGGCGCGGCTGCTATGCTG  
ACCGGCGTCACCCACATGACCAcCTGCCTAGCGATTATCATGTTGAGCT  
CACAGGCTCGTAGAGTACATGGTTCATCATTGTAGGGATCCTCTGCG  
CCAAAGCGGCTGGCGAGGCGGTCGGGGTGAAGGGCACGTACGAGATCGTC  
ATCGAGGAGAACAAGTTGCCCTACCTCGACCCAAAGAAAGAGTTCTACCT  
TGACTTCTCTGCCAAGGACGTCTACAAGAACAACAGTTCACCGTCCTGA  
CgGCGTACGGACTGCAGGTGCGCGACATCAACGAGCTCGTCACAAGGATG  
AACGTTACCGGCTTCCCGGTGGTCGAGTCGGCCAGTGACACaACGCTGCT  
CGGCTACGCGCTACAAAGAAGATGATGCGGGCGATTACGGTGGCTGCGG  
TGCGCAACAGAGACGTGAGCCTAAGCACGTACATTCGCTTCAAGACAGCA  
CCGTCCAACCTCGCAAGACCCAAACTTTCTTGAGGTGAACCTAACGAACGT  
CCTAGAGAGCTGCCTGCTGCAGGTGGAGCCGGAGTGCTCCGTGAAGAAGC

TGCTGTACCTCTTCAAGTCCCTCGGCACCCACCACATCGTCGTCTGCCGC  
 TACGCGAAATTCGAGGGCTTTATTAGCAAGAAGGATTTCAATTAACCTTCAT  
 GCGCGTCAAGGAGCGCGAGGAGAACATGGAGGACGATGAGCTGGAGCGAG  
 AGCGGCGTGAGCTAGCGCGACAGCGGCGTCGTCGCGAAGTGGCAACCGCA  
 GTGATCGACAGGACGACGACGGCTAGTGCCGTCCGTGCGACTGCCACCA  
 CCGCTGA

#### Secuencia de ADN traducida a secuencia de proteína.

MTEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRH TIPSTT  
 HSPYGEKRPAYSFQGEAF LAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLD RSL  
 CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVAVFVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG  
 IAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVFRIGACVGGIISGAF  
 PSYQOETKERELITAGAGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL  
 FQSRVDLWHTGCIVQFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKHH  
 VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGMLLELLGD CFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFS  
 LLVTATAKFAMFTYTVGTF LPAGILVPSLTIGALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECY  
 HQDLCVIPGVYAIVGAAAML TGVTHTMTCLAIIMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA  
 VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLD FSAKD VYKNKQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM  
 NVTGFPVVESASD TLLGYAPT KMMRAIQVA AVRN RDVSLSTYIRFKTAPSNSQDPNFL  
 EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYL FKS LGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK  
 EREENMEDDELERERRELARQRRRREVATAVIDRTTASAVRATAHHR.

#### Secuencia consenso de *Leishmania braziliensis*

ATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTTCGGCGGTGACGA  
 CGAGGCCATCACGC **a**CTTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGA  
 CGATCGACTGCTT **c**AGCAGCTACACGGAGGCGGCAGAGCGGGCCGCGATG  
 CGGCGTCGCCATAACCATAACCATCTACCACTCACTCGCCATAACGAGAGAA  
 GCGTCCC GCGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGT  
 GCGGAATCGCGCTCGGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGCGT  
 TGGGTGAGCGCCTTCCGCAGTGGGATTTGCGCGAACTTTTTCTGGCTGGA  
 TCGCAGCCTGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCGATGAGTACTACTCCT  
 GGGGCGAATTCTTTCTCGGCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTGTGAC  
 TTCGTATGTATGTCGGCTTCTCCACCCTGGCGGCAGTCACGGCGGCGTA  
 CCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCCTCTGGCGGTGGCATTGCGGAGG  
 TGAAGACGATCGTGTGCGGCTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGTGGCTGG  
 ACACTCATCACGAAGGTCTGTGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTT  
 GACGGTGGGGAAGGAGGGCCCCCTTTGTCCACATCGGCGCCTGCGTCGGCG  
 GCATCATCTCCGAGCCTTTCCGAGCTATCAGCAGGAGACCAAAGAGCGC  
 GAACTCATTACCGCCGGCGCGGGCGGTGGCATGGCCGTCGCCTTTGGTGC  
 CCCCCTCGGCGGCGTCATTTTCGCCTTGGAGGATGTCTCCACATCGTACA  
 ACTTCAAGGCCCTCATGGCTGCACCTCATCTGCGGCGTGACGGCGGTGCTT  
 TTCCAGTACGCGTGGATCTCTGGCACACCGGCTGCATTGTGCAGTTCAG  
 CATCAAC **c**ACCGGCACAACCTGGCACTTCTTTGAGCTCCCCATGTTTGGG  
 TGATCGGGTGCTTTGGCGGGTTCATGGGGTCCACCTTCAGCGTTATCAAT  
 CTGCACATCTGCCGGTGGCGCAAGAAGCATGTGAAGCAGTGGCGACTCGC  
 CGAGGTGACTGTCGTGGCTGCCATCACTGGTGTGCTGAACCTTCTTGACGC  
 CATAAGCTCCGGTGGCATGCTGGAGCTGCTCGGCGACTGCTTCCAGGAC  
 TGCCTCCAGATTCCAGCATCGAGATGTGTGAGGGCAGCGACGTGCGCGC

