



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*

Marvin Estivent Carreño García

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Ciudad Bogotá, Colombia

2014

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis*.

Marvin Estivent Carreño García

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:

MD, PhD. María Marcela Camacho Navarro

Línea de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos Protozoarios

Grupo de Investigación:

Biofísica y Biología de Membranas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia

2014

Sarita alegría de mi vida.

A mi padre quien siempre fue una persona imbatible ante cualquier dificultad de la vida, siendo un ejemplo a seguir ... por ver la luz cuando todo era oscuridad.

Agradecimientos

A Dios quien me ha permitido vivir y ha tomado el control de mi vida permitiéndome desarrollarme en este campo

A la Doctora María Marcela Camacho, por acogerme en su grupo de investigación y por demostrarme como debe ser la actitud de una persona integral dedicada a la labor científica

A Martha Lucía Posada por enseñarme con dedicación muchas de las técnicas del laboratorio y por escucharme cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros del grupo de investigación en biofísica y biología de membranas por todos sus aportes a mi desarrollo personal y académico durante esta maestría, especialmente a Yenny Lozano, Oscar Parada, Nicolás Quintero, Ivette Heredia, Michel García, Aura Echeverri, Lina García, Carolina Ochoa, Iván Navarrete, Abelino Vargas, Cristina Zapata, July Buitrago de quienes he aprendido bastante y compartido momentos felices.

A mi esposa y a mi hija por tolerar mi ausencia en jornadas largas de trabajo y brindarme alegría en momentos difíciles.

X

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

Resumen

Leishmania es un parásito que genera enfermedades en mamíferos incluyendo humanos conocidas como Leishmaniosis, las cuales pueden llegar a ser fatales y representan un problema de salud pública en Colombia. Durante su ciclo de vida el parásito habita en dos hospederos, el primero es un díptero, donde el parásito está expuesto a pH de 7,0-9,0, temperatura de 25°C y osmolaridad > 300 mOsm; el otro hospedero son células mononucleares mamíferas. En éstas habita un compartimiento intracelular (vacuola parasitófora) y experimenta pH ácido 4,5 -5,0, temperatura de ~35-37°C y osmolaridad sugerida de 150 – 250 mOsm. Debido a este cambio de condiciones el parásito pasa de ser promastigote flagelado en el insecto, a amastigote aflagelado en el mamífero manteniendo pH intracelular cercano a neutro, por la alta capacidad tampón de su citoplasma. Esta habilidad de regular pH está relacionada con la función de una bomba protón ATPasa cuya actividad depende de canales de aniónicos. El Grupo de Biofísica y Biología de Membranas registró corrientes de cloruro en ovocitos de *Xenopus laevis* tras la inyección de ARNm de *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis*. Estas corrientes podrían ser el resultado de la actividad de canales/intercambiadores CLC. Por tanto se buscaron canales de cloruro en el genoma de *L. braziliensis*, encontrándose cuatro genes putativos *Lbrm01_v2.0210* (*LbCLC_A*), *Lbrm32v2.3670* (*LbCLC_B*), *Lbrm33_v2.1260* (*LbCLC_C*) y *Lbrm04_v2.1010* (*LbCLC_D*). Las 4 secuencias encontradas codificarían proteínas CLC. *LbCLC_A*, *LbCLC_B* y *LbCLC_C* se transcriben en promastigotes y amastigotes axéncios. En este trabajo se propuso confirmar los hallazgos de transcripción de estos genes en los estadios mencionados y ampliarla mediante la determinación de la expresión de estos CLC durante el ciclo *in vitro* del parásito. Así mismo cuantificar su expresión génica a nivel de ARNm por RTqPCR absoluta. Para esto se estableció la infección de una línea celular de macrófagos de ratón con *L. braziliensis* y se siguió a diferentes tiempos. Se obtuvo ARN total que sirvió de plantilla para la síntesis de ADNc que fue amplificado con *primers* específicos diseñados para cada uno de los genes. Se confirmó la transcripción de *LbCLC_A*, *LbCLC_B* y *LbCLC_C* en promastigotes y amastigotes axéncios así como se reporta por primera vez la transcripción en tiempos tempranos post-infección y amastigotes *in situ*. Para *LbCLC_D* no se detectaron transcritos en promastigote en estado estacionario cultivado *in vitro* pero sí en tiempos tempranos post-infección y amastigotes *in situ* indicando regulación diferencial de este gen en estadios diferentes de *Leishmania*. A partir de ADNc de promastigote se clonaron productos de ~200 nt de *LbCLC_A*, *LbCLC_B* y *LbCLC_C* para PCR en tiempo real. Se lograron curvas estándar de cuantificación para *LbCLC_A* y *LbCLC_C*, dando como resultado que la expresión de estos genes es mayor durante la primera hora post-infección. En este tiempo el parásito en estadio promastigote estacionario es

enfrentando a cambios drásticos de pH, temperatura y quizás osmolaridad que parecen disparar la transcripción de estos dos genes y podrían ser importantes para el proceso de transformación de promastigote a amastigote.

Palabras clave: ARNm, amastigotes, promastigotes, expresión génica, canal de cloruro/intercambiador CLC, PCR, RTqPCR.

Abstract

Leishmania is a parasite that generates in mammals a disease known as Leishmaniasis, that has the capability of being fatal and represent a problem of public health in Colombia. Across his life cycle the parasite inhabits in two different hosts the first one, a dipteran where it lives in a pH condition of 7,0-9,0, temperature of 25°C and osmolarity of >300 mosm, the other host are mammal mononuclear cells, there it lives in inside a phagolysosomal compartment (parasitophorus vacuole), with a pH ranged from (4,0 – 5,0), temperatures of ~37°C and an osmolarity of 150 – 250 mOsm, because of this environment change the parasite transform from a flagellated promastigote in the insect, to an aflagellated amastigote in the mammal, maintaining its intracellular pH near to the physiological, because a remarkable buffer capacity of its cytoplasm. This capacity of regulating pH is related with a proton ATP pump whose activity is dependent of anionic channels. Our group of Biofísica y Biología de Membranas has measured chloride currents in oocytes of *Xenopus laevis* after the injection of mRNA of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* promastigotes. These currents could be the result channel / exchangers CLC activity. Thus, we searched for chloride channels in the genome of *L. braziliensis*, founding four putative genes *Lbrm01_v2.0210* (*LbCLC_A*), *Lbrm32v2.3670* (*LbCLC_B*), *Lbrm33_v2.1260* (*LbCLC_C*) y *Lbrm04_v2.1010* (*LbCLC_D*). All of them appear to codify for CLC proteins. *LbCLC_A*, *LbCLC_B* and *LbCLC_C* are transcribed in promastigotes and axenic amastigotes. In this study it was proposed to confirm the previous findings about transcription of these genes in the mentioned stages and go deeper in the knowledge by determination of the expression of these CLC during the *in vitro* life cycle of the parasite. Also to quantify their gene expression at mRNA level by absolute RTqPCR. For this purpose the infection of a murine macrophage cellular line with *L.braziliensis* at different infection times was established. Total RNA was purified and used as template for cDNA synthesis. Fragments of the genes of interest were amplified with specific primers designed for each one of the genes. The transcription of *LbCLC_A*, *LbCLC_B* y *LbCLC_C* in promastigotes and axenic amastigotes was confirmed as well as seen for the first time in early post-infection times and *in situ* amastigotes. For *LbCLC_D*

there were not transcripts detected in promastigotes in stationary stage cultured *in vitro* in contrast to early post-infection times and *in situ* amastigotes where the gene is expressed, indicating differential regulation of this gene in the different *Leishmania* stages. From cDNA of promastigotes fragments of ~200 nt from *LbCLC_A*, *LbCLC_B* y *LbCLC_C* were cloned for RTqPCR. Standard curves for *LbCLC_A* y *LbCLC_C*, were obtained and the quantification shows that expression of these genes is higher in the first hour post-infection. At this time the parasite is in the promastigote stationary stage and challenged with drastic changes in pH, temperature and maybe osmolarity that appears to trigger the transcription of these two genes that could be important in the process of transformation from promastigote to amastigote.

Keywords: mRNA, amastigotes, promastigotes, genic expression, chloride channel/exchanger CLC, PCR, RTqPCR.

Cultivo *in vitro* de *Leishmania braziliensis* y extracción de ARN total.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
Objetivos.....	10
Metodología	11
1. Capítulo 1	19
1.1 Cultivo in vitro de <i>Leishmania braziliensis</i> y extracción de ARN total.	19
1.2 Estandarización de la PCR para amplificación de productos de interés.	20
2.3 Expresión de la familia CLC de <i>Leishmania</i>	22
2. Capítulo 2	29
3. Capítulo 3	35
4. Conclusiones y Recomendaciones	41
Anexos	43
Bibliografía	50

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	2
Figura 2: Gel de electroforesis ADN Genómico extraído de promastigotes <i>Leishmania braziliensis</i> metacíclicos.	14
Figura 3: Mapa de los vectores de clonación.....	16
Figura 4: Cultivos celulares.....	21
Figura 5: Gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X diluido en H ₂ O DEPC, mostrando ARN total de los distintos tratamientos experimentales utilizados.....	20
Figura 6: Estandarización de las condiciones de anillamiento para PCR de los primers que amplifican las secuencias <i>LbCLCA2</i> , <i>LbCLCB2</i> , <i>LbCLCC2</i> , <i>LbCLCD2</i>	21
Figura 7: Amplificación y análisis del gen <i>LbCICA</i> . Amplificación con un producto esperado de 950 pb correspondiente a los primers de la secuencia <i>LbCLCA1</i>	22
Figura 8: RT PCR que comprueban la expresión de los genes <i>LbCICB</i> , <i>LbCICC</i> y <i>LbCICD</i> ..	25
Figura 9: RT PCR con <i>primers LbCLCD3</i> en promastigotes y amastigotes in situ.....	26
Figura 10: Clonación de la secuencia <i>LbCICA</i> en el vector de clonación Clon – Jet.....	29
Figura 11: PCR usando como plantilla el plásmido extraído de la colonia 4 correspondiente al <i>LbCLCA</i>	30
Figura 12: Clonación de la secuencia <i>LbCLCB.2</i> en el vector de clonación Clon Jet.	30
Figura 13: Clonación de la secuencia <i>LbCLCC</i> en el vector de clonación p-GEM T Easy. ..	31
Figura 14: Alineamientos de las secuencias de los plásmidos obtenidos.....	33
Figura 15: Elaboración de Curva de Calibración para secuencia <i>LbCLCA.2</i>	36
Figura 16: Curva de calibración de la secuencia <i>LbCLCC.2</i>	36
Figura 17: . Niveles de expresión del canal putativo <i>LbCLCA</i> en número de copias iniciales ARNm por μ L con tres experimentos independientes por punto experimental.	37
Figura 18: Niveles de expresión del canal putativo <i>LbCLCC</i> en número de copias iniciales por tres réplicas Biológicas.	38
Figura 19: Calibración de primers <i>LbCLCD3</i> y <i>LbCLCD4</i>	43
Figura 20: Amplificación desde plásmido con inserto <i>LbCLCD3</i> . 1. Digestión con BamHI del plásmido con inserto <i>LbCLCD3</i> la cual no fue exitosa.	44
Figura 21: Secuencia <i>LbCLCA2</i> obtenida en ADN plasmídico.....	45
Figura 22: Secuencia <i>LbCLCB2</i> obtenida en ADN plasmídico.....	46
Figura 23: Secuencia <i>LbCLCC2</i> obtenida en ADN plasmídico.....	47
Figura 24: Secuencia <i>LbCLCD3</i> obtenida en ADN plasmídico, donde no se obtuvo el producto deseado... ..	48

Figura 25:	S Curva de calibración $LbCLC_B$	49
-------------------	--	----

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: <i>Primers</i> Utilizados en el presente estudio.	14
Tabla 2: Mezcla para realizar PCR con el kit Axygen Taq Polimerasa.....	15
Tabla 3: Cuantificación por densitometría del amplicón LbCLCA.3 correspondiente a cada tratamiento usando el software ImageJ.....	24
Tabla 4: Cuantificación del amplicón de cada tratamiento y gen por densitometría, usando el software ImageJ.	27
Tabla 5: Resumen de resultados de expresión génica de los cuatro genes estudiados....	42
Tabla 6: <i>Primers</i> para amplificar un fragmento del gen <i>LbCLC_D</i>	43

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
C°	Grados Celcius
Cl ⁻	Anión Cloruro
CLC	Canal/intercambiador de Cloruro
Cl ⁻	Anión Cloruro
CO ₂	Dióxido de Carbono
	Sal disódica ácida 4,4'-
DIDS	Diisotiocianato-2,2'- estilbenedisulfonica
X g	Gravedades
H ⁺	Hidrogenión
H ⁺ ATPasa	Bomba de transporte de protones
H ₂ O	Agua
iTRAQ	Taq isobárico para cuantificación de proteínas.
J774 A1	Línea celular de Macrófagos
mOsm	Mili osmolar
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa.
qPCR	PCR cuantitativa.
TSH	Tripanotiona
RT PCR	PCR de transcripción reversa
RTq PCR	PCR reversa en tiempo real
UTR	Región no Traducible
μL	Micro Litro.
μg	Micro gramo.

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

ADN	Ácido Deoxiribunucleico
ADNc	AND complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN Mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
BLAST	Herramienta de Alineamiento local básico.
cm	Centímetro
CPG	Conjunto Policistrónico de Genes
DEPC	Diétil pirocarbonato
h	Hora
hpi	Hora post-infección
mL	Mililitros
mM	Mili molar
nm	nanmetro
μ M	Micro molar

Introducción

Leishmaniosis son un conjunto de enfermedades parasitarias causadas por protozoarios de la familia Trypanosomatidae y el género *Leishmania*, que genera en humanos tres manifestaciones clínicas principales, Leishmaniosis cutánea, mucocutánea y visceral, que han sido a pesar de la existencia de varios tipos de medicamentos y tratamientos, consideradas enfermedades olvidadas, debido a programas de control ineficientes (Murray *et al.* 2005). En parte el problema se debe a que los medicamentos y tratamientos existentes para enfermedad son costosos para la población afectada que en general se caracteriza por tener altos índices de pobreza (Boelaert *et al.* 2010).

Esta enfermedad está distribuida en países del área tropical y subtropical donde afecta a 2 millones de personas al año con una población en riesgo de 350 millones de personas (WHO 2010). En Colombia estas enfermedades representan un problema de salud pública donde se estima que existen más de 10 millones de personas en riesgo; en el año 2014 se han registrado cerca de 9428 casos donde 98,5% corresponde a Leishmaniosis cutánea, 1,3% a mucocutánea y solo 0,3% a visceral (INS 2014). Por otro lado *Leishmania* ha generado mecanismos de resistencia a los fármacos más ampliamente usados para su tratamiento, antimonio pentavalente y anfotericina B mediante mecanismos de resistencia que involucran el péptido exclusivo de kinetoplastos TSH (Tripanotona), el cual es una forma inusual de glutatona con acción antioxidante que funciona como donador de electrones para reducir especies oxidantes (Fairlamb y Cerami 1992), formando complejos TSH-(Sb) que favorecen el transporte activo intracelular por transportadores ABC, secuestrando el antimonio en vesículas cerca del flagelo, e inhibiendo la acción del metal (Ouellette 2001), mecanismos que han generado el interés por el conocimiento de la fisiología del parásito. Progresivamente las terapias clásicas están siendo reemplazadas por otro tipo de fármacos y terapias que no son suficientes para tratar la enfermedad, pues la efectividad de los tratamientos en el paciente varían dependiendo del tipo de leishmaniosis existente, el lugar geográfico de la infección y el órgano que este siendo más afectado por la enfermedad, además de que no existe aún una vacuna efectiva para la enfermedad (Coft y Combs 2003).