CTTTTTCTCCCTTCTCGTCACCGCCACGGCGAAGTTTGCCATGTTACGTC  
 ACACCGTTGGCACATTCCCTGCCCGCCGGCATCCTTGTGCCGTCACTCAG  
 ATCGGGCGCTCTGTACGGCCGCGCTTTTCGGTATGATGTTTCGCTCGCTGCA  
 GGAAACCTACGCAGGCTCGTATATCTTCACGGAGTGCTACCACCAGGACC  
 TGTGCGTCATCCCTGGCGTGTACGCGATTGTAGGCGCGGCTGCTATGCTG  
 ACCGGCGTCACCCACATGACCAcCTGCCTAGCGATTATCATGTTTCGAGCT  
 CACAGGCTCGCTAGAGTACATGGTTCATCATTGTAGGGATCCTCTGCG  
 CCAAAGCGGCTGGCGAGGCGGTCGGGGTGAAGGGCACGTACGAGATCGTC  
 ATCGAGGAGAACAAGTTGCCCTACCTCGACCCAAAGAAAGAGTTCTACCT  
 TGACTTCTCTGCCAAGGACGTCTACAAGAACAACAGTTCACCGTCCTGA  
 CgGCGTACGGACTGCAGGTGCGCGACATCAACGAGCTCGTCACAAGGATG  
 AACGTTACCGGCTTCCCGGTGGTCGAGTCGGCCAGTGACACaACGCTGCT  
 CGGCTACGCGCTACAAAGAAGATGATGCGGGCGATTACAGGTGGCTGCGG  
 TGCGCAACAGAGACGTGAGCCTAAGCACGTACATTCGCTTCAAGACAGCA  
 CCGTCCAACCTCGCAAGACCCAACTTTCTTGAGGTGAACCTAACGAACGT  
 CCTAGAGAGCTGCCTGCTGCAGGTGGAGCCGGAGTGCTCCGTGAAGAAGC  
 TGCTGTACCTCTTCAAGTCCCTCGGCACCCACCACATCGTCGTCTGCCGC  
 TACGCGAAATTCGAGGGCTTTATTAGCAAGAAGGATTTCACTAACTTCAT  
 GCGCGTCAAGGAGCGCGAGGAGAACATGGAGGACGATGAGCTGGAGCGAG  
 AGCGGCGTGAGCTAGCGCGACAGCGGCGTCGTCGCGAAGTGGCAACCGCA  
 GTGATCGACAGGACGACGACGGCTAGTGCCGTCCGTGCGACTGCCACCA  
 CCGCTGA

**Secuencia de ADN traducida a secuencia de proteína.**

MTEAGGSCGGNGVGGDDEAI THLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTT  
 HSPYGEKRPAYSFQGEAF LAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSL  
 CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVVA FVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG  
 IAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVAMCFSTGSLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAF  
 PSYQQETKERELITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL  
 FQSRVDLWHTGCI VQFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKH  
 VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFS  
 LLVTATAKFAMFYTYTVGTFLPAGILVPSLTI GALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECY  
 HQDLCVIPGVYAI V GAAAML TGVTHTMTCLAI IMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA  
 VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLD FSAKD VYKNKQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM  
 NVTGFPVVESASD TLLGYAPT KMMRAI QVAAVRNRDVSLSTYIRFKTAPSNSQDPNFL  
 EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK  
 EREENMEDDELERERRELARQRRRREVATAVIDRTTASAVRATAHHR.

**Secuencia consenso de *Leishmania panamensis***

ATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGA  
 CGAGGCCATCACGCaCTTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGA  
 CGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGGCGGCAGAGCGGGCCGCGATG  
 CGGCGTCGCCATAACCATAACCTACTACTCGCCATAACGAGAGAA  
 GCGTCCC GGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGT  
 GCGGAATCGCGCTCGGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGCGT  
 TGGGTGAGCGCCTTCCGCAGTGGGATTTGCGCGAACTTTTTCTGGCTGGA  
 TCGCAGCCTGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCGATGAGTACTACTCCT

GGGGCGAATTCTTTCTCGGCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTGTGAC  
TTCGTCATGTATGTCGGCTTCTCCACCCTGGCGGCAGTCACGGCGGCGTA  
CCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCCTCTGGCGGTGGCATTGCGGAGG  
TGAAGACGATCGTGTCTGGGCTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGTGGCTGG  
ACACTCATCACGAAGGTCGTGGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTT  
GACGGTGGGGAAGGAGGGCCCCCTTTGTCCACATCGGCGCCTGCGTCGGCG  
GCATCATCTCCGGAGCCTTTCCGAGCTATCAGCAGGAGACCAAAGAGCGC  
GAACTCATTACCGCCGGCGCGGGCGGTGGCATGGCCGTCGCCTTTGGTGC  
CCCCGTCGGCGGCGTCATTTTCGCCTTGGAGGATGCTCTCCACATCGTACA  
ACTTCAAGGCCCTCATGGCTGCACTCATCTGCGGCGTGACGGCGGTGCTT  
TTCCAGTCACGCGTGGATCTCTGGCACACCGGCTGCATTGTGCAGTTCAG  
CATCAACcACCGGCACAACCTGGCACTTCTTTGAGCTCCCCATGTTTGGCG  
TGATCGGGTGTCTTTGGCGGGTTCATGGGGTCCACCTCAGCGTTATCAAT  
CTGCACATCTGCCGGTGGCGCAAGAAGCATGTGAAGCAGTGGCGACTCGC  
CGAGGTGACTGTCGTGGCTGCCATCACTGGTGTCTGGAACCTTCTTGACGC  
CATAAGCTCCGGTGGCATGCTGGAGCTGCTCGGCGACTGCTTCCAGGAC  
TGCCTCCAGATTCCAGCATCGAGATGTGTGAGGGCAGCGACGTGCGCGC  
CTTTTTCTCCCTTCTCGTCAACGCCACGGCGAAGTTTGGCATGTTACGT  
ACACCGTTGGCACATTCTGCCC GCCGGCATCCTTGTGCCGTCACTCAG  
ATCGGCGCTCTGTACGGCCGCGCTTTCCGGTATGATGTTTCTCGCTCGCTGCA  
GGAAACCTACGCAGGCTCGTATATCTTACGGAGTGCTACCACCAGGACC  
TGTGCGTCATCCCTGGCGTGTACGCGATTGTAGGCGCGGCTGCTATGCTG  
ACCGGCGTCACCCACATGACCAcCTGCCTAGCGATTATCATGTTTCGAGCT  
CACAGGCTCGTAGAGTACATGGTTCATCATTGTAGGGATCCTCTGCG  
CCAAAGCGGCTGGCGAGGCGGTCGGGGTGAAGGGCACGTACGAGATCGTC  
ATCGAGGAGAACAAGTTGCCCTACCTCGACCCAAAGAAAGAGTTCTACCT  
TGACTTCTCTGCCAAGGACGTCTACAAGAACAACAGTTCACCGTCCTGA  
CgGCGTACGGACTGCAGGTGCGCGACATCAACGAGCTCGTCACAAGGATG  
AACGTTACCGGCTTCCCGGTGGTTCGAGTTCGGCCAGTGACACaACGCTGCT  
CGGCTACGCGCTACAAAGAAGATGATGCGGGCGATTTCAGGTGGCTGCGG  
TGCGCAACAGAGACGTGAGCCTAAGCACGTACATTCGCTTCAAGACAGCA  
CCGTCCAACCTCGCAAGACCCAAACTTTCTTGAGGTGAACCTAACGAACGT  
CCTAGAGAGCTGCCTGCTGCAGGTGGAGCCGGAGTGCTCCGTGAAGAAGC  
TGCTGTACCTCTTCAAGTCCCTCGGCACCCACCACATCGTCTGTCGCGC  
TACGCGAAAATTCGAGGGCTTTATTAGCAAGAAGGATTTCACTAACTTCAT  
GCGCGTCAAGGAGCGCGAGGAGAACATGGAGGACGATGAGCTGGAGCGAG  
AGCGGCGTGAGCTAGCGCGACAGCGGCGTCTGTCGCGAAGTGGCAACCGCA  
GTGATCGACAGGACGACGACGGCTAGTGCCGTCCGTGCGACTGCCACCA  
CCGCTGA

### Secuencia de ADN traducida a secuencia de proteína.

MTEAGGSCGGNGVGGDDEAI THLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTT  
HSPYGEKRPAYSFQGEAF LAALACGIALGLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSL  
CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVVA FVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG  
IAEVKTIIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAF  
PSYQQETKERELITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL  
FQSRVDLWHTGCI VQFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKH  
VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGMLELLGDCFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFS  
LLVTATAKFAMFTYTVGTFLPAGILVPSLTI GALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECY

HQDLCVIPGVYAIVGAAAMLGVTHMTTCLAIIMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA  
VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLD FSAKD VYKNKQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM  
NVTGFPVVESASDTLLGYAPTKMMRAIQVA AVRN RDVSLSTYIRFKTAPSNSQDPNFL  
EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK  
EREENMEDDELERERRELARQRRRREVATAVIDRTTTASAVRATAHHR.

\*Los nucleótidos subrayados con rojo corresponden a las variaciones encontradas con respecto a la secuencia original reportada en geneDB.

## 8. Anexo 3

Alineamiento de las secuencias consenso para cada especie con la secuencia reportada en *Genedb*

```

L.braziliensis    MTEAGGSCGGNGVGGDDEAI THLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRH TIPSTT 60
L.panamensis     MTEAGGSCGGNGVGGDDEAI THLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRH TIPSTT 60
L.amazonensis    MTEAGGSCGGNGVGGDDEAI THLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRH TIPSTT 60
S.original       MTEAGGSCGGNGVGGDDEAI TRLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRH TIPSTT 60
*****:*****

L.braziliensis    HSPYGEKRPAYSFQGEAFLAALACGIALGCLGVI SDACARWVS AFRSGICANFFWLD RSL 120
L.panamensis     HSPYGEKRPAYSFQGEAFLAALACGIALGCLGVI SDACARWVS AFRSGICANFFWLD RSL 120
L.amazonensis    HSPYGEKRPAYSFQGEAFLAALACGIALGCLGVI SDACARWVS AFRSGICANFFWLD RSL 120
S.original       HSPYGEKRPAYSFQGEAFLAALACGIALGCLGVI SDACARWVS AFRSGICANFFWLD RSL 120
*****:*****

L.braziliensis    CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVAVFVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG 180
L.panamensis     CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVAVFVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG 180
L.amazonensis    CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVAVFVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG 180
S.original       CCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVAVFVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGG 180
*****:*****

L.braziliensis    IAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAF 240
L.panamensis     IAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAF 240
L.amazonensis    IAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAF 240
S.original       IAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAF 240
*****:*****

L.braziliensis    PSYQQETKERELITAGAGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL 300
L.panamensis     PSYQQETKERELITAGAGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL 300
L.amazonensis    PSYQQETKERELITAGAGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL 300
S.original       PSYQQETKERELITAGAGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL 300
*****:*****

L.braziliensis    FQSRVDLWHTGCIQVFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTF SVINLHICRW RKKH 360
L.panamensis     FQSRVDLWHTGCIQVFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTF SVINLHICRW RKKH 360
L.amazonensis    FQSRVDLWHTGCIQVFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTF SVINLHICRW RKKH 360
S.original       FQSRVDLWHTGCIQVFSINRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTF SVINLHICRW RKKH 360
*****:*****

L.braziliensis    VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSS IEMCEGSDVRAFFS 420
L.panamensis     VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSS IEMCEGSDVRAFFS 420
L.amazonensis    VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSS IEMCEGSDVRAFFS 420
S.original       VKQWRLAEVTVVAAITGVVNF LTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSS IEMCEGSDVRAFFS 420
*****:*****

L.braziliensis    LLVTATAKFAMFTYTVGTF LPA GILVPSLTI GALYGRAFGMMFRSLQET YAGSYIFTECY 480
L.panamensis     LLVTATAKFAMFTYTVGTF LPA GILVPSLTI GALYGRAFGMMFRSLQET YAGSYIFTECY 480
L.amazonensis    LLVTATAKFAMFTYTVGTF LPA GILVPSLTI GALYGRAFGMMFRSLQET YAGSYIFTECY 480
S.original       LLVTATAKFAMFTYTVGTF LPA GILVPSLTI GALYGRAFGMMFRSLQET YAGSYIFTECY 480
*****:*****

L.braziliensis    HQDLCVIPGVYAI V GAAAML TGVTHTTCLAI IMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA 540
L.panamensis     HQDLCVIPGVYAI V GAAAML TGVTHTTCLAI IMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA 540
L.amazonensis    HQDLCVIPGVYAI V GAAAML TGVTHTTCLAI IMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA 540
S.original       HQDLCVIPGVYAI V GAAAML TGVTHTTCLAI IMFELTGSLEYMVP IIVGILCAKAAGEA 540
*****:*****

L.braziliensis    VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVKYKKNQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM 600
L.panamensis     VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVKYKKNQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM 600
L.amazonensis    VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVKYKKNQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM 600
S.original       VGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVKYKKNQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM 600
*****:*****

```



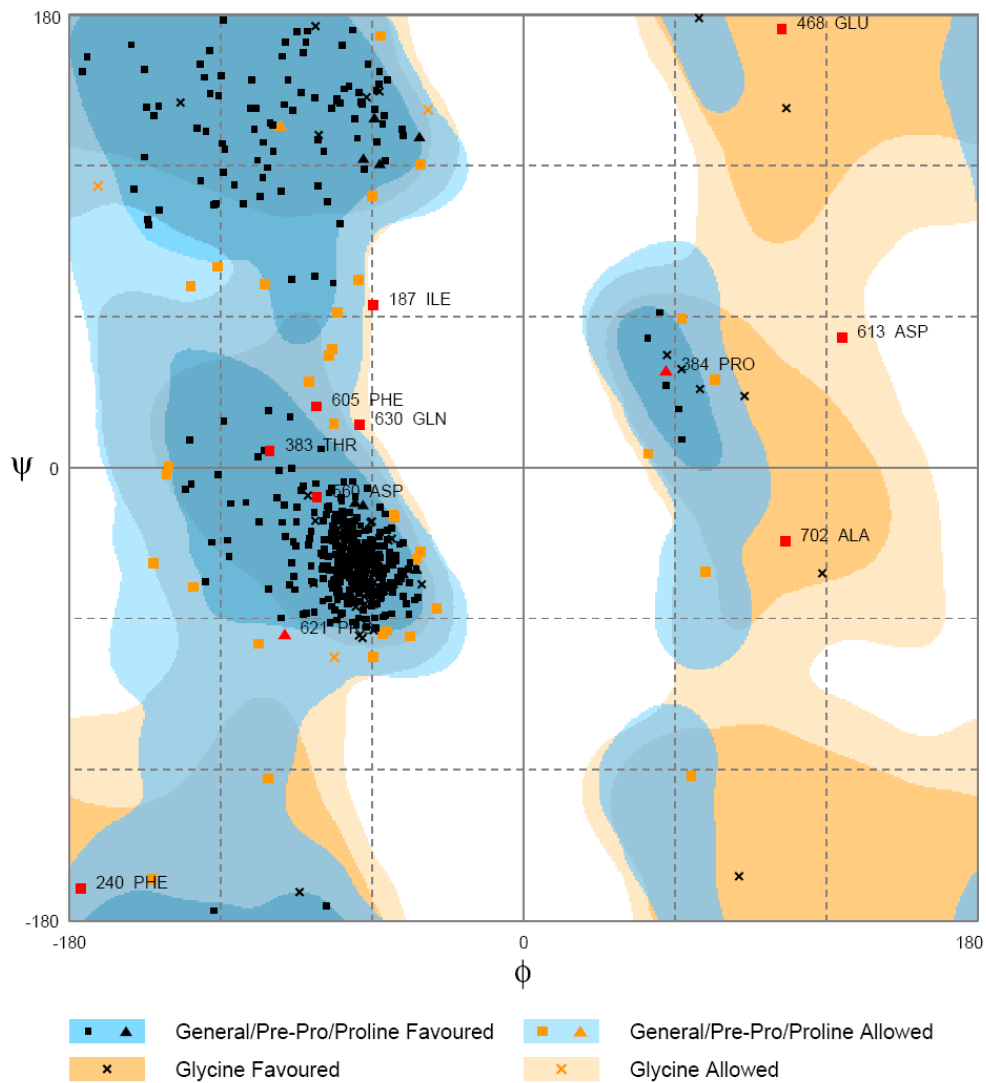
L.braziliensis NVTGFPVVESASDTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSYIRFKTAPSNSQDPNFL 660  
 L.panamensis NVTGFPVVESASDTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSYIRFKTAPSNSQDPNFL 660  
 L.amazonensis NVTGFPVVESASDTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSYIRFKTAPSNSQDPNFL 660  
 S.original NVTGFPVVESASDTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSYIRFKTAPSNSQDPNFL 660  
 \*\*\*\*\*