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

Otro aspecto relevante de estudiar de la bioquímica de moléculas implicadas en la fisiología del parásito, es comprender cómo el parásito se adapta a las condiciones físico-químicas de su ciclo de vida, el cual transcurre en dos hospederos con condiciones químicas distintas (Fig. 1). Primero un mosquito flebótomo donde reside dentro de su intestino medio, con un ambiente neutro - básico con pH alrededor de 7,00 – 9,00, temperatura cercana a 25°C y osmolaridad >300 mOsm (LeFurgey *et al.* 2005); allí es primero promastigote procíclico, proliferativo altamente móvil y flagelado, cuando pasa a la probólide del mosquito el parásito se transforma en promastigote metacíclico el cual no es proliferativo pero si altamente infectivo. Segundo, cuando el mosquito pica al hospedero mamífero, que puede tratarse de un ser humano, introduce el parásito, donde posteriormente es fagocitado por células del sistema inmune innato neutrófilos y macrófagos, donde es confinado en una vacuola parasitófora, con condiciones ácidas, pH 4,5 -5,0 (Antoine *et al.* 1990), temperaturas de 35-37°C y osmolaridad predicha de 150 y 250 mOsm (LeFurgey *et al.* 2005), señales que inducen una transformación drástica en *Leishmania* definida básicamente por contracción del flagelo y activación de la división celular, etapa conocida como amastigote.

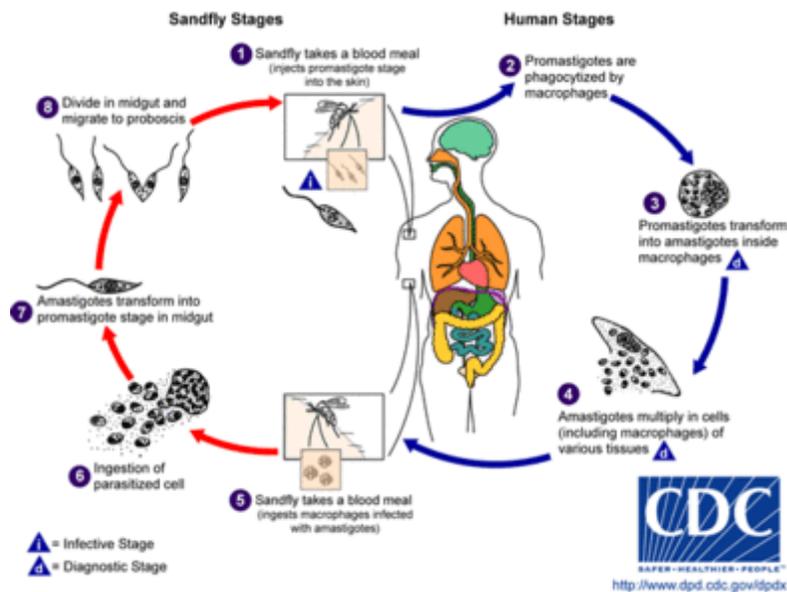


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. Tomado de (CDC 2012).

En las condiciones de la vacuola parasitófora *Leishmania* incrementa su capacidad tampón, que a pesar de estar en un gradiente favorable a la entrada de protones a la célula por la acidez del fagolisosoma, el citoplasma del parásito no se acidifica, permaneciendo alrededor de pH 7,0. Este mecanismo depende de la acción de una H⁺ATPasa tipo P, que al ser inhibida trunca la capacidad de la célula por mantenerse en pH neutro y es dependiente de la presencia de cloruro (Marchesini y Docampo, 2002), estos experimentos se complementan con los de Vieira et al. 1995, donde la capacidad de regular pH intracelular se pierde al inhibir las células con DIDS, un inhibidor específico para transportadores aniónicos, sugiriendo la necesidad de este ión para mantener pH neutro.

En otros modelos celulares este acoplamiento entre transporte de protones y *shunt* de cloruro ha sido evidenciado, sobre todo en el proceso de acidificación endosomal en mamíferos, donde co-transportadores Cl⁻/H⁺ desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del pH ácido en lisosomas, apoyando la función de bombas V H⁺ ATPasa presentes en este compartimento, pudiendo disipar la fuerza electromotriz generada al concentrar protones en la luz del organelo (Jentsch et al. 2002). Sin embargo la importancia del cloruro pareciera estar más allá de co-ayudar a la función a la bomba V H⁺ ATPasa, pues la mutación del sitio de la compuerta de transportadores H⁺/Cl⁻ en ratones, desacoplan la endocitosis mas no impiden la acidificación de endosomas, fenómeno también evidenciado cuando se hace *knockout* de esta proteína, haciendo pensar que el cloruro en sí mismo es importante para el tráfico vesicular (Novarino et al. 2010).

Por otro lado, este ión también es fundamental en el proceso de homeostasis osmótica en *Leishmania* ya que, ante estrés hipotónico, estas células expulsan Ca²⁺ acompañado de Cl⁻, los cuales están almacenados en acido-calcisomas, y así generan fuerza de arrastre de agua y regulan volumen, importante dentro de las vacuolas parasitóforas ya que por pasar de un ambiente de 300 mOsm a 150 – 250 mOsm, el parásito experimenta un ambiente hipotónico al cual se adapta (Le Furguey et al. 2005), Sin embargo, datos de nuestro grupo retan el presupuesto teórico de menor osmolaridad en la vacuola parasitófora. Los amastigotes axénicos son de mayor volumen que los amastigotes *in situ* (Fig. 4) y la incapacidad de la cepa E1 de *L. braziliensis* silenciada para LbCLC_A que tiene mayor volumen y no logra transformarse a amastigote en el ambiente de la vacuola parasitófora (Zapata et al. 2014). Este mecanismo se complementa con la expulsión de aminoácidos aniónicos, cuya dinámica es inhibida por DIDS por lo cual se postuló que es dependiente de transportadores de cloruro (Vieira et al. 1996).

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

Evidencias experimentales de nuestro laboratorio sugieren que hay presencia de canales aniónicos en *Leishmania*. Mediciones realizadas después de la inyección de ARNm de *L. amazonensis* en ovocitos de *Xenopus laevis*, demostraron la presencia de corrientes de cloruro voltaje dependientes rectificadoras de salida sensibles a DIDS y distintas a las endógenas del ovocito (Lagos *et al.* 2007). Datos similares se obtuvieron luego de la inyección de ARNm de *Leishmania braziliensis* (Garzón *et al.* 2009). De aquí comenzó el interés por este tipo de proteínas transportadoras de cloruro. Teniendo en cuenta que *L. braziliensis* es una de las especies que más casos de Leishmaniosis mucocutánea causa en Colombia y que el genoma de esta especie se encuentra secuenciado y curado (Peacock *et al.* 2007), se buscaron en el Genbank canales de cloruro, encontrándose cuatro canales putativos, con las siguientes posiciones en el genoma: *LbrM01_V2.0210* (*LbCLC_A*), *LbrM32_V2.3670* (*LbCLC_B*) y *LbrM33_V2.1260* (*LbCLC_C*) y *LbrM04_V2.1010* (*LbCLC_D*), los cuales tienen los siguientes ARNm asociados (números de acceso genbank: *_XM_001561412*, *XM_001561734*, *XM_001567667*, *XM_001567844*), respectivamente.

Estos genes codificarían teóricamente CLC (Lozano, 2012, Quintero, 2013, Parada, 2014, Dorado, 2010), tres de los cuales (*LbCLC_A*, *LbCLC_B* y *LbCLC_C*) se transcriben en promastigotes y amastigotes axénicos de *L. braziliensis* (Lozano 2012, Quintero 2013 y Parada 2013). El gen ortólogo a *LbCLC_A* lo hace además en promastigotes de *Leishmania panamensis* y *L. amazonensis* (Lozano 2012), demostrando que se trata de genes, que se transcriben en ambos estadios y en varias especies. Sin embargo, no se ha realizado ninguna aproximación acerca de su expresión en otros sub-estadios del parásito y las cantidades de cada ARNm importante al tratarse de organismos que regulan su expresión génica postranscripcionalmente.

Expresión génica en Eucariotes

En la mayoría de eucariotas el inicio de la transcripción es el paso fundamental para la regulación de la expresión génica a nivel de ARNm. La primera etapa de regulación se relaciona con la organización de los cromosomas en eucromatina o heterocromatina, siendo la primera, la organización del ADN nuclear descondensada, que permite la interacción de las polimerasas y factores de transcripción. La segunda es un estado condensado de los cromosomas que impide la interacción de proteínas diferentes a las histonas con la plantilla, que

están encargadas de empaquetar el ADN hasta la transcripción o replicación de los genes por lo que son importantes en la regulación de la expresión génica.

Las histonas se organizan en estructuras multiprotéicas llamadas nucleosomas que tienen extremos N terminales modificables químicamente por acetilaciones, permitiendo la descondensación del ADN y aumentando la transcripción al estabilizar la carga positiva de los residuos de lisina, que interactúa fuertemente con los grupos fosfatos de la plantilla (revisado por [Lodish et al. 2000](#)).

Para el inicio de la transcripción se requiere un sitio disponible que tenga un promotor, secuencia caracterizada generalmente por tener varios sitios con repeticiones TATA, que interactúa con complejos ARN polimerasas; estas últimas proteínas se dividen en los siguientes grupos:

- Pol I: encargada de la transcripción de precursores del ARNr.
- Pol II: Encargada de la transcripción de la mayoría de genes funcionales, que pasan a ser traducidos como proteínas y de micro ARN.
- Pol III: Encargada de la transcripción de ARNt y ARNr y algunos ARN pequeños

Además hay proteínas que actúan como potenciadores del proceso, conocidas como factores de transcripción sensibles a estímulos ambientales, que estabilizan el complejo multiprotéico formado por la ARN polimerasa y la plantilla objetivo permitiéndole incrementar la eficiencia de la reacción. El caso contrario también se da por la presencia de proteínas represoras que bloquean el avance de la ARN polimerasa.

La transcripción en eucariotas distintos a Tripanosomátidos se da por cistrones individuales, es decir un transcrito por cada gen el cual pasa por varios procesos de edición, donde se remueven los intrones por cis-splicing, se agrega una secuencia 3' de poliadenina por poliadenilación, y un cap-metilado al extremo 5'. De ahí el ARNm es exportado del núcleo y llevado al retículo endoplasmático rugoso para su traducción (revisado por [Lodish et al. 2000](#)).

Expresión Génica en Tripanosomátidos

Leishmania tal como los otros miembros de la familia Trypanosomatidae tiene organizados sus genes en conjuntos policistrónicos, presentes en ambas cadenas del ADN, los cuales son transcritos en tándem y pasan a ser procesados como ARNm, ARNt o ARNr individuales. Este sistema de organización de genes en policistrones no está relacionado con los operones procarionta ya que se trata de

genes con función no relacionada entre sí dentro de un *loci* llamado Conjunto Policistrónico de Genes (CPG). El inicio de la transcripción de éstos no está bien establecido, aunque se han encontrado pocos promotores para la ARN polimerasa II; por ejemplo en el cromosoma I de *Leishmania major*, hay un sólo inicio de la transcripción sin la secuencia consenso TATA que sirve para transcribir todos los CPG del cromosoma ubicados en la región del cambio de cadena (*Strand Switch Region*), cerca del centrómero (Martinez-Calvillo *et al.* 2003). Sin embargo se ha encontrado que la transcripción de algunos genes como las glicoproteínas variables de superficie (VSG por sus siglas en inglés), Poli ADP ribosa polimerasa (PARP) y prociclina EP de *Trypanosoma*, es regulada por la ARN polimerasa I (PolI), y tiene cada uno un promotor individual cuya expresión es regulada durante el desarrollo, por silenciamiento mediado por cromatina (Haile y Papadopoulou, 2007), pero no se han encontrado más genes que dan paso a transcritos por esta polimerasa por lo cual se infiere que los genes en los Tripanosomatidae en su mayoría son transcritos por Pol II (Belli 2000, Martinez – Calvillo *et al.* 2010).

La mayoría de los genes en *Leishmania* no tienen intrones por lo que un proceso de *cis-splicing* no es necesario, exceptuando algunos casos como el del gen *Pol II*, la poli adenina polimerasa y el ARNt-Tyr de *Leishmania donovani* (Martinez – Calvillo *et al.* 2010), los cuales poseen una secuencia en 5' reconocida por el micro-ARN U1; ARN precursor para el proceso de *cis-splicing* (Liang *et al.* 2003). Sin embargo, en el resto de los genes hay edición por *trans-splicing* que es el paso inicial para el procesamiento del ARN primario el cual sirve para dividir el policistrón en moléculas de ARNm individuales (Agabian 1990, Ullu *et al.* 1993, Haile y Papadopoulou, 2007, Martinez-Calvillo *et al.* 2010). La característica principal de este proceso es la adición de un miniexón llamado **líder de empalme del ARN** o *Spliced Leader* en inglés en el extremo 5' que consta de 39 a 41 ribonucleótidos, que tiene además el cap metilado característico del extremo 5' de los ARNm (Haile y Papadoupoulou, 2007), para luego poliadenilar en el extremo 3', lo que confiere estabilidad a la molécula al salir del núcleo evitando su degradación (Mathews *et al.* 1994). Como evidencia de la secuencialidad de estos procesos se sabe que si el ARNm no es editado por *trans-splicing* en el gen de tubulina α , en *Trypanosoma brucei*, la maduración del ARN no ocurre (Ullu *et al.* 1993).

La poliadenilación ha sido un proceso difícil de predecir en estos organismos, ya que a excepción de otros eucariota, no hay una secuencia consenso AAUAAA, sino que es reemplazada por un conjunto de polipirimidinas en el extremo 3' que al estar ausentes bloquean el proceso de poliadenilación del ARNm impidiendo que este madure (Mathews *et al.* 1994). Sin embargo este sitio no está presente en todos los genes lo que implica el reconocimiento de otras secuencias consenso, no caracterizadas (Martínez – Calvillo *et al.* 2010).

Adicional al *trans – splicing* en tripanosomátidos se ha demostrado por medio de la técnica ARNseq, que la mayoría de genes codificantes de proteínas poseen sitios en el ARNm que permitirían un proceso de *splicing* alternativo (Preußner *et al.* 2012), calculándose que 75% de los genes de *Trypanosoma brucei* generarían entre 1-10 ARNm distintos (Kolev *et al.* 2010), incrementando la diversidad de proteínas posibles a en este tipo de organismos.

A pesar que la transcripción ocurre en tandém con los CPG, la cantidad de ARNm de cada gen al contrario de lo que se esperaría no se encuentra en las mismas cantidades, por lo que se dice que la regulación postrascricional en estos organismos es muy importante los cuales están a nivel de la regulación de la abundancia del ARNm (Martínez- Calvillo *et al.* 2010). Sin embargo mecanismos como modificación del ADN por cambios de la Timina en (5-(b-D-glucopiranosilo)-metiluracilo o b-D-glucosil-hidroximetiluracilo) llamada base J y condensación y descondensación de la cromatina dependiente de la histona H1 en el paso de promastigotes metacíclicos a amastigotes, son importantes en la regulación al inicio de la transcripción (Belli 2000).