L.braziliensis EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK 720  
 L.panamensis EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK 720  
 L.amazonensis EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK 720  
 S.original EVNLTNVLESCLLQVEPECSVKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVK 720  
 \*\*\*\*\*

L.braziliensis EREENMEDDELERERRELARQRRREVATAVIDRRTTASAVRATAHHR 768  
 L.panamensis EREENMEDDELERERRELARQRRREVATAVIDRRTTASAVRATAHHR 768  
 L.amazonensis EREENMEDDELERERRELARQRRREVATAVIDRRTTASAVRATAHHR 768  
 S.original EREENMEDDELERERRELARQRRREVATAVIDRRTTASAVRATAHHR 768  
 \*\*\*\*\*

## 9. Anexo 4

Validación de la estructura modelada por el gráfico de Ramachandran [112]



Number of residues in favoured region (~98.0% expected)	: 479 (90.9%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected)	: 37 (7.0%)
Number of residues in outlier region	: 11 (2.1%)

## 10. Bibliografía

- 1 Alvar J, Yactayo S, Bern C: Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006;22:552-557.
- 2 Sistema de Vigilancia en Salud Pública. Archivo Informes Finales de la vigilancia de eventos de interés en salud pública por evento: Boletín epidemiológico; Instituto Nacional de Salud Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, 2010.
- 3 Sundar S, Rai M: Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:951-958.
- 4 Docampo R: New and re-emerging diseases: a dedication to Norman D. Levine. *Parasitol Today* 2000;16:316-317.
- 5 Accardi A, Walden M, Nguitragool W, Jayaram H, Williams C, Miller C: Separate ion pathways in a Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Gen Physiol* 2005;126:563-570.
- 6 Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA: Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002;82:503-568.
- 7 Lagos ML, Moran O, Camacho M: *Leishmania amazonensis*: Anionic currents expressed in oocytes upon microinjection of mRNA from the parasite. *Exp Parasitol* 2007;116:163-170.
- 8 Marchesini N, Docampo R: A plasma membrane P-type H<sup>(+)</sup>-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;119:225-236.
- 9 Richards AG: The ultrastructure of the midgut of hematophagous insects. *Acta Trop* 1975;32:83-95.
- 10 Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S: Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase activity, counterion conductance, and H<sup>+</sup> "leak". *J Biol Chem* 1991;266:24540-24548.
- 11 Lloyd JB: Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;41:189-200.
- 12 Vieira L, Cabantchik ZI: Bicarbonate ions and pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *FEBS Lett* 1995;361:123-126.
- 13 Vieira LL, Cabantchik ZI: Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H<sup>(+)</sup>-pump generated membrane potential. *Mol Biochem Parasitol* 1995;75:15-23.

- 14 Zilberstein D, Shapira M: The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:449-470.
- 15 Organización Panamericana de la Salud: 2007.
- 16 World Health Organization: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis; Genova, 2010.
- 17 World Health Organization: Essential leishmaniasis maps. [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/).
- 18 Velez I, Hendrick E, Robledo S, Agudelo S: Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cadernos de Saúde Pública* 2001;17:171-180.
- 19 Desjeux P: Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clin Dermatol* 1999;17:317-325.
- 20 Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH: Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:111-126.
- 21 Grogl M, Thomason TN, Franke ED: Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:117-126.
- 22 Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB, Lawyer PG, Were JB, Reed SG, Panisko DM, Limmer BL: Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:464-480.
- 23 Ouellette M: Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health* 2001;6:874-882.
- 24 Botero D, Restrepo M: Leishmaniasis; in Corporación para Investigaciones Biológicas, (ed): *Parasitosis Humanas*. 2006, pp 238-261.
- 25 Herwaldt BL: Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354:1191-1199.
- 26 Instituto Nacional de Salud: Boletín Epidemiológico Semanal (semana 40); 2011.
- 27 Gossage SM, Rogers ME, Bates PA: Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 2003;33:1027-1034.
- 28 Vannier-Santos MA, Martiny A, De SW: Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des* 2002;8:297-318.
- 29 Handman E, Bullen DV: Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 2002;18:332-334.

- 30 Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC: Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007;37:1063-1075.
- 31 Sacks D, Noben-Trauth N: The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002;2:845-858.
- 32 Rochette A, Raymond F, Ubeda JM, Smith M, Messier N, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B: Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics* 2008;9:255.
- 33 Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M: Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007;39:839-847.
- 34 Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W: The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 2001;48:1-56.
- 35 Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE: Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:525241.
- 36 Graham SV: Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol Today* 1995;11:217-223.
- 37 Vanhamme L, Pays E: Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 1995;59:223-240.
- 38 Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL: Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9155-9159.
- 39 Descoteaux A, Turco SJ: Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455:341-352.
- 40 Desjardins M, Descoteaux A: Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1997;185:2061-2068.
- 41 McConville MJ, Blackwell JM: Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 1991;266:15170-15179.

- 42 Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E: Leishmania major proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect* 1999;1:589-599.
- 43 Contreras I, Gomez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M: Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001148.
- 44 Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY: Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 1995;25:745-750.
- 45 Snapp EL, Landfear SM: Characterization of a targeting motif for a flagellar membrane protein in *Leishmania enriettii*. *J Biol Chem* 1999;274:29543-29548.
- 46 Burchmore RJ, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, Modi G, Sacks D, Landfear SM: Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3901-3906.
- 47 Drew ME, Langford CK, Klamo EM, Russell DG, Kavanaugh MP, Landfear SM: Functional expression of a myo-inositol/H<sup>+</sup> symporter from *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biol* 1995;15:5508-5515.
- 48 Beck JT, Ullman B: Biopterin conversion to reduced folates by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1991;49:21-28.
- 49 Landfear SM: Genetics and biochemistry of *Leishmania* membrane transporters. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:417-421.
- 50 Boron WF, Boulpaep EL: Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral. *J Gen Physiol* 1983;81:53-94.
- 51 Boron WF, Boulpaep EL: Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Na-H exchange. *J Gen Physiol* 1983;81:29-52.
- 52 L'Allemain G, Paris S, Pouyssegur J: Role of a Na<sup>+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Exchange in Regulation of Intracellular pH in Fibroblasts. *J Biol Chem* 1985;260:4877-4883.
- 53 Vieira LL, Lafuente E, Gamarro F, Cabantchik Z: An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem J* 1996;319 ( Pt 3):691-697.
- 54 Vieira LL: pH and volume homeostasis in trypanosomatids: current views and perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1998;1376:221-241.

- 55 Glaser TA, Baatz JE, Kreishman GP, Mukkada AJ: pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7602-7606.
- 56 Bakker-Grunwald T: Ion transport in parasitic protozoa. *J Exp Biol* 1992;172:311-322.
- 57 Landfear SM: Genetics and biochemistry of *Leishmania* membrane transporters. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:417-421.
- 58 Zilberstein D, Dwyer DM: Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:1716-1720.
- 59 Vanderheyden N, Wong J, Docampo R: A pyruvate-proton symport and an H<sup>+</sup>-ATPase regulate the intracellular pH of *Trypanosoma brucei* at different stages of its life cycle. *Biochem J* 2000;346 Pt 1:53-62.
- 60 Zilberstein D, Philosoph H, Gepstein A: Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 1989;36:109-117.
- 61 Lynn MA, McMaster WR: *Leishmania*: conserved evolution--diverse diseases. *Trends Parasitol* 2008;24:103-105.
- 62 Zilberstein D, Blumenfeld N, Liveanu V, Gepstein A, Jaffe CL: Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45:175-178.
- 63 Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N: The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 1998;6:392-401.
- 64 Leslie G, Barrett M, Burchmore R: *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. *Exp Parasitol* 2002;102:117-120.
- 65 Lefurgey A, Gannon M, Blum J, Ingram P: *Leishmania donovani* amastigotes mobilize organic and inorganic osmolytes during regulatory volume decrease. *J Eukaryot Microbiol* 2005;52:277-289.
- 66 Lefurgey A, Ingram P, Blum JJ: Compartmental responses to acute osmotic stress in *Leishmania major* result in rapid loss of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;128:385-394.
- 67 Burrows C, Blum JJ: Effect of hyper-osmotic stress on alanine content of *Leishmania major* promastigotes. *J Protozool* 1991;38:47-52.
- 68 Vieira LL, Lafuente E, Blum J, Cabantchik ZI: Modulation of the swelling-activated amino acid channel of *Leishmania major* promastigotes by protein kinases. *Mol Biochem Parasitol* 1997;90:449-461.