La expresión génica a nivel de ARNm es controlada por la regulación de la vida media de los ARNs y por inhibición o favorecimiento de la traducción por mecanismos dependientes de la secuencia 3'UTR, y mecanismos asociados a la unión de proteínas al ARN de lo cual hay numerosos ejemplos:

- la proteína TbDRBD3 de *Trypanosoma brucei* que se une al extremo 3' UTR confiriendo estabilidad a los ARNm, facilitando su traducción relacionada con varias proteínas implicadas en transporte de nutrientes (Estevéz 2008).
- Una secuencia 3'UTR en *T. brucei* que forma un *loop* sobre sí mismo el cual responde al aumento de niveles externos de purinas induciendo la expresión de la proteína NT8, sistema que intercambiado a un sistema de

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

luciferasa presenta el mismo comportamiento ([Fernández-Moya et al. 2014 b](#)).

- La proteína RBP33 se une a ARNm ricos en uridina favoreciendo su degradación e impidiendo que se expresen a nivel de proteína ([Fernández-Moya et al. 2014 a](#)).
- El gen de amastina en *Leishmania infantum* se traduce principalmente en la etapa amastigote debido a su secuencia 3' UTR de 450 pb que incrementa su traducción, probablemente por la formación de un ARN en estructura terciaria en forma de Y ([Boucher et al. 2002](#)).
- El ARNm de la enzima fosfoglicerato kinasa PGKB en las formas sanguíneas de *T. brucei* contiene un elemento regulatorio rico en AU en el extremo 3'UTR que lo desestabiliza favoreciendo su degradación. Por el contrario en las procíclicas, estos transcritos son estabilizados por la acción de una proteína llamada HuR que tiene afinidad alta por poli uridinas, y que es expresada específicamente en este estadio ([Quijada et al. 2002](#)).
- La región 3' UTR del ARNm de la prociclina de epimastigotes de *Trypanosoma cruzii* contiene elementos de 16 pb y 26 pb que contribuyen a la estabilidad del transcrito y la eficiencia de la traducción, posiblemente por proteínas que se unen a estos transcritos y los protegen de la degradación, pero este modelo no ha sido comprobado ([Furger et al. 1997](#)).

Debido a estos eventos de regulación postranscripcional y postraduccional diversos autores discuten si hay una relación proporcional entre los niveles de cada transcrito con los de proteína, o si por el contrario se trata de eventos independientes. En un estudio en *L. donovani* se compararon niveles de ARNm por microarreglos y de proteína por iTRAQ, acoplado a cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem, en distintas etapas de desarrollo desde promastigotes metacíclicos hasta amastigotes. Para esto se usó un sistema axénico de desarrollo del parásito cuyas etapas fueron: diferenciación Fase 1, percepción de la señal sin cambios morfológicos (Fase I; 0 - 5h), detención del movimiento y agregación (Fase 2; 5 -10h), transformación morfológica a

amastigotes (Fase III; 10 – 25h) y maduración de los amastigotes (Fase 4; 25 – 120h) ([Barak et al. 2005](#)). Se encontró, que no hay una relación directa entre la cantidad y diversidad de transcritos respecto a la cantidad y diversidad de proteínas y que hay un incremento en los niveles transcripcionales en las etapas tempranas de desarrollo (I y II), mientras que se favoreció la expresión diferencial de proteínas en las etapas tardías Fases III y IV, donde la célula se ha transformado a amastigote. En general hay más fenómenos de regulación génica negativa a nivel de proteína y ARNm en amastigotes que regulación positiva, esto para unos genes puntuales que podrían estar asociados con el desarrollo del parásito como la peroxidasa dependiente de ascorbato y la proteína de choque térmico 100 proteínas de las cuales hay co-expresión positiva de ARNm y proteína desde niveles tempranos en las fases 1 y 2 de la transformación hasta la formación del amastigote. También se halló represión en la expresión de ARNm y de proteínas correspondientes al anillo flagelar y del factor de traducción número 3 progresivamente desde la fase I a la fase V ([Lahav et al. 2011](#)).

Asumiendo que la permeabilidad de cloruro y protones puede estar regulada durante el desarrollo del parásito, este trabajo estudió la expresión de ARNm de cuatro CLC putativos de *L. braziliensis* en promastigotes y amastigotes, teniendo en cuenta el periodo intermedio asociado con la transformación desde un estadio al otro.

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

Objetivo General

- Cuantificar la transcripción del intercambiador *LbCLC_A* y de los canales/intercambiadores de cloruro putativos *LbCLC_B*, *LbCLC_C* y *LbCLC_D*, en promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Objetivos Específicos

- Cultivar *L. braziliensis in vitro* en condiciones axénicas y a diferentes tiempos post-infección
- Generar cDNA de *Leishmania* en diferentes estadios y a diferentes tiempos post-infección
- Determinar la expresión génica por RT PCR del intercambiador *LbCLC_A* y de los canales/intercambiadores de cloruro putativos *LbCLC_B*, *LbCLC_C* y *LbCLC_D* en amastigotes a diferentes tiempos post-infección
- Determinar la expresión génica por RT PCR del intercambiador *LbCLC_A* y de los canales/intercambiadores de cloruro putativos *LbCLC_B*, *LbCLC_C* y *LbCLC_D* en promastigotes
- Optimizar PCR y clonar los fragmentos de cada gen para cuantificación.
- Cuantificar la expresión génica a nivel de ARNm de cada gen a diferentes tiempos post-infección

Metodología

Cultivo de Leishmania (formas promastigote y amastigote axénico)

Se utilizaron parásitos *Leishmania (Viannia) braziliensis*: cepa HOM/BR/75M2903, donados por CIDEIM, Cali, Colombia. Los parásitos fueron cultivados en el estadio promastigote a una concentración inicial de 10^7 células / mL en cajas de 25 cm² en medio Schneider suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB; Niño y Camacho, 2005). Los cultivos fueron mantenidos a 27 °C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células / mL, punto en el cual los parásitos alcanzan su fase estacionaria, generan rosetas, e infectan macrófagos fácilmente; en este punto fueron recolectados para aislar ARN, para infección, para cultivo de amastigotes axénicos, o diluidos para sub-cultivo, aproximadamente a las 72 h de cultivo. Para el sub-cultivo de amastigotes axénicos se tomaron 10^8 células / mL en cajas de 25 cm² y se cultivaron en medio a pH 5 y a 35 °C, 5% CO₂.

Cultivo de macrófagos

Macrófagos peritoneales de ratón de la línea celular J774A.1 obtenidos de ATCC (TIB 67) fueron mantenidos en monocapa en frascos de cultivo de 25 cm² a 35 °C y 5% de CO₂, empleando medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% (v/v) de SFB (Biodan; Forero *et al.* 1999), cambiándoles el medio de cultivo cada 24 horas. Para la realización del sub-cultivo, se procedió a barrer con *scraper* para luego llevar a una dilución de 1/10; se realizaron máximo 10 sub-cultivos, luego de lo que se procedió a infectarlos o extraer ARN. Cuando se realizó un cultivo nuevo se partió de cultivos base, previamente congelados.

Infección de macrófagos (forma amastigote in situ)

Macrófagos (línea celular J774.A1) 1×10^7 fueron expuestos a promastigotes de *L. braziliensis* con una concentración de 1×10^8 células / mL en fase estacionaria, proporción de 1:10, y mantenidos a 35 °C y 5% CO₂ por 4 horas en botellas de cultivo celular de 25 cm² donde el excedente de parásitos fue removido por lavado con RPMI. Posteriormente, los cultivos se mantuvieron a 35 °C y 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 24h. A partir de cultivos de macrófagos

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

infectados se extrajo ARN total a diferentes tiempos: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 24 horas 48horas y 72 horas post-infección (hpi).

Extracción de ARN Total

Se utilizó el reactivo Trizol, una solución monofásica de fenol y guanidina isocianato, de la casa comercial Invitrogen, la cual permite aislar el ARN total separándolo del ADN y proteínas, permitiendo alta pureza y calidad (Chomczynski 1993). Inicialmente la muestra homogenizada se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C eliminando el exceso de polisacáridos presentes en *Leishmania*. Se recolectó el sobrenadante en un tubo eppendorf y se descartó el *pellet*. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se incubó por 2 minutos a 15 °C. Se centrifugó nuevamente a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y se observaron tres fases en el tubo: la fase inferior orgánica que contenía la mezcla fenol-cloroformo con alto contenido de lípidos, la interfase donde se encontraba una mezcla de ADN y proteínas y la fase superior acuosa, conteniendo ARN total. Esta última fase fue transferida a un tubo eppendorf, donde se le adicionó una cantidad isovolumétrica de isopropanol para precipitar el ARN. Se realizó 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 con 1 mL de etanol 75% en agua con dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC; un inhibidor de nucleasas) para solubilizar las sales. Se centrifugó a 7.500 x g durante 5 minutos a 4 °C y se retiró el etanol. El *pellet* se dejó secar al aire y resuspendió en 30 µL de H₂O-DEPC 0,1 %; finalmente se incubó a 60 °C por 5 minutos para solubilizar la muestra.

Cuantificación de ARN: Se realizó usando un espectrofotómetro marca Shimadzu obteniéndose mediciones a 260 nm, 280 nm y 230 nm. Con estas mediciones se hicieron cocientes 260/280 y 260/230 para verificar pureza del ácido nucleico y calcular concentración estimada en µg/mL.

Limpieza del ARN total aislado con la enzima ADNasa pancreática: Para retirar excesos de ADN presentes en la mezcla de la extracción de ARN con Trizol, se usó ADNasa pancreática I marca promega (Protocols Promega 2009), a una unidad equivalente a un µL de enzima por µg de ARN a limpiar, incubándolo a 37 °C con un buffer específico (Moore 1981), luego de lo cual se agregó una solución

STOP que constenía EDTA 50 mM y se incubó 10 minutos a 65 °C (Protocols Promega 2009). En este trabajo como se hizo medición por PCR en tiempo real, se utilizaron 2 µg de ARN por digestión, de lo cual se usó la mitad directamente para la retro-transcripción.

Extracción de ADN Genómico

Se realizó una extracción de ADN genómico de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en fase estacionaria (72 horas de cultivo), utilizando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega (Promega 2010) que utiliza el principio de precipitación del ADN por etanol y aislamiento de ácidos nucleicos con fenol cloroformo, usando RNasa para degradar el ARN resultante. Se utilizó el protocolo de extracción de ADN de parásitos mencionado en Bonifaz-Pérez *et al.* 2011. el cual se valoró por espectrofotometría y electroforesis en gel de Agarosa (Fig. 2).

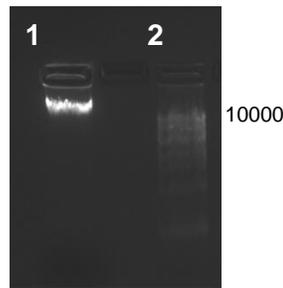


Figura 2. Gel de electroforesis ADN Genómico extraído de promastigotes *Leishmania braziliensis* metacíclicos. 1. 20 µg de ADN extraído de *Leishmania braziliensis*. 2. Marcador de peso molecular 1000 – 10000 pb.

Tabla 1. *Primers* utilizados en el presente estudio. Los *primers* LbCLC_A amplifican la secuencia XM_001561412. Los *primers* LbCLC_B hacen referencia a la secuencia XP_001567717.1. Los *primers* LbCLC_C hacen referencia a la secuencia XM_001567844.1. Los *primers* LbCLC_D amplifican la secuencia XM_001561734.2

	Secuencia Primer	Tamaño	Start	Tm	%GC	Producto esperado (pb)	Nombre del amplicon
LbCLC _A Fw1	TGGCATTGCGGAGGT	15	537	57,98	60	950	
LbCLC _A Rv1	CGCCTACAATCGGTACA	18	1486	54,91	55,56	950	LbCLC _A 1
LbCLC _A Fw2	GGAAGCAGGCGGCAATTG	18	3	65,4	66,67	187	
LbCLC _A Rv2	GTATGGCGAGTGAGTGGTAG	20	192	55	55	187	LbCLC _A 2
LbCLC _B Fw1	CATTCAATCCCACGTACAG	20	2304	59,96	50	100	
LbCLC _B Rv1	CAGTGGCAGGTAATCCATCA	20	2403	59,7	55	100	LbCLC _B 1
LbCLC _B Fw2	GTAAAGTACTGCACACGATGGA	23	2008	57,45	43,48	192	
LbCLC _B Rv2	TACCTCGCAGCATCATCTATCT	23	2199	57,99	43,48	192	LbCLC _B 2
LbCLC _C Fw1	TCGTTGCTTCATCGGTTACA	20	1136	60,1	55	99	
LbCLC _C Rv1	GGTACGTGCTCCGATCCTA	20	1234	60,26	45	99	LbCLC _C 1
LbCLC _C Fw2	GGACAGTACGAGGCCGAGA	20	21	58,4	65	190	
LbCLC _C Rv2	GCGCAGTCCAAGCCGAGAA	20	210	57,92	60	190	LbCLC _C 2
LbCLC _D Fw1	TTGCTTGGCGCAGGTGTTGT	21	2091	57,14	60,05	100	
LbCLC _D Rv1	TGCGCCGAAGTGCACGACAT	20	2190	60	59,98	100	LbCLC _D 1
LbCLC _D Fw2	ACCTTCAGCCACCATTAACCT	22	1063	57,75	40,91	195	
LbCLC _D Rv2	GATAAGGATTAGGTTTCGCTTGG	23	1257	58,24	43,48	195	LbCLC _D 2

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

Diseño de primers

Se diseñaron *primers* específicos para cada gen de 100 y 200 pb para PCR en tiempo real, que tienen como características especiales el tamaño del amplicón, baja complementariedad entre ellos (*primers*), analizada con el programa informático oligo analyzer (Integrated DNA Technologies 2014) y la ausencia de secuencias continuas de 4 guaninas o citosinas (Tabla 1). El programa informático que se uso para este proceso fue Primer 3 y se eligieron regiones de los canales, que no compartieran secuencias con otros genes del parásito ni de ratón, *Mus musculus* (organismo del cual proviene la línea celular J774A.1), lo cual se comprobó con un alineamiento múltiple del amplicón obtenido con el programa BLAST del NCBI, en el genoma y transcriptoma de *Mus musculus*, con el uso de la herramienta PCR *in silico*. Esto fue necesario para amplificar sólo las secuencias de interés (*Leishmania*) en los experimentos de infección en vista que al purificar ARN total existe contaminación con los ácidos nucleicos del macrófago. Así mismo se verificaron usando como control negativo ADNc de macrófagos sin infectar.

Tabla 2. Mezcla para realizar PCR con el kit Axygen Taq Polimerasa.

Reactivo	Concentración Final	Volumen μ L
H ₂ O	—	6,22
Buffer 10X	1X	1
MgCl ₂	2mM	0,8
25mM		
dNTPs	30uM	0,3
100mM (la suma de los dNTPs)		
Taq pol	0,4u	0,08
5U/uL		
Primer Fw	30uM	0,3
10mM		
Primer Rv	30uM	0,3
10mM		
Plantilla	>50ng	1
		10
Total		

Amplificación de fragmentos de interés por RT PCR

Se utilizó RT PCR para comprobar la expresión génica de los genes *LbrM01_V2.0210* (*LbCLC_A*), *LbrM04_V2.1010* (*LbCLC_{DA}*), *LbrM32_V2.3670* (*LbCLC_B*) y *LbrM33_V2.1260* (*LbCLC_C*), reportados como canales de cloruro putativos de *L. braziliensis* con códigos de acceso en Genbank: XM_001561412, XM_001561734, XM_001567667, XM_001567844 respectivamente. Primero a partir del ARN total se sintetizó ADNc mediante el uso de *Kit SuperScript® III cDNA synthesis* de la casa comercial invitrogen (Tabla 2), que utiliza el principio de transcripción reversa para la obtención de ADNc a partir de ARN, para lo que se utilizaron como *primers* oligo dT que se unen a las colas de poliA para amplificar específicamente ARNm. Seguido se realizaron PCR convencionales, según las condiciones mostradas en la Tabla 1. Se valoraron los resultados por electroforesis en geles de agarosa 1% o 1,5%, dependiendo del tamaño del amplicón, en buffer TAE, TBE o SB según lo indicado en cada figura y corriéndolo a 75 – 85 V por 35 – 40 minutos usando escalerillas de peso molecular de 100 – 1000 pb o 1000-10000 pb. Para validar la presencia del inserto por tamaño del amplicón.

Aislamiento de amplicones desde gel de agarosa: Se utilizó el kit comercial *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* de la casa comercial Zymo para aislar los fragmentos de interés desde el gel con el uso de columnas de sílice posterior a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y utilizando el protocolo con centrifugación.

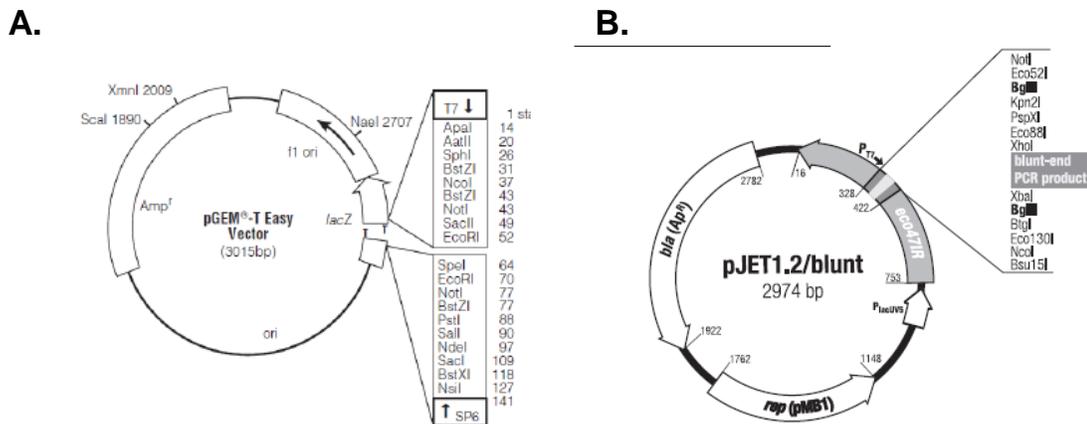


Figura 3. Mapa de los vectores de clonación, **A.** p Gem T easy y **B.** Clon Jet de Thermo Scientific, mostrando principales características como son, sitios de resistencia a antibióticos, promotores, polilinker y sitios de restricción.

Clonación en p-GEM-T Easy o ClonJet. Los productos de la PCR al ser amplificados con una polimerasa de baja procesividad tienen una A pegajosa a la

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

cual se pueden unir al vector *p-GEM-T Easy* (Fig. 3), que tiene la región de inserción del fragmento con poli T. El protocolo utiliza una ligasa T4, y la cepa de bacterias competentes J109. Este vector tiene la ventaja de tener el operón *Lac* como reportero y resistencia a ampicilina, parámetro este último, que fue utilizado para la selección de las células transformadas en el medio de cultivo en donde se adicionó además X GAL e IPTG para selección de colonias positivas (*pGEM-T Easy Vector Systems 2010*). El vector *ClonJet* tiene a su vez una región poli-linker a la que sólo se pueden unir secuencias con extremos romos, implicando que todas aquellas PCR obtenidas con polimerasas de baja procesividad debieron ser expuestas a un reacción de “blunting”, la cual elimina los extremos pegajosos de los amplicones permitiendo ser insertada en el vector, con el uso de una ligasa T4 según las instrucciones descritas en el kit (*Thermo Scientific 2012*). Los vectores fueron usados dependiendo de su disponibilidad en el laboratorio.

Transformación bacteriana: Este proceso se realizó por choque térmico, en bacterias *E coli*, competentes de la línea J109, sometiéndolas a un cambio abrupto de temperatura de 0°C a 42°C por 45s. Para ambos plásmidos se seleccionaron las bacterias efectivamente transformadas en un medio selectivo con 100 µg/mL de ampicilina.

Extracción de ADN plasmídico. Para este propósito se usó el kit *Zymo Plasmid DNA Miniprep* que combina lisis alcalina de bacterias y selección del ADN plasmídico en columnas sílice. Posteriormente se realizaron PCRs de colonia con *primers* universales y específicos como primera medida de calidad, para evidenciar la presencia del inserto esperado.

Secuenciación de los fragmentos de interés clonados: Se realizó con el servicio ofrecido por Macrogen por pirosecuenciación usando los *primers* T7 universales presentes en *pGEM-T Easy* o *Clon Jet* (*pGEM-T Easy Vector Systems 2010*; *Thermo Scientific 2012*).

PCR en tiempo Real:

Se evaluó la expresión a nivel de ARNm de cada uno de los CLC en las formas promastigote, amastigote axénico, promastigotes en infección temprana y amastigotes *in situ* a diferentes tiempos post-infección en tres réplicas biológicas. Para hacer cuantificación absoluta se hicieron comparaciones respecto a una curva de calibración en donde se usó como plantilla el plásmido con el fragmento

de interés correspondiente (Overberg *et al.* 1999). La curva de calibración se construyó a partir de diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

En la cuantificación absoluta por PCR en tiempo real, a diferencia de la relativa no se requiere comparación con genes constitutivos. Sin embargo, son necesarios controles negativos como ADNc de macrófago y amplificación desde un blanco sin plantilla, para este experimento. La cuantificación se hizo con la metodología de *SYBR Green* que incrementa su fluorescencia conforme la PCR avanza en el número de ciclos actuando como agente intercalante de ADN cambiando su pico de absorción y de emisión en el complejo ADN-*SYBR Green*. Para las cuantificaciones se usó, el *kit* de Roche *LightCycler FastStart DNA Masterplus SYBR Green*.

Los resultados se compararon teniendo en cuenta el ciclo umbral (C_t), donde la PCR cambia de dinámica lineal a exponencial, medida que explota el hecho de ser proporcional a la cantidad inicial de plantilla (Heid *et al.* 1996). C_t se extrapola de la curva de calibración obtenida con el plásmido que es una relación entre el ciclo umbral y la cantidad inicial del número de copias dando una ecuación lineal (Ecuación 1 y Ecuación 2), para la cual se necesita saber el número de copias iniciales de plásmido / μL , cantidad calculada a partir de la concentración de plásmido (Ecuación 3).

$$C_t = a(\log_{10} C_i) + c$$

Ecuación 1. C_t = Ciclo umbral con respecto a: a =pendiente de la recta, C_i = # de copias iniciales, c =punto de corte con el eje X.

$$C_i = 10^{\frac{C_t - c}{a}}$$

Ecuación 2. C_i en función del ciclo umbral.

$$\#copias\ iniciales = \frac{C_p}{(T_p + T_i) * P_{pb}}$$

Ecuación 3. Número de copias de la secuencia de interés obtenida a partir de la concentración inicial del plásmido, teniendo que: C_p =Concentración plásmido ng/ μL , T_p =Tamaño en pares de bases del plásmido, T_i = Tamaño del inserto y P_{pb} = Peso de un par de bases en ng = $1,079 * 10^{-12}$ ng.

En un modelo ideal la cantidad de copias del producto de PCR se duplica con cada ciclo (Yuan *et al.* 2006), teniendo una eficiencia del 100%. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones la reacción está más bien alrededor de este valor ideal,

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

siendo necesario normalizar los valores de amplificación con base en la eficiencia de la amplificación (Ecuación 4) como se muestra en la Ecuación 5.

$$E = 10^{(-\frac{1}{a})} - 1$$

Ecuación 4. Eficiencia de amplificación y normalización realizada respecto a esta. donde E = eficiencia, a = pendiente obtenida con la Ecuación 1.

$$Ci_i = \frac{C_i}{E}$$

Ecuación 5. Ci_i = Cantidad inicial normalizada. C_i Cantidad inicial calculada a partir del ciclo umbral. E = Eficiencia de la reacción 0.

RT PCR con los genes *LbCLC_A*, *LbCLC_B*, *LbCLC_C* y *LbCLC_D*.

1.1 Cultivo *in vitro* de *Leishmania braziliensis* y extracción de ARN total.

Se establecieron cultivos celulares de acuerdo a los puntos temporales representativos de acuerdo a las etapas más importantes del paso de promastigotes a amastigotes que según [Barak et al. 2005](#) representan la fase I de promastigotes: las etapas 0,5 hpi, 1 hpi y 2 hpi, donde hay percepción de señales necesarias para la adaptación del parásito; la fase II representada por 6 hpi donde hay agregación del parásito y detención del movimiento necesarias para la consiguiente transformación, la fase III correspondiente a 12 hpi donde comienza la transformación morfológica y la fase IV en 48 y 72 hpi donde ocurre la maduración final a amastigotes ([Fig 4](#)).

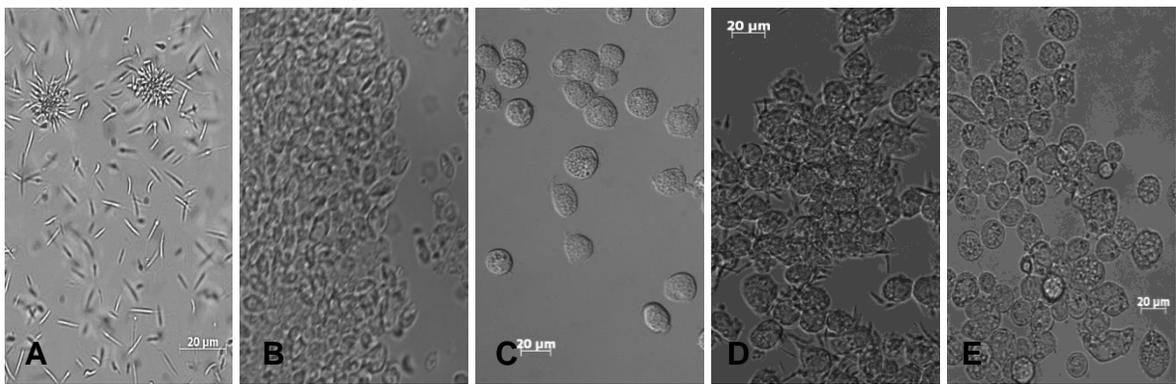


Figura 4. Cultivos celulares: A. Promastigotes metacíclicos en fase estacionaria, mostrando la formación de rosetas. B. Amastigotes axénicos de *Leishmania braziliensis*. C. Cultivo de macrófagos J774.A1 40X. D. Macrófagos J774. A1 en 0,5hpi. E. Macrófagos J774 A.1 16 hpi.

El ARNm extraído con el reactivo fenol cloroformo isoamílico llamado comercialmente Trizol se evaluó visualizándolo en gel de agarosa 1% utilizando como buffer de corrida TAE a 80 V por 40 minutos. Se evidenció la presencia de los ARN ribosomales típicos, tanto de *L. braziliensis* (tres bandas) como de macrófagos infectados (dos bandas), que son indicativo del buen estado del ARN ([Fig 5](#)). A partir de estos se procedió a realizar la síntesis de ADNc después de limpieza con ADNasa pancreática utilizando 2 µg ARN inicial.

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

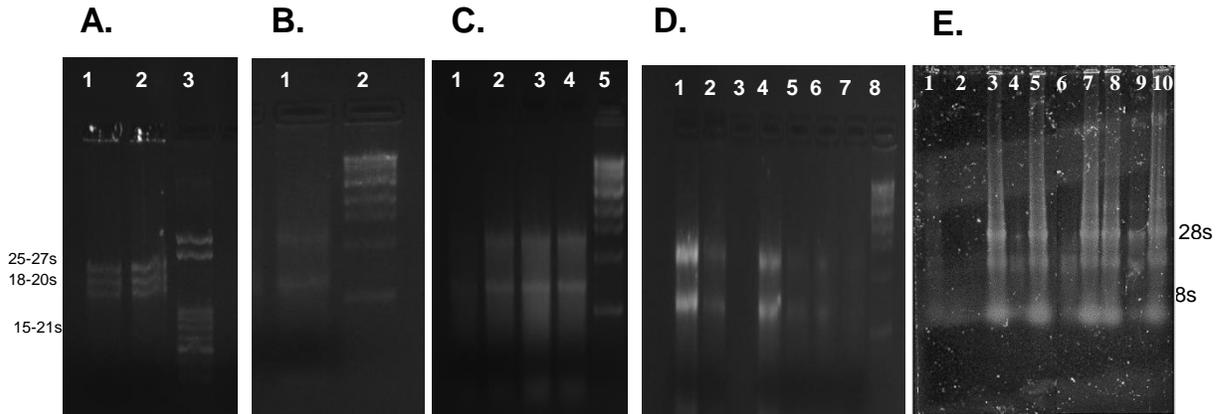


Figura 5. Gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X diluido en H₂O DEPC, mostrando ARN total de los distintos tratamientos experimentales utilizados. **A.** 1. ARN promastigote metacíclico Lbr. 2. ARN promastigote Metacíclico Lbr. 3. Marcador de peso molecular 50 – 1000 pb. **B.** 1. ARN 2hpi *Leishmania braziliensis*, células J774.A1 2. Marcador de peso molecular 1000 – 10000 pb. **C.** 1. ARN 24 hpi. 48hpi. 3. 72hpi. 4. 1hpi. 5. MPM 1000 – 10000 **D.** 1. ½hpi. 2. 1hpi. 3. 2hpi. 4. 6hpi. 5. 24hpi. 6. 48hpi. 7. 72hpi. 8. MPM 1000-10000 pb. **E.** 1. RNA Control. 2. Amastigote axénico 1, 3. Amastigote axénico 2. 4. J774.A1 ½ hpi. 5. J774 A1 ½ hpi Sobrenadante de cultivo. 6. J774.A1 1hpi. 7. J774.A1 1hpi Sobrenadante de cultivo. 8. J774.A1 6hpi. 9. J774A1 24hpi. 10. J774A1 48hpi. 11. J774 A1 72 hpi.

Como se puede observar, la mayoría de ARN totales extraídos la presencia de ARNr que son tres bandas características en *Leishmania* subunidades 15-21S, 18-20S y 25-27S (Morales y Roberts 1978), y dos bandas correspondientes al ARNr de mamíferos de las unidades 18S y 28S, en este caso macrófagos J774.A1 infectados con *L. braziliensis*. Sin embargo, muestras como las de amastigotes axénicos (Fig. 5 E) no muestran el bandeo típico, por la dificultad en la lisis de estas células (Buitrago 2014) o baja cantidad extraída, aunque estas muestras si amplificaron luego de la síntesis de ADNc (Fig. 7A y Fig. 8C). Desafortunadamente se sacrificó mucha cantidad para lograr sintetizar ADNc bajo las mismas condiciones, usando 1µg de ARN por reacción, razón por la cual no hubo suficiente material con este tratamiento para las mediciones de RTqPCR.

1.2 Estandarización de la PCR para amplificación de productos de interés.

Del experimento mostrado en la figura 5.A. se establece el protocolo de PCR para amplificación del fragmento del gen *LbCLCA_A*, *LbCLCA₂* (Tabla 1), así; 95°C 5

minutos (95 °C 30 segundos 61 °C 30 segundos, 72 °C 1 minuto 35 ciclos) 72 °C 10 minutos, el cual se seguirá utilizando de ahora en adelante. Para los otros cebadores correspondientes a los otros genes se estableció así mismo la temperatura óptima de anillamiento de 61°C, siendo una temperatura con la cual se pueden correr reacciones del mismo tipo a la vez, excepto aquellos correspondientes a la secuencia *LbCLC_{C2}* correspondiente a un tamaño de 200 pb (Tabla 1) que amplifica mejor alrededor de 65,3 °C (Fig. 6B), se mantienen las concentraciones de los reactivos estándar, para las PCR, incluyendo cloruro de magnesio y *primers*.