- 69 Vieira L, Slotki I, Cabantchik ZI: Chloride conductive pathways which support electrogenic H<sup>+</sup> pumping by *Leishmania* major promastigotes. *J Biol Chem* 1995;270:5299-5304.
- 70 DiFranco M, Villarroel A, Ponte-Sucre A, Quinonez M, Drujan D, Dagger F: Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *Leishmania mexicana* into planar bilayers. *Acta Cient Venez* 1995;46:206-207.
- 71 Darling TN, Burrows CM, Blum JJ: Rapid shape change and release of ninhydrin-positive substances by *Leishmania* major promastigotes in response to hypo-osmotic stress. *J Protozool* 1990;37:493-499.
- 72 Foskett JK: CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu Rev Physiol* 1998;60:689-717.
- 73 Accardi A, Picollo A: CLC channels and transporters: proteins with borderline personalities. *Biochim Biophys Acta* 2010;1798:1457-1464.
- 74 Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H: The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch* 1999;437:783-795.
- 75 Corringer PJ, Baaden M, Bocquet N, Delarue M, Dufresne V, Nury H, Prevost M, Van RC: Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *J Physiol* 2010;588:565-572.
- 76 Sarto-Jackson I, Sieghart W: Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol* 2008;25:302-310.
- 77 Florez J: *Farmacología Humana*. ed 3, Barcelona, 1998.
- 78 Sheppard DN, Welsh MJ: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999;79:S23-S45.
- 79 Estevez R, Jentsch TJ: CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* 2002;12:531-539.
- 80 Jentsch TJ, Neagoe I, Scheel O: CLC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:319-325.
- 81 Jentsch TJ: CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2008;43:3-36.
- 82 Miller C: Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1982;299:401-411.
- 83 Bauer CK, Steinmeyer K, Schwarz JR, Jentsch TJ: Completely functional double-barreled chloride channel expressed from a single *Torpedo* cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11052-11056.



- 84 Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R: X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 2002;415:287-294.
- 85 Accardi A, Miller C: Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature* 2004;427:803-807.
- 86 Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R: Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. *Science* 2003;300:108-112.
- 87 Lobet S, Dutzler R: Ion-binding properties of the CIC chloride selectivity filter. *EMBO J* 2006;25:24-33.
- 88 Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, MacKinnon R: Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* 2010;330:635-641.
- 89 Miller C, Nguitragool W: A provisional transport mechanism for a chloride channel-type Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:175-180.
- 90 Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- 91 Chomczynski P, Sacchi N: The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1:581-585.
- 92 Simms D, Cizdziel P: TRIzol™: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* 1993;15:99-102.
- 93 Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW: Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* 2010;2010:db.
- 94 Sambrook J, Russell D: *Molecular cloning: a laboratory manual*. ed 3, New York, 2001.
- 95 Farrel R: cDNA synthesis; in Academic Press, (ed): *RNA Methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization*. 2009, pp 368-384.
- 96 Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC: Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004;33:95-103.
- 97 Hall AT: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series No 41* 1999;95-98.
- 98 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-410.

- 99 Jean-Michel Claverie, edric Notredame: Bioinformatics for Dummies. ed 2nd Edition, New York, Wiley Publishing, Inc., 2007.
- 100 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-4882.
- 101 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596-1599.
- 102 Rost B, Casadio R, Fariselli P, Sander C: Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci* 1995;4:521-533.
- 103 Rost B, Fariselli P, Casadio R: Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* 1996;5:1704-1718.
- 104 Rost B, Yachdav G, Liu J: The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 2004;32:W321-W326.
- 105 Claros MG, von HG: TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* 1994;10:685-686.
- 106 Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;157:105-132.
- 107 Tusnady GE, Simon I: Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* 1998;283:489-506.
- 108 Tusnady GE, Simon I: The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 2001;17:849-850.
- 109 Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K: WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 2007;35:W585-W587.
- 110 Kelley LA, Sternberg MJ: Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 2009;4:363-371.
- 111 Guex N, Peitsch MC: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714-2723.
- 112 Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, III, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC: Structure validation by C $\alpha$  geometry: phi,psi and C $\beta$  deviation. *Proteins* 2003;50:437-450.
- 113 Holm L, Sander C: Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci* 1995;20:478-480.

- 114 Holm L, Sander C: Dali/FSSP classification of three-dimensional protein folds. *Nucleic Acids Res* 1997;25:231-234.
- 115 Orengo CA, Taylor WR: SSAP: sequential structure alignment program for protein structure comparison. *Methods Enzymol* 1996;266:617-635.
- 116 Walker JM: The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994;32:5-8.
- 117 Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988;175:231-237.
- 118 Stott DI: Immunoblotting, dot-blotting, and ELISPOT assays: methods and applications. *J Immunoassay* 2000;21:273-296.
- 119 Walker JM: *The Protein Protocols Handbook*. ed Second edition, New Jersey, 2002.
- 120 Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992;24:145-149.
- 121 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85-100.
- 122 Gandhi R, Elble RC, Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM, Pauli BU: Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J Biol Chem* 1998;273:32096-32101.
- 123 Zilberstein D, Dwyer DM: Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem J* 1988;256:13-21.
- 124 Zilberstein D, Gepstein A: Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:197-205.
- 125 Vieira L, Lavan A, Dagger F, Cabantchik ZI: The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *J Biol Chem* 1994;269:16254-16259.
- 126 Ponte-Sucre A, Campos Y, Fernandez M, Moll H, Mendoza-Leon A: *Leishmania* sp.: growth and survival are impaired by ion channel blockers. *Exp Parasitol* 1998;88:11-19.
- 127 Brodin TN, Heath S, Sacks DL: Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of *Leishmania major* promastigotes encode a potential basic-zipper structural motif. *Mol Biochem Parasitol* 1992;52:241-250.

- 128 Coulson RM, Smith DF: Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;40:63-75.
- 129 Nourbakhsh F, Uliana SR, Smith DF: Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;76:201-213.
- 130 Morales NM, Roberts JF: A comparative study of the ribonucleic acids of three species of trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol B* 1978;59:1-4.
- 131 Vedel M, Robert-Gero M: Characterization of RNA from *Leishmania tropica* and *Leishmania d.donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1987;24:81-87.
- 132 Kozak Marilyn: Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;8301-8305.
- 133 Kozak Marilyn: Structural Features in Eukaryotic mRNAs That Modulate the Initiation of Translation. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;266:19867-19870.
- 134 Simpson JR: *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. 2003.
- 135 Zhao Z, Li X, Hao J, Winston JH, Weinman SA: The CIC-3 chloride transport protein traffics through the plasma membrane via interaction of an N-terminal dileucine cluster with clathrin. *J Biol Chem* 2007;282:29022-29031.
- 136 Froger A, Hall JE: Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp* 2007;253.
- 137 Chen C, Okayama H: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987;7:2745-2752.
- 138 Grundemann D, Schomig E: Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques* 1996;21:898-903.
- 139 Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF: Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 2004;136:51-62.
- 140 Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B: Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem* 2004;279:23668-23678.
- 141 Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonca-Lima L, Gonzalez LJ, Betancourt L, Grimaldi G, Jr., Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E: Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol* 2007;154:6-21.

- 142 Etges R, Bouvier J, Bordier C: The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 1986;261:9098-9101.
- 143 Requena JM, Alonso C, Soto M: Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 2000;16:246-250.
- 144 Saitou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
- 145 Brandt S, Jentsch TJ: CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett* 1995;377:15-20.
- 146 Jentsch TJ, Gunther W, Pusch M, Schwappach B: Properties of voltage-gated chloride channels of the CIC gene family. *J Physiol* 1995;482:19S-25S.
- 147 Mummery JL, Killey J, Linsdell P: Expression of the chloride channel CLC-K in human airway epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:1123-1128.
- 148 Oshima T, Ikeda K, Furukawa M, Suzuki H, Takasaka T: Expression of the voltage-dependent chloride channel CIC-3 in human nasal tissue. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:82-86.
- 149 Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bosl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, Jentsch TJ: Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 2001;29:185-196.
- 150 Hara-Chikuma M, Yang B, Sonawane ND, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS: CIC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem* 2005;280:1241-1247.
- 151 Jin NG, Kim JK, Yang DK, Cho SJ, Kim JM, Koh EJ, Jung HC, So I, Kim KW: Fundamental role of CIC-3 in volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel function and cell volume regulation in AGS cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G938-G948.
- 152 Matsuda JJ, Filali MS, Volk KA, Collins MM, Moreland JG, Lamb FS: Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C251-C262.
- 153 Rost B, Sander C: Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 1993;232:584-599.
- 154 Baker D, Sali A: Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 2001;294:93-96.
- 155 Chothia C, Lesk AM: The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* 1986;5:823-826.

- 156 Reva BA, Finkelstein AV, Skolnick J: What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å? *Fold Des* 1998;3:141-147.
- 157 Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
- 158 Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM: Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 1996;24:596-601.
- 159 Preuss AK, Connor JA, Vogel H: Transient transfection induces different intracellular calcium signaling in CHO K1 versus HEK 293 cells. *Cytotechnology* 2000;33:139-145.
- 160 Varghese A, Tenbroek EM, Coles J, Jr., Sigg DC: Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:26-37.
- 161 Avila G, Sandoval A, Felix R: Intramembrane charge movement associated with endogenous K<sup>+</sup> channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:317-330.
- 162 Zhu G, Zhang Y, Xu H, Jiang C: Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *J Neurosci Methods* 1998;81:73-83.
- 163 Camacho M, Forero ME, Fajardo C, Nino A, Morales P, Campos H: *Leishmania amazonensis* infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by altering their outward potassium currents. *Exp Parasitol* 2008;120:50-56.
- 164 Forero ME, Marin M, Corrales A, Llano I, Moreno H, Camacho M: *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. *J Membr Biol* 1999;170:173-180.
- 165 Quintana E, Torres Y, Alvarez C, Rojas A, Forero ME, Camacho M: Changes in macrophage membrane properties during early *Leishmania amazonensis* infection differ from those observed during established infection and are partially explained by phagocytosis. *Exp Parasitol* 2010;124:258-264.
- 166 Lueck JD, Mankodi A, Swanson MS, Thornton CA, Dirksen RT: Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy. *J Gen Physiol* 2007;129:79-94.
- 167 Miller FJ, Jr., Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS: Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res* 2007;101:663-671.

- 168 Li X, Wang T, Zhao Z, Weinman SA: The ClC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1483-C1491.
- 169 Moreland JG, Davis AP, Bailey G, Nauseef WM, Lamb FS: Anion channels, including ClC-3, are required for normal neutrophil oxidative function, phagocytosis, and transendothelial migration. *J Biol Chem* 2006;281:12277-12288.
- 170 Wulff H: New light on the "old" chloride channel blocker DIDS. *ACS Chem Biol* 2008;3:399-401.
- 171 Echeverry A, Camacho M, Posada M: Generación de un vector de clonación que contenga mutaciones puntuales en un canal de cloruro tipo ClC de *Leishmania braziliensis*.; 2011.
- 172 Carreño M, Camacho M, Posada M: Estudio de la expresión génica de dos canales putativos de cloruro en amastigotes de *Leishmania braziliensis*; 2010.