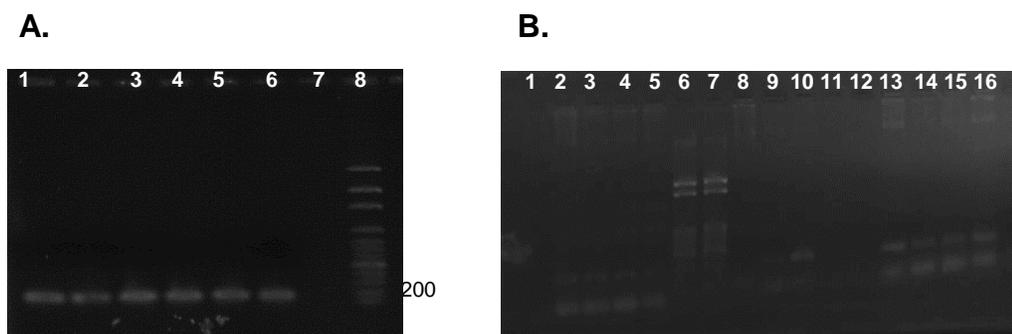
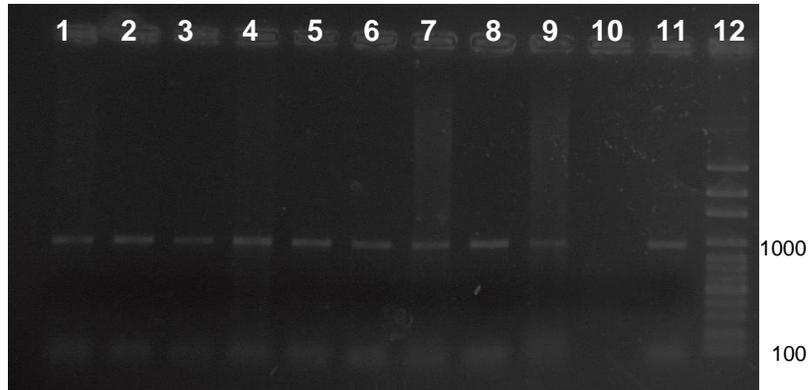


Figura 6. Estandarización de las condiciones de anillamiento para PCR de los *primers* que amplifican las secuencias *LbCLCA2*, *LbCLCB2*, *LbCLCC2*, *LbCLCD2* (ver Tabla 1) **A.** Gradiente de temperatura de anillamiento para la estandarización de la amplificación de la secuencia *LbCLCA2* Experimento en el cual se usa ADNc de promastigotes metacíclicos a 72 Horas de crecimiento como plantilla corrido en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE a 80 V por 40 minutos; las temperaturas de anillamiento usadas en °C fueron correspondientes a los pozos: 1. 61°C. 2. 60,4 °C. 3. 59,6 °C. 4. 58,6 °C. 5. 57,8. **B.** Gradiente de temperatura de anillamiento para la estandarización de las distintas PCR con ADN de parásito con distintos tiempos de anillamiento. Corridos en gel de agarosa 1% en Buffer TAE a 80 V por 40 minutos (1-5) Secuencia *LbCLC_{C2}* Temperaturas: 1. 57°C C- cDNA J774. 2. 67°C. 3. 65,3°C 4. 61°C 5. 57°C. 6. Marcador de peso molecular 50 – 1000 pb. 7. Marcador de peso molecular 50 – 100 pb. (8-11) Secuencia *LbCLC_{D2}* 8. 67°C. 9. 65°C. 10. 61°C 11. 57°C. 12. 57°C C- ADNc J774.A1. (13-16). Secuencia *LbCLC_{B2}* 13. 67°C 14. 65°C 15. 61°C. 16. 57°C. 17. Ctrl - ADNc J774.A1.

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

1.3 Expresión de la familia CLC de *Leishmania*.

A.



B.

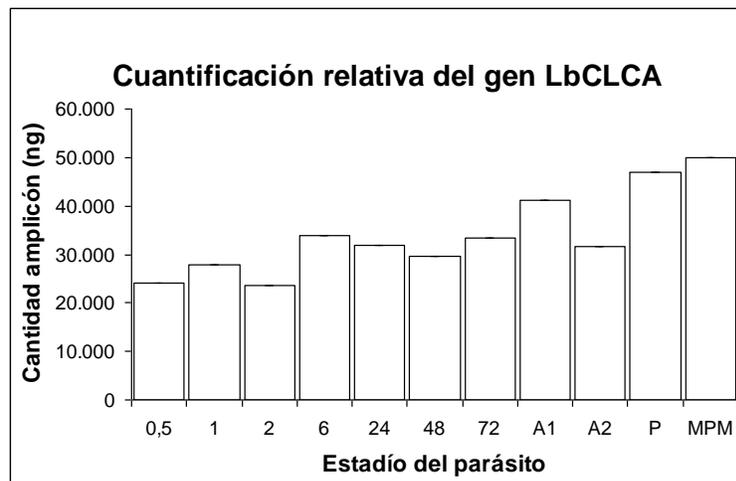


Figura 7. Amplificación y análisis del gen *LbCLCA*. Amplificación con un producto esperado de 950 pb correspondiente a los primers de la secuencia *LbCLCA1* (Tabla 1). **A.** Los carriles corresponden en su orden a: 1. ½ hpi. 2. 1 hpi. 3. 2 hpi. 4. 6 hpi. 5. 24 hpi. 6. 48 hpi. 7. 72 hpi. 8. Amastigote axénico 1. 9. Amastigote axénico 2. 10. Control- H₂O. 11. Promastigote Lbr. 12. Marcador de peso molecular 100 - 3000 pb. **B.** Cuantificación por densitometría de cada uno de los tiempos evaluados en ng, basados en la fluorescencia del marcador de peso molecular, con 33 ng en la banda de 1000 pb.

Tabla 3. Cuantificación por densitometría del amplicón *LbCLCA.3* (Tabla 1), correspondiente a cada tratamiento usando el software ImageJ. MPM, corresponde al marcador de peso molecular, cuya cantidad en ng en la banda de 1000 pb es 33 ng. 1. ½ hpi. 2. 1 hpi. 3. 2 hpi 4. 6 hpi. 5. 24 hpi 6. 48 hpi. 7. 72hpi. 8. Amastigote axénico 1 9. Amastigote axénico 2. 10. Promastigote Lbr.

Estadio del parásito	Fluorescencia media	Cantidad (ng)
MPM	49949	33,00
1	24007	15,86
2	27934	18,46
3	23531	15,55
4	33919	22,41
5	31914	21,08
6	29707	19,63
7	33264	21,98
8	41229	27,24
9	31629	20,90
10	46897	30,98

El gen *LbCLCA* se transcribe en los tiempos estudiados y en los estadios del parásito, ½ hpi, 1 hpi, 2 hpi, 6 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi (estos dos últimos corresponden a amastigotes *in situ*) y en amastigotes axénicos (A1, A2) (Fig. 7 A), resultados que favorecen el estudio de este canal desde otros puntos de vista incluyendo *knockdown* del gen para lo cual *L. braziliensis* tendría las proteínas necesarias, no siendo así para otras especies del género (Barnes *et al.* 2011). Por otro lado es ahora relevante realizar estudios a nivel proteico que mostrarían la dinámica completa de la génica respecto a este gen.

Estos resultados donde el gen *LbCLCA* se expresa en amastigotes *in situ* a nivel de ARNm (48h y 72hpi), complementan estudios anteriores donde se demostró que el gen también lo hace en amastigotes axénicos (Lozano 2012), lo cual es importante porque existen diferencias en la expresión a nivel de ARNm y proteína en ambos tipos de amastigotes (Gupta *et al.* 2001, Rochette *et al.* 2009), pudiéndose utilizar ambos modelos para realizar estudios de expresión del gen *LbCLCA*.

Comparando los niveles de transcrito por densitometría usando el marcador de peso molecular como calibración del peso en ng respecto a la fluorescencia, se obtiene que los transcritos de *LbCLCA* presentan una concentración similar en todos los tiempos post infección (Figura 7B y Tabla 3), aunque por tratarse de una cuantificación a punto final de la PCR no significa un resultado certero respecto a

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

la concentración inicial de los transcritos (Pfaffl y Hageleit 2001), por lo que la complementación con PCR en tiempo real es necesaria o un refinamiento de la técnica usando genes constitutivos.

Los otros genes *LbCIC_B* y *LbCIC_C* también se expresan en promastigotes y amastigotes (Fig. 8A, 8C), mostrando diferencias cualitativas cuando se compara entre genes distintos (Fig. 8B), mientras que la comparación de cada gen en los distintos tratamientos post infección tiende a ser similar, respecto a si mismo (Fig. 8B), siendo *LBCLC_B* el gen con la expresión más alta. *LbCLC_D*, es el único que no se transcribe en promastigotes estacionarios axénicos (Fig 9). En contraste se observan transcritos desde la media hora post-infección hasta las 72 hpi (Fig. 8A), indicando expresión diferencial en algunos sub-estadios del parásito y sugiriendo que este gen puede ser importante en la adaptación del parásito al ambiente de la vacuola parasitófora. Por ejemplo el gen de la amastina, fundamental para la transformación a amastigote, tiene un patrón de expresión similar siendo nula en promastigotes (McCall y Matlashewski 2012). El hecho de que en general la transcripción a nivel de ARNm se conserve durante el ciclo de vida es importante debido a los numerosos eventos de desestabilización a nivel de ARNm, que ocurren en el ciclo de vida del parásito (revisado por Martínez-Calvillo *et al.* 2010), por lo que estos genes al tener la posibilidad de ser traducidos podrían ser importantes en procesos como la adaptación a cambios de pH (Vieira *et al.* 1995), o de volumen (LeFurguey *et al.* 2005).

Estos resultados complementan los estudios de expresión génica de CLC a nivel de ARNm realizados en promastigotes de *L. braziliensis* (Quintero 2013, Parada 2013). El hecho de que todos estos genes se expresen en amastigotes *in situ* es interesante ya que se trata de genes presentes en cromosomas distintos, por lo que su expresión no está relacionada ya que no hacen parte de un mismo CPG (Martínez – Calvillo *et al.* 2010). Sin embargo, es difícil asegurar a este nivel cual es la cantidad de ARNm inicial debido a que es una medición a punto final de la PCR, por lo que se propone complementar estos resultados con RTqPCR.

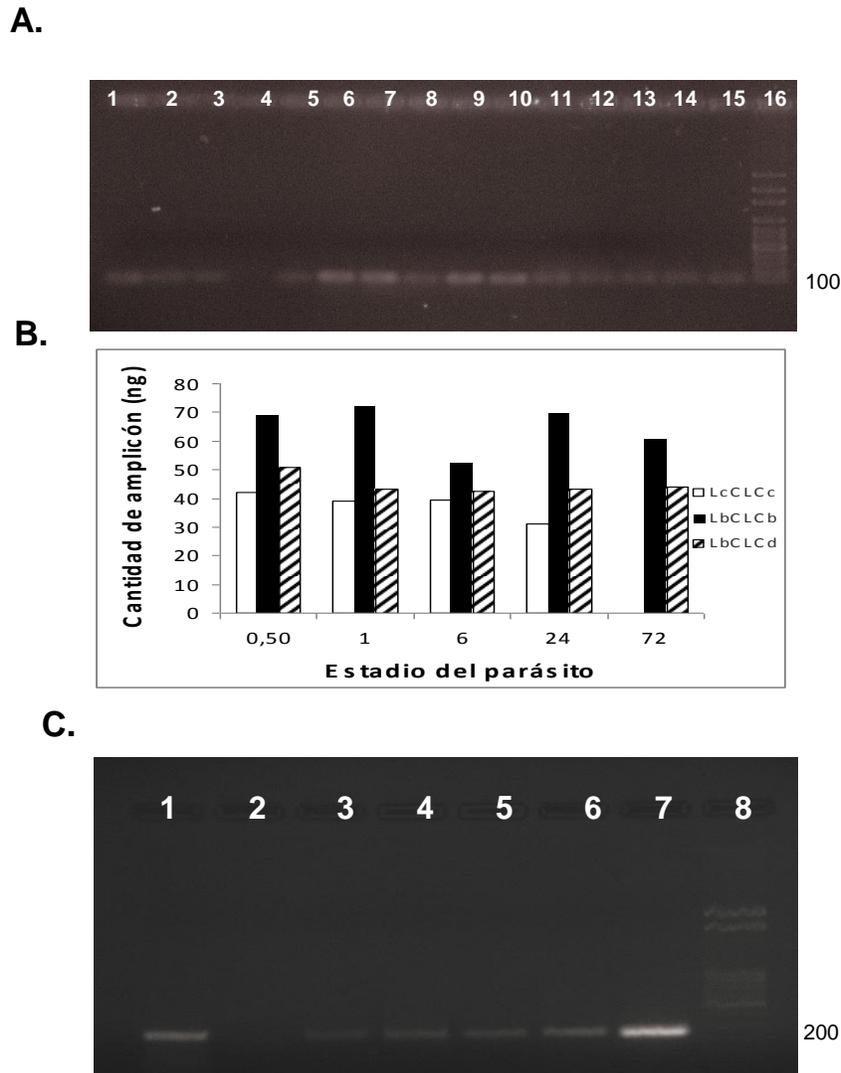


Figura 8. RT PCR que comprueban la expresión de los genes *LbCIC_B*, *LbCIC_C* y *LbCIC_D*. 1. **A.** RT PCR de *LbCIC_B1*, *LbCIC_C1*, *LbCIC_D1* (Ver tabla 1) con ADNc de cada tratamiento que amplifican como resultado un producto de 100 pb en su orden los pozos corresponden a los siguientes tratamientos *LbCIC_C.1* (1-5). 1. ½ hpi, 2. 1 hpi, 3. 6 hpi. 4. 24 hpi. 5. 72 hpi. *LbCIC_B.1* (6-10) 6. ½ hpi. 7. 1 hpi. 8. 6 hpi. 9. 24 hpi. 10. 72 hpi. *LbCIC_D.1* (11-15) 11. ½ hpi. 12. 1 hpi. 13. 6 hpi. 14. 24 hpi. 15. 72 hpi. 16. Marcador de peso Molecular 100-3000pb. **B.** Gráfica de densitometría derivada de la Figura 7A **C.** RT PCR con los primers para RTqPCR de los primers *LbCLC_B*, con los siguientes tratamientos 1. DNA Promastigotes *Lbr*. 2. cDNA J774 3. ½ hpi 4. 2 hpi 5. 6 hpi 6. 24 hpi 7. 72 hpi. 8. MPM 50 – 1000 pb Zymo.

Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

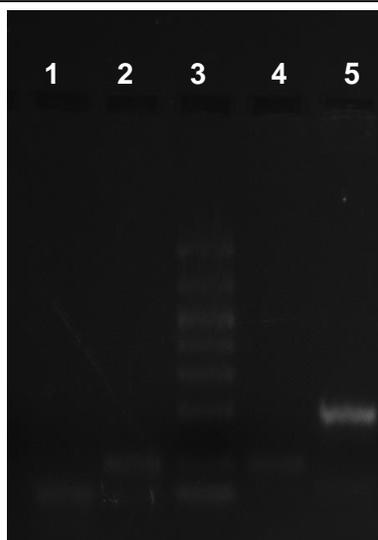


Figura 9. RT PCR con *primers LbCLC_{D3}* (ver **Tabla 6**), en promastigotes y amastigotes *in situ*. Pozos (2, 4), pertenecientes a otro experimento. 1. PCR desde promastigote en fase estacionaria . 3. Marcador de peso molecular 50 – 3000 pb de Lonza, 5. PCR desde parásitos a las 72 hpi.

Tabla 4. Cuantificación del amplicón de cada tratamiento y gen por densitometría, usando el software ImageJ. MPM, corresponde al marcador de peso molecular, cuya cantidad en ng en la banda de 100 pb es 44 ng.

Gen	Muestra	ng	Fluorescencia
	MPM	44,00	2,E+04
LbClCc	0,5 h	42,11	2,E+04
LbClCc	1h	39,03	2,E+04
LbClCc	6h	39,33	2,E+04
LbClCc	24h	30,98	2,E+04
LbClCc	72h	41,43	2,E+04
LbClCb	0,5 h	68,90	4,E+04
LbClCb	1h	71,87	4,E+04
LbClCb	6h	52,29	3,E+04
LbClCb	24h	69,46	4,E+04
LbClCb	72h	60,82	3,E+04
LbClCd	0,5 h	50,69	3,E+04
LbClCd	1h	43,32	2,E+04
LbClCd	6h	42,57	2,E+04
LbClCd	24h	43,12	2,E+04
LbClCd	72h	43,84	2,E+04

2. Generación de plásmidos para cuantificación absoluta de cada uno de los genes utilizados en el estudio.

Con el fin de tener un modelo estándar para cuantificar la cantidad de copias iniciales con cada uno de los genes evaluados en todos los tratamientos utilizados, se realizó la clonación de los productos correspondientes correspondientes a los amplicones mostrados en la [Tabla 1](#). *LbCLC_D 2* no se expresa en promastigotes por lo que se intentó hacerlo desde amastigotes *in situ*. Los plásmidos obtenidos no mostraron la secuencia esperada, por lo tanto no se logró clonar el fragmento de este gen ([Fig. 24 anexo](#)). La cantidad de ARN medida para estos ensayos con este estadio (amastigotes *in situ*) corresponde a la mezcla de ARN del macrófago y de los parásitos presentes. En vista que el primero está cuantitativamente más representado la falta de amplificación de un producto en suficiente cantidad ([Figura 8.A](#)) para la clonación podría ser resultado de baja concentración de ARN específico de *Leishmania*. Teniendo en cuenta que los otros genes si se transcriben en promastigotes estacionarios de *L. braziliensis*, se usó ADNc de este estadio para la amplificación correspondiente de amplicones que se aislaron por electroforesis en geles al 1% en buffer TAE 1X, seguido de esto se ligó y clonó en p-GEM-T-Easy para la secuencia *Lb1CLC_C.2* y Clon Jet para *LbCLC_A.2* y *LbCLC_B.2*.

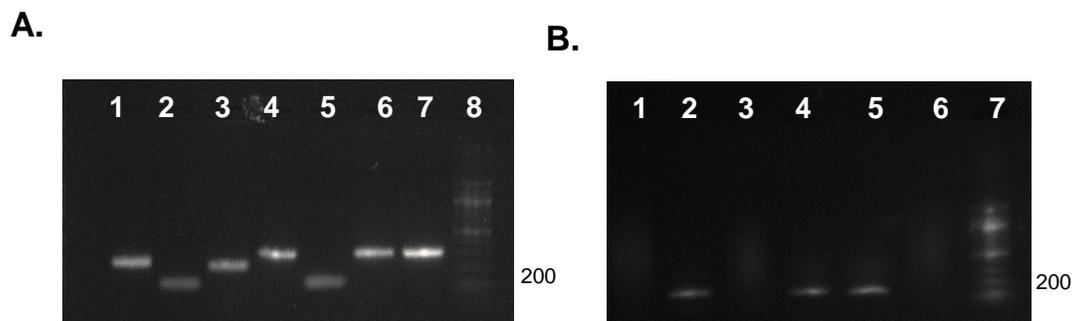


Figura 10. Clonación de la secuencia *LbCIC_A* en el vector de clonación Clon – Jet. **A.** PCR de colonia con *primers* universales dirigidos al vector ClonJet. 1. Colonia 1. 2. Colonia 2. 3. Colonia 3. 4. Colonia 4. 5. Colonia 5. 6. Colonia 6. 7. Colonia 7. 8. Marcador de peso Molecular 100 – 3000 pb. **B.** PCR de Colonia utilizando los *primers* para *LbCIC_A.2*, utilizando las mismas colonias de la figura A). 1. Colonia 1. 2. Colonia 2. 3. Colonia 3. 4. Colonia 4. 5. Colonia 5. 6. Colonia 6. 7. Colonia 7. 8. Control – H₂O. 9. Marcador de Peso Molecular 100 – 3000 pb.

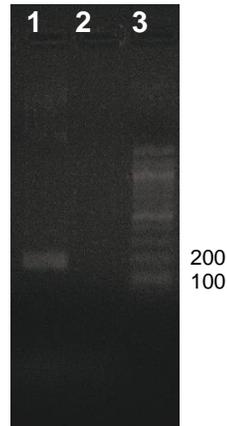


Figura 11. PCR usando como plantilla el plásmido extraído de la colonia 4 correspondiente al *LbCLC_A* (Fig 8). 1. PCR con primers *LbCLC_A* con ADN Plasmídico como plantilla de la Colonia 4. 2. Ctrl - Agua. 3. Marcador de Peso Molecular 100 - 3000 pb.

A.

B.

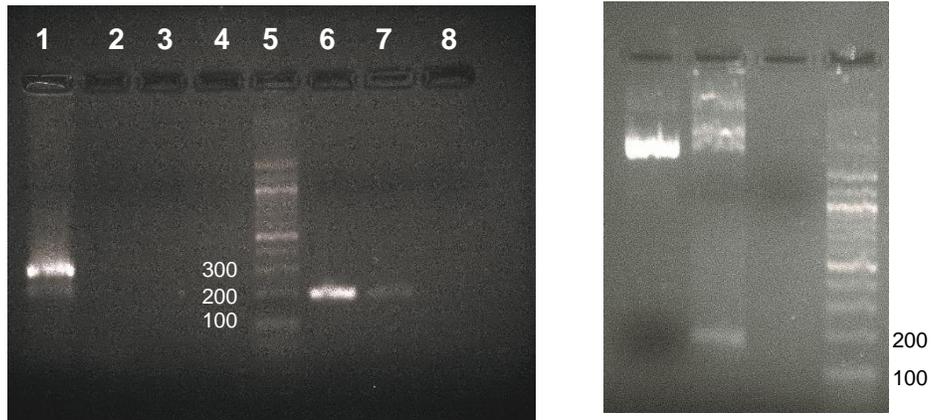


Figura 12. Clonación de la secuencia *LbCLC_{B,2}* en el vector de clonación Clon Jet. **A.** PCR de colonia con *primers* universales y específicos para la secuencia 3670.2 *Primers* universales al vector (1-3) 1. Colonia 1. 2. Colonia 2. 3. Control - Agua. 5. Marcador de Peso Molecular 100 - 3000 pb. *Primers* específicos al gen 3670.2 (6-8). 1. Colonia 1. 2. Colonia 2. 3. Control - cDNA J774. **B.** PCR desde Plásmido extraído de la colonia 1. 1. Plásmido solo. 2. Plásmido con *primers* específicos para 3670.2. 3. Control - Agua. 4. Marcador de Peso Molecular. 100 - 3000 pb.

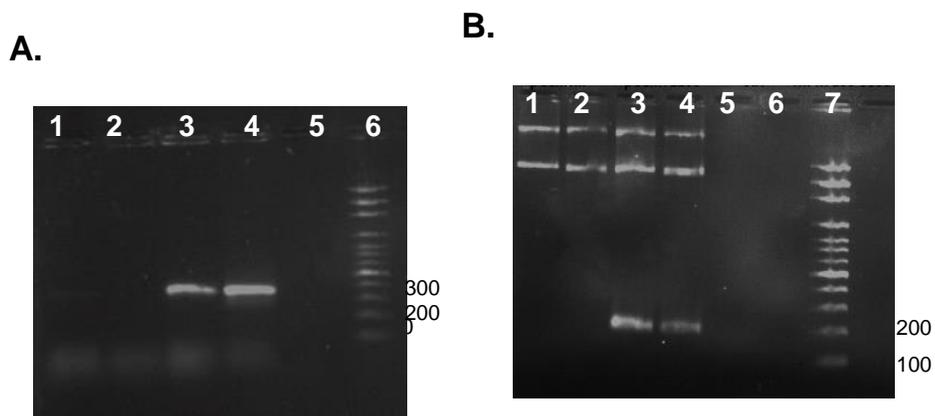


Figura 13. Clonación de la secuencia *LbCLC_c* en el vector de clonación p-GEM T Easy. **A.** PCR de colonia con *primers* universales de un producto equivalente al inserto + 100pb. 1. Colonia 1 2. Colonia 2. 3. Colonia 3. 4. Colonia 4. 5. Control – Agua en lugar de plantilla. 6. Marcador de peso molecular 100 - 3000 pb. **B.** Amplificación del amplicón 1260.2 desde plásmido extraído de las colonias transformadas. 1. Plásmido colonia 3 solo, 2. Plásmido Colonia 4 solo, 3. Plásmido colonia 3 con *primers* específicos *LbCLC_c*.2, 4. Plásmido colonia 4 con *primers* específicos 1260. 5. Control –ADNc J774.A1. 6. Control – Agua. 7. Marcador de peso molecular 100 - 3000 pb.

Posterior a la clonación de los fragmentos de los genes en colonias bacterianas *Escherichia coli* Top10 por choque térmico se seleccionaron aquellas que crecieron en el medio con antibiótico ampicilina cuya transformación fue corroborada con PCR de colonia, los cuales utilizaban *primers* universales (Fig. 10A, 12A y 13A), dirigidos a sitios pertenecientes a los promotores de los vectores de clonación utilizados en cada una de las transformaciones y *primers* específicos a las secuencias clonadas en el caso de las secuencias *LbCLC_A* y *LbCLC_B*, *LcCLC_C* (Fig. 10B y 12B). Paso seguido se aislaron los plásmidos correspondientes con la técnica de lisis bacteriana acoplada a purificación con columnas de sílice, y luego los plásmidos se utilizaron como plantilla en una reacción de PCR con los *primers* específicos para cada fragmento clonado, como control de calidad de la identidad del plásmido (Fig. 11, 12B y 13B).

Con la intención de comprobar la secuencia exacta de los insertos dentro de los plásmidos aislados se secuenciaron en la empresa Macrogen (Fig. 21, 22 y 23 anexo), mostrando que los insertos para *LbCLC_A* y *LbCLC_B*, fueron similares en un 99,5% y 100% respectivamente, a la plantilla reportada en GenBank y 100% igual a los clones previamente obtenidos en el laboratorio con los genes completos (Lozano 2012, Quintero 2013), (Fig. 14A y 14B) mientras que para *LbCLC_c* hubo una homología del 92%, con los dos plásmidos aislados, respecto a la secuencia

reportada en Genbank y a un plásmido con el gen completo *LbCLC_c* (Fig. 14C), (Parada 2013), debido a esto también se secuenciaron amplicones partiendo de ADNc de *L. braziliensis* en fase estacionaria correspondientes al gen *LbCLC_c* (Fig. 14C), que al ser comparada con los clones muestran una homología del 100%, indicándonos que la cepa utilizada tiene la misma composición genética, al menos para esta región del gen, por lo cual se decide usar estos plásmidos para las calibraciones posteriores.

Exceptuando el gen *LbCLC_c*, los fragmentos utilizados tienen una conservación alta respecto a lo reportado en el Genbank y las plantillas propias del laboratorio, por tal razón son sustratos ideales para la calibración de la PCR en tiempo real. En el caso de *LbCLC_c*, debido a que la secuencia es la misma de la cepa usada (Fig 14C), se proceden a usar para construir la curva de calibración, contra la cual cuantificar la expresión génica de *LbCLC_c*, y debido a que el objetivo del presente trabajo no es realizar estudios funcionales respecto a los genes estudiados a nivel de proteína, esto no afecta los resultados obtenidos.

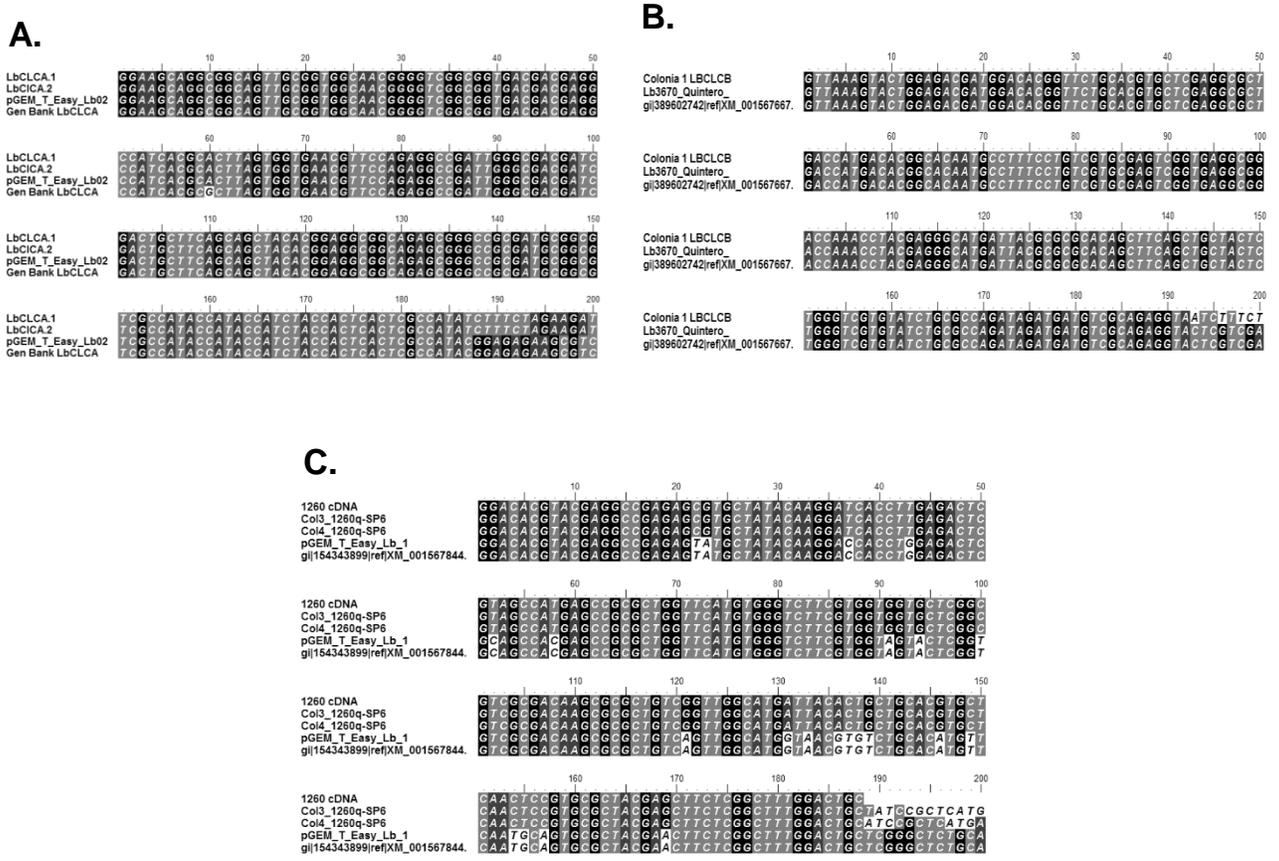


Figura 14. Alineamientos de las secuencias de los plásmidos obtenidos, **A.** Alineamiento de Secuencias Relacionadas con el Gen *LbCLCA*. En su orden de arriba hacia abajo: LbCLCA.1. Plásmido Clon 1 Con producto *LbCLCA*, *LbCLCA*. 2. Plásmido Clon 2 Con producto *LbCLCA*. 3. Plásmido con gen completo Gen *LbCLCA*. Gen Bank *LbCLCA*: Secuencia del gen completo reportado en GenBank. **B.** Alineamiento de Secuencias Relacionadas con *LbCLCB*, con el programa *Bioedit*. En orden de arriba hacia abajo. Plásmido Recombinante con fragmento de 192 pb que corresponde a *LbCLCB* (Colonia 1 LbCLCB). Gen Complejo clonado en P-GEM T Easy, (Lb 3670 Quintero). Secuencia GenBank *LbCLCB*. (gi|389602742|ref|XM_001567667.2|) *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 putative chloride channel protein (LBRM_32_3670) ARNm, complete cds). **C.** Alineamiento entre varias secuencias relacionadas con el gen *LbCICc*. De arriba hacia abajo las secuencias corresponden a: inserto dentro de dos plásmidos con el producto *LbCICc.2* (Col31260_1260q-SP6), (Col4-1260q-SP6), un plásmido previamente clonado en el laboratorio con el gen completo de *LbCICc* (pGEM_T_Easy_Lb_1) y la secuencia referencia en la cual se basó el diseño de *primers* gi|154343899|ref|XM_001567844.1| *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 putative chloride channel protein (LBRM_33_1260) mRNA, complete cds.

34 Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

3. Cuantificación de la expresión génica de algunos *LbCLC* en promastigotes y amastigotes.

Elaboración de las curvas de Calibración

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los genes evaluados en este trabajo, utilizando los clones previamente obtenidos en el capítulo anterior, que fueron confirmados por secuenciación. Se hicieron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , repitiendo cada experimento por triplicado, para establecer una curva de correlación entre el número de ciclos con la cantidad inicial del gen evaluado. Se lograron obtener curvas de calibración correspondientes a los genes *LbCLC_A* y *LbCLC_C* (Fig. 15 y 16), con un alto coeficiente de correlación y eficiencia (Fig 15C y 16C), lo que permitió cuantificar la expresión génica de *LbCLC_A* y *LbCLC_C*, en promastigotes y amastigotes *in situ* de *Leishmania*. Para el gen *LbCLC_B* la curva de calibración no es suficientemente eficiente y correlación es pobre lo que implica que la cuantificación no es confiable (Fig. 22 anexo), para utilizar la técnica de PCR en tiempo real (Chini *et al.* 2007, Pfaffl y Hageleit, 2001).

Los genes *LbCLC_A* y *LbCLC_C* se expresan en ambos estadios, en promastigotes y amastigotes en el caso de *LbCLC_A* (72hpi) (Fig 17A) y *LbCLC_C* (48hpi y 72 hpi) (Fig 18A) como también en estadios intermedios de la infección *LbCLC_A* (1hpi) (Fig 17A), y para *LbCLC_C* (½hpi, 1hpi, 2hpi, 6hpi, 24hpi) (Fig. 18A), este último a pesar de presentar una curva de pico de fusión de dos picos, tiene una identidad comprobada por secuenciación de un producto de PCR realizado con el mismo ADNc de base correspondiente al mismo gen y amplicón de interés *LbCLC_C*.2 (Tabla 1, Fig. 14C), y los dos picos podrían deberse a estados intermedios en la formación del producto de PCR.

Al comparar la cantidad de transcritos de los genes *LbCLC_A* y *LbCLC_C* se observa que es 300 veces mayor para *LbCLC_A* en promastigotes estacionarios axénicos y 1 hpi comparado con el otro gen, mientras que a las 72 hpi la cantidad de transcritos de este gen es 3 veces menor para este tiempo post-infección.

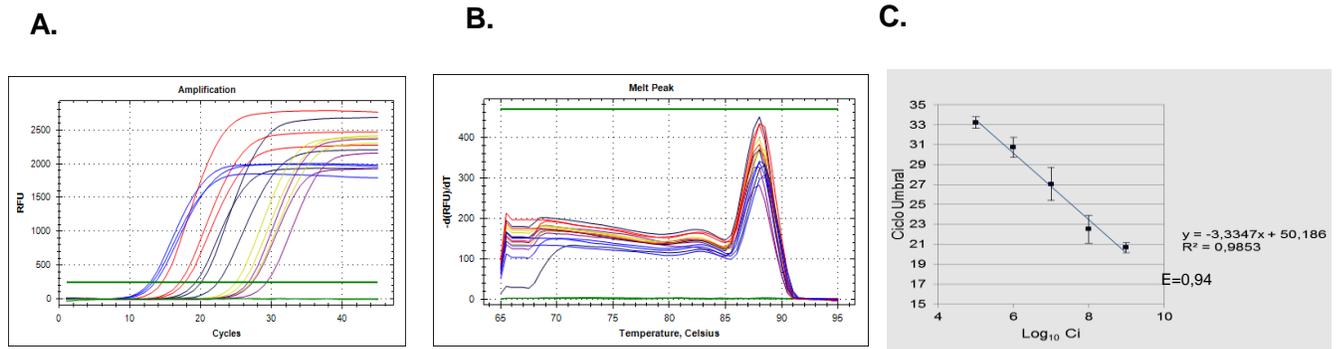


Figura 15. Elaboración de Curva de Calibración para secuencia *LbCLCA.2*. **A.** Dinámica de Amplificación de las muestras con cantidad inicial de copias: **Azul:** $1,27 \times 10^8$, **Rojo:** $1,27 \times 10^7$, **Negro:** $1,27 \times 10^6$, **Amarillo:** $1,27 \times 10^5$, **Morado:** $1,27 \times 10^4$, **Verde:** Control Negativo H_2O . **B.** Gráfico de Pico Melting del experimento. **C.** Curva de Calibración 0210.2. con ecuación de la recta. $Y = -3,3347x + 50,186$, $R^2 = 0,985$, $E = 0,94$.

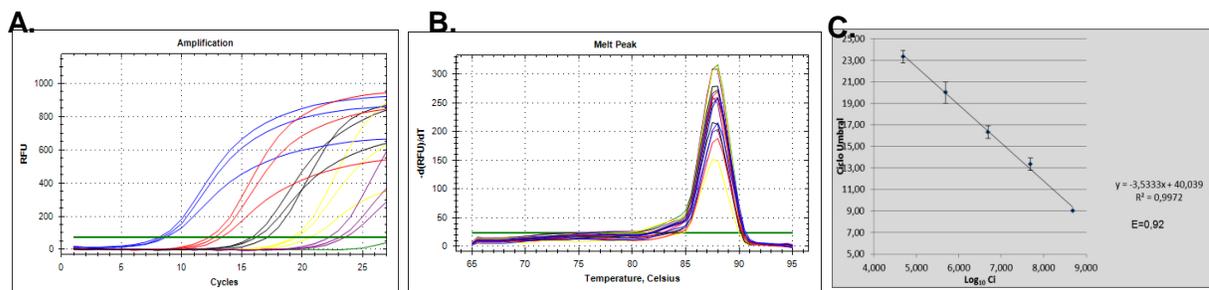


Figura 16. Curva de calibración de la secuencia *LbCLCC*, **A.** Mostrando Dinámica de amplificación de las muestras con Número inicial de copias: inicial **Azul:** $4,90 \times 10^8$, **Rojo:** $4,90 \times 10^7$, **Negro:** $4,90 \times 10^6$, **Amarillo:** $4,90 \times 10^5$, **Morado:** $4,90 \times 10^4$, **Verde:** Control Negativo H_2O . **B.** Gráfica de pico de fusión del experimento. **C.** Curva de calibración, pendiente, ecuación de la recta. Ecuación de la recta: $Y = -3,5333x + 40,039$, $R^2 = 0,99$, $E = 0,92$.

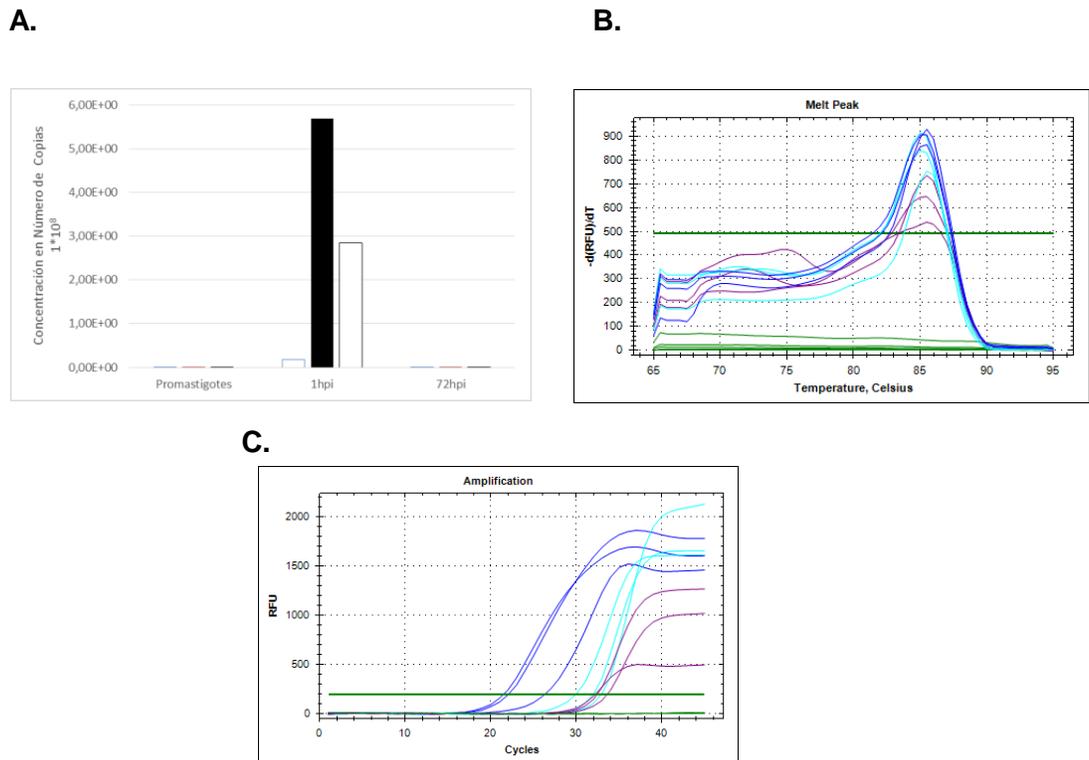


Figura 17. Niveles de expresión del canal putativo *LbCLCA* en número de copias iniciales ARNm por μL con tres experimentos independientes por punto experimental, mostrando, **A.** los niveles de ARNm por cada tiempo evaluado **Azul:** 1hpi, **Celeste:** 72hpi, **Morado:** Promastigotes Metacíclicos, **Verde:** Controles negativos ADNc J774 y H₂O **B.** Gráfica de pico de fusión del experimento. **C.** Dinámica de amplificación del experimento.

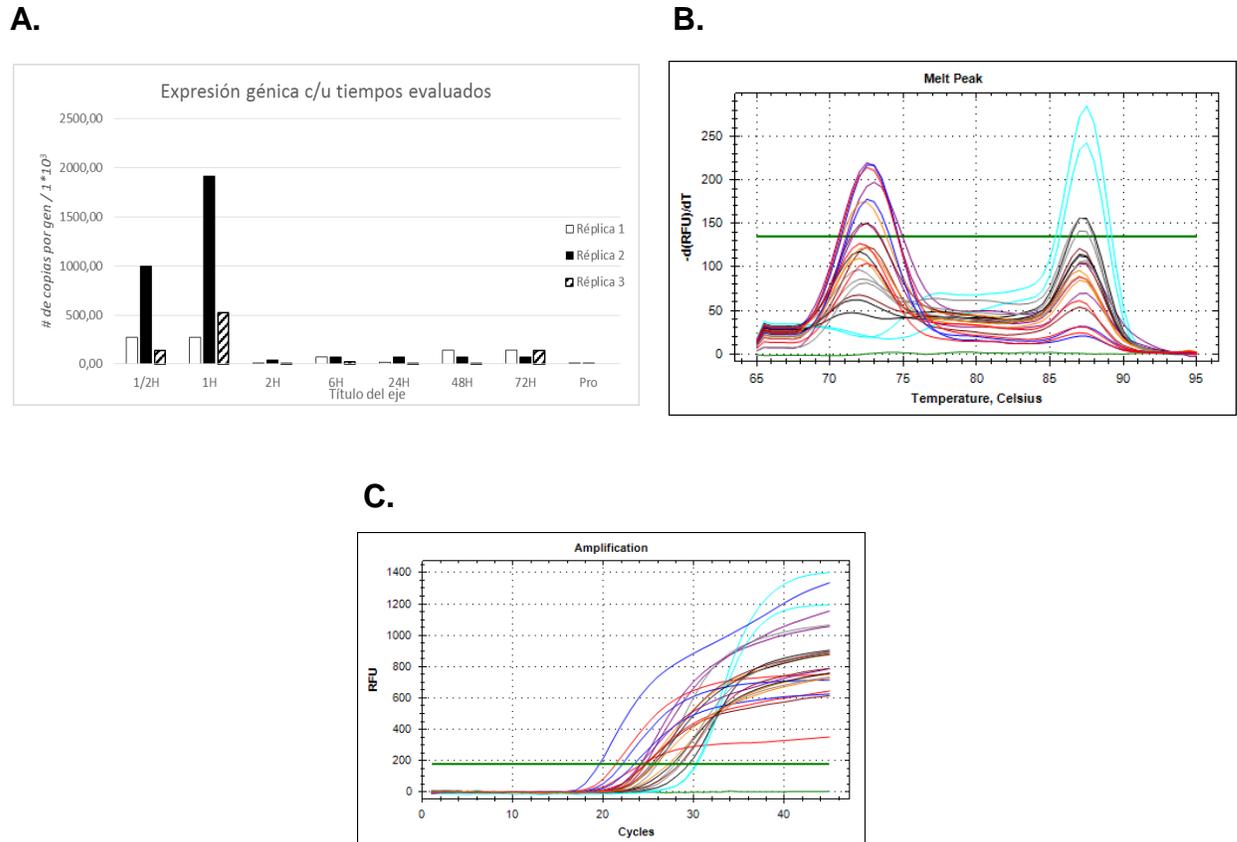


Figura 18. A. Niveles de expresión del canal putativo *LbCLC_c* en número de copias iniciales por tres réplicas Biológicas, mostrando, los niveles de ARNm por cada tiempo evaluado con los colores **Rojo:** ½ hpi, **Azul:** 1 hpi, **Gris:** 2hpi, **Naranja:** 6hpi, Negro: 24hpi, **Vinotinto:** 48 hpi, **Morado:** 72hpi, **Celeste:** Promastigotes Metacíclicos, **Verde:** Control Negativo ADNc J774. **B.** Gráfica de temperatura de fusión del experimento. **C.** Gráfica de amplificación del experimento.

La dinámica de expresión génica de los genes *LbCLC_A* y *LbCLC_c* muestra una mayor cantidad de ARNm en los tiempos ½ hpi, 1 hpi correspondientes a promastigotes en transformación, respecto a 48hpi y 72hpi que se trata de amastigotes *in situ*, que presenta diferencias respecto a promastigotes en el caso del gen *LbCLC_c* (Fig 18A), un hecho interesante desde el punto de vista biológico ya que se trata de etapas muy importantes en el ciclo de vida del parásito, pues las etapas tempranas (½hpi y 72 hpi) es donde perciben las señales que inducen la transformación de promastigote metacíclico a amastigote, mientras los amastigotes *in situ* representan una importancia clínica, por tratarse de parásitos

altamente infectivos y proliferativos. Las señales que provocarían los cambios en la expresión génica son sobre todo: pH y temperatura.

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en [Barak *et al.* 2005](#), donde se observa que la expresión de amastina A2, proteína implicada en la protección del parásito a estrés oxidativo y calórico ([McCall y Matlashewski 2012](#)) incrementa después de 1 hora de exposición a las señales de acidez y aumento en la temperatura de 25°C a 37°C, y se mantiene hasta las etapas tardías, en un sistema axénico de desarrollo del parásito, a niveles de ARNm y proteína, ratificándose que las variaciones en la expresión génica en el modelo *Leishmania* pueden ser evidenciables en tiempos bastante cortos postinfección, incluso como se muestran en estos resultados a ½hpi, tiempo de infección previamente no documentado desde el punto de vista de la expresión génica.

Lo que se puede evidenciar es un proceso de regulación genética a nivel de ARNm ([Fig. 17 y 18](#)), donde en las etapas iniciales de la infección hay un incremento en el número de copias de ambos genes ([Fig. 17 y 18](#)), lo cual nos está indicando que el parásito puede estar expresando estos intercambiadores de cloruro, como un mecanismo rápido de adaptación a las condiciones de osmolaridad ([LeFurguey *et al.* 2005](#)) y de acidez ([Marchesini y Docampo 2002](#), [Vieira, 1996](#)) de la vacuola parasitófora ([Antoine *et al.* 1999](#)), lo cual apoya la hipótesis de que este tipo de canales pueden ser importantes para las transformaciones y adaptaciones del parásito *Leishmania braziliensis* a lo largo de su ciclo de vida, de lo cual el laboratorio de Biofísica y Biología de Membranas cuenta, con evidencia adicional, como lo es el efecto que tiene el silenciamiento genético de los canales *LbCLC_A* y *LbCCLC_B*, que se relaciona con pérdida de la capacidad de recuperación del parásito a medios hipotónicos, y estancamiento en el ciclo de vida, impidiendo la transformación de promastigotes a amastigotes intracelulares y axénicos ([Zapata y García, comunicación personal](#)).

La literatura reporta en las etapas tempranas del desarrollo de amastigotes axénicos hay un incremento acentuado en la expresión a nivel de ARNm ([Lahav *et al.* 2011](#)), lo cual es visto en nuestros datos, aunque no siempre esté relacionado con los niveles de proteína ([Pélaez *et al.* 2012](#)), por lo que es necesario validar la expresión génica también a nivel proteico.

Siendo la estabilidad del ARNm tan importante en la expresión génica en *Leishmania* ([Estevez 2008](#), [Fernandez-Moya *et al.* 2014 a](#), [Fernandez-Moya *et al.* 2014 b](#)), sería interesante estudiar a futuro, si hay secuencias UTR relacionadas con la dinámica que tiene la expresión génica de estos dos canales y así mismo intentar predecir los sitios de poliadenilación del ARN, para tener una imagen más

40 Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*.

precisa de como se está regulando la expresión de estos genes y cual sería específicamente la proteína que genera.

Conclusiones y recomendaciones

Los genes *LbCIC_A*, *LbCIC_B*, *LbCIC_C*, se transcriben, en promastigotes, amastigotes intracelulares y axénicos de *Leishmania braziliensis* (Fig 6A, 7A y 7C) (Tabla 5), mientras que *LbCLC_D* solo lo hace en etapas post-infección (Fig 7A) (Tabla 5), pudiendo ser importantes para el desarrollo del parásito en su ciclo de vida.

Es posible estudiar fenómenos de expresión génica desde amastigotes intracelulares, lo cual puede ser más cercano a los datos que se tienen *in situ*, respecto a los estudios de amastigotes axénicos.

La técnica de PCR en tiempo real por cuantificación absoluta es una técnica, de alta sensibilidad, que poco a poco puede ir ganando terreno frente a la alternativa PCR en tiempo real relativa, sobre todo en procesos de infección donde cambios de expresión tanto en el hospedero como en el patógeno son abruptos.

Leishmania braziliensis cambia la expresión del gen *LbCIC_C* a nivel de ARNm, a lo largo de su ciclo de vida, lo cual es consecuente con la dinámica de expresión génica, previamente expresadas en estudios como el de [Lahav 2011](#). Sí bien los niveles de ARNm no son iguales en todos los casos con los proteicos, y menos en kinetoplastos donde la regulación génica es muy recurrente a niveles postraduccionales, este tipo de estudio abren caminos hacia la utilización de técnicas como el silenciamiento por *Knock-down*, y son un punto de entrada al entendimiento de la regulación transcripcional en parásitos, campo donde cada vez se está evidenciando un control por señales antes no tenidas en cuenta cuando se hablaba de expresión génica en Trypanosomátidos, como sensibilidad a concentraciones externas de nutrientes ([Fernandez-Moya et al. 2014 b](#)), temperatura y pH.

Tabla 5. Resumen de resultados de expresión génica de los cuatro genes estudiados.

Estadio	<i>LbCLC_A</i>	<i>LbCLC_B</i>	<i>LbCCLC_C</i>	<i>LbCIC_D</i>
Promastigote	Presente (Fig. 6A, 7A, 17A)	Presente (Quintero 2013)	Presente (Fig. 8C)	Ausente (Fig 9).
Post-infección	Presente (Fig. 7A, 17A)	Presente (Fig. 8A)	Presente (Fig. 8A, 8C, 18A)	Presente (Fig. 8A).
Amastigote (48hpi, 72hpi)	Presente (Fig. 7A, 17A)	Presente (Fig.8A)	Presente (Fig. 8A, 8C, 18A)	Presente (Fig. 8A).
Amastigote Axénico	Presente (Fig. 7A)	Presente (Fig. 8A)	Presente (Fig. 8A)	-----

Anexos

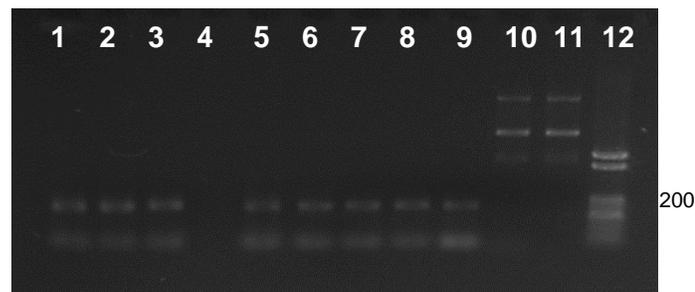


Figura 19. Calibración de primers *LbCLC_D3* y *LbCLC_D4*. Amplificación desde 72hpi, *Lbr*. Los primers CIC *LbCLC_D4*, fueron evaluados con temperaturas de anillamiento (carriles 1-4) 1. 58 °C, 2. 60,5 °C, 3. 61 °C 4. Primers *LbCLC_D3* + H₂O control (-) carriles (5-9), evaluación de los primers *LbCLC_D3* con temperaturas de anillamiento 5. 62°C, 6. 62°C, 7. 58°C, 8. 58,5°C, 9. 61°C, 10. 61,5°C. Pozos 10 y 11, plásmidos de otro experimento. 12. Marcador de peso molecular 50-3000 pb.

Tabla 6. Primers para amplificar un fragmento del gen *LbCLC_D*.

Nombre del primer	Primer Forward	Primer Reverse	Tm Fw	Tm Rv	Tamaño amplicon
<i>LbCLC_D3</i>	CCAAATGCGTCGATCTCTTC	GTGTTGCCATTCTCCACCAT	60,74	60,79	200
<i>LbCLC_D4</i>	CTGTCCATCGCAACTAAGGAT	GTGTTGCCATTCTCCACCAT	59,21	60,79	233

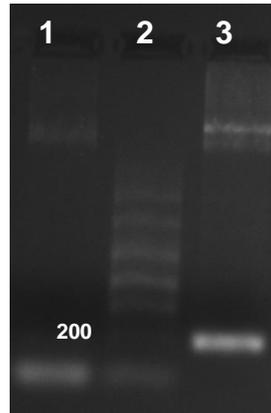


Figura 20: Amplificación desde plásmido con inserto *LbCLC_{D3}*. 1. Digestión con BamHI del plásmido con inserto *LbCLC_{D3}* la cual no fue exitosa, 2 marcador de peso molecular 100 pb – 3000 pb. 3. Amplificación de un producto esperado de 200 pb correspondiente a *LbCLC3* (Tabla 6).

```

3B_T7 10 20 30 40 50
      G G A T G G C T C G A G T T T T C A G C A A G A T G T T A A A G T A C T G G A G A C G A T G G A C

3B_T7 60 70 80 90 100
      A C G G T T C T G C A C G T G C T C G A G G C G C T G A C C A T G A C A C G G C A C A A T G C C T T

3B_T7 110 120 130 140 150
      T C C T G T C G T G C G A G T C G G T G A G G C G G A C C A A A C C T A C G A G G G C A T G A T T A

3B_T7 160 170 180 190 200
      C G C G C G C A C A G C T T C A G C T G C T A C T C T G G G T C G T G T A T C T G C G C C A G A T A

3B_T7 210 220 230 240 250
      G A T G A T G T C G C A G A G G T A A T C T T T C T A G A A G A T C T C T A C A A T A T T C T C A

3B_T7 260 270 280 290 300
      G C T G C C A T G G A A A A T C G A T G T T C T T C T T T A T T C T C T C A A G A T T T T C A G G

3B_T7 310 320 330 340 350
      C T G T A T A T T A A A C T T A T A T T A A G A A C T A T G C T A A C C A C C T C A T C A G G A A

3B_T7 360 370 380 390 400
      C C G T T G T A G G T G G C G T G G G T T T T C T T G G C A A T C G A C T C T C A T G A A A A C T A

3B_T7 410 420 430 440 450
      C G A G C T A A A T A T T C A A T A T G T T C C T C T T G A C C A A C T T T A T T C T G C A T T T T

3B_T7 460 470 480 490 500
      T T T T G A A C G A G G T T T A G A G C A A G C T T C A G G A A A C T G A G A C A G G A A T T T T A

3B_T7 510 520 530 540 550
      T T A A A A A T T T A A A T T T G A A G A A G T T C A G G G T T A A T A G C A T C C A T T T T T

3B_T7 560 570 580 590 600
      T G C T T T G C A A G T T C C T C A G C A T T C T T A A C A A A A G A C G T C T C T T T T G A C A T

3B_T7 610 620 630 640 650
      G T T T A A A G T T T A A A C C T C C T G T G T G A A A T T A T T A T C C G C T C A T A A T T C C A

3B_T7 660 670 680 690 700
      C A C A T T A T A C G A G C C G G A A G C A T A A A G T G T A A A G C C T G G G G T G C C T A A T G

3B_T7 710 720 730 740 750
      A G T G A G C T A A C T C A C A T T A A T T G C G T T G C G C T C A C T G C C A A T T G C T T T C C

3B_T7 760 770 780 790 800
      A G T C G G G A A A C C T G T C G T G C C A G C T G C A T T A A T G A A T C G G C C A A C G C G C G

3B_T7 810 820 830 840 850
      G G G A G A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T C G C T C A C T G A

3B_T7 860 870 880 890 900
      C T C G C T G C G C T C G G T C G T T C G G C T G C G G C G A G C G G T A T C A G C T C A C T C A A

3B_T7 910 920 930 940 950
      A G G C G G T A A T A C G G T T A T C C A C A G A A T C N G G G A T A A C G C A G G A A A G A A C A

3B_T7 960 970 980 990 1000
      T G T G A G C A A A G G C C A G C A A A G G C C A G G A A C C G T A A A A G G C G C G T T G C T G G

3B_T7 1010 1020 1030 1040 1050
      C G T T T T C C A T A G G N N C G N C C C C T G A C G A G C A T C A N A A A A T C G A C G C T C A

3B_T7 1060 1070 1080 1090
      A G T C N G A N G T G G C N A A N C C G A C N G G A C T A N N A G A T N C N G G C G T T T C C C C

```

Figura 21. Secuencia *LbCLC β 2* obtenida en ADN plasmídico.

```

2A_T7   10      20      30      40      50
        G A T G G C T C G A G T T T T T C A G C A A G A T G G A A G C A G G C G G C A G T T G C G G T G G C
2A_T7   60      70      80      90     100
        A A C G G G G T C G G C G G T G A C G A C G A G G C C A T C A C G C A C T T A G T G G T G A A C G T
2A_T7  110     120     130     140     150
        T C C A G A G G C C G A T T G G G C G A C G A T C G A C T G C T T C A G C A G C T A C A C G G A G G
2A_T7  160     170     180     190     200
        C G G C A G A G C G G G C C G G A T G C G G C G T C G C C A T A C C A T A C C A T C T A C C A C T
2A_T7  210     220     230     240     250
        C A C T C G C C A T A T C T T T C T A G A A G A T C T C C T A C A A T A T T C T C A G C T G C C A T
2A_T7  260     270     280     290     300
        G G A A A A T C G A T G T T C T T C T T T A T T C T C T C A A G A T T T T T C A G G C T G T A T A T
2A_T7  310     320     330     340     350
        T A A A A C T T A T A T T A A G A A C T A T G C T A A C C A C C T C A T C A G G A A C C G T T G T A
2A_T7  360     370     380     390     400
        G G T G G C G T G G G T T T T C T T G G C A A T C G A C T C T C A T G A A A A C T A C G A G C T A A
2A_T7  410     420     430     440     450
        A T A T T C A A T A T G T T C C T C T T G A C C A A C T T T A T T C T G C A T T T T T T T G A A C
2A_T7  460     470     480     490     500
        G A G G T T T A G A G C A A G C T T C A G G A A A C T G A G A C A G G A A T T T T A T T A A A A T
2A_T7  510     520     530     540     550
        T T A A A T T T T G A A G A A A G T T C A G G G T T A A T A G C A T C C A T T T T T G C T T T G C
2A_T7  560     570     580     590     600
        A A G T T C C T C A G C A T T C T T A A C A A A A G A C G T C T C T T T T G A C A T G T T T A A A G
2A_T7  610     620     630     640     650
        T T T A A A C C T C C T G T G T G A A A T T A T T A T C C G C T C A T A A T T C C A C A C A T T A T
2A_T7  660     670     680     690     700
        A C G A G C C G G A A G C A T A A A G T G T A A A G C C T G G G G T G C C T A A T G A G T G A G C T
2A_T7  710     720     730     740     750
        A A C T C A C A T T A A T T G C G T T G C G C T C A C T G C C A A T T G C T T T C C A G T C G G G A
2A_T7  760     770     780     790     800
        A A C C T G T C G T G C C A G C T G C A T T A A T G A A T C G G C C A A C G C G C G G G G A G A G G
2A_T7  810     820     830     840     850
        C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T C G C T C A C T G A C T C G C T G C
2A_T7  860     870     880     890     900
        G C T C G G T C G T T C G G C T G C G G C G A G C G G T A T C A G C T C A C T C A A G G C G G N A A
2A_T7  910     920     930     940     950
        T A C N G T T A T C C A C A G A A T C A G G G G A T A A C G C A N A A N G A C A T G T G A G C A A A
2A_T7  960     970     980     990
        G G C N A G C A A A G G C C A G G A C C G N A A A A A G G C G G T T G C T G G C G T T T T T

```

Figura 22. Secuencia *LbCLC_A2* obtenida en ADN plasmídico.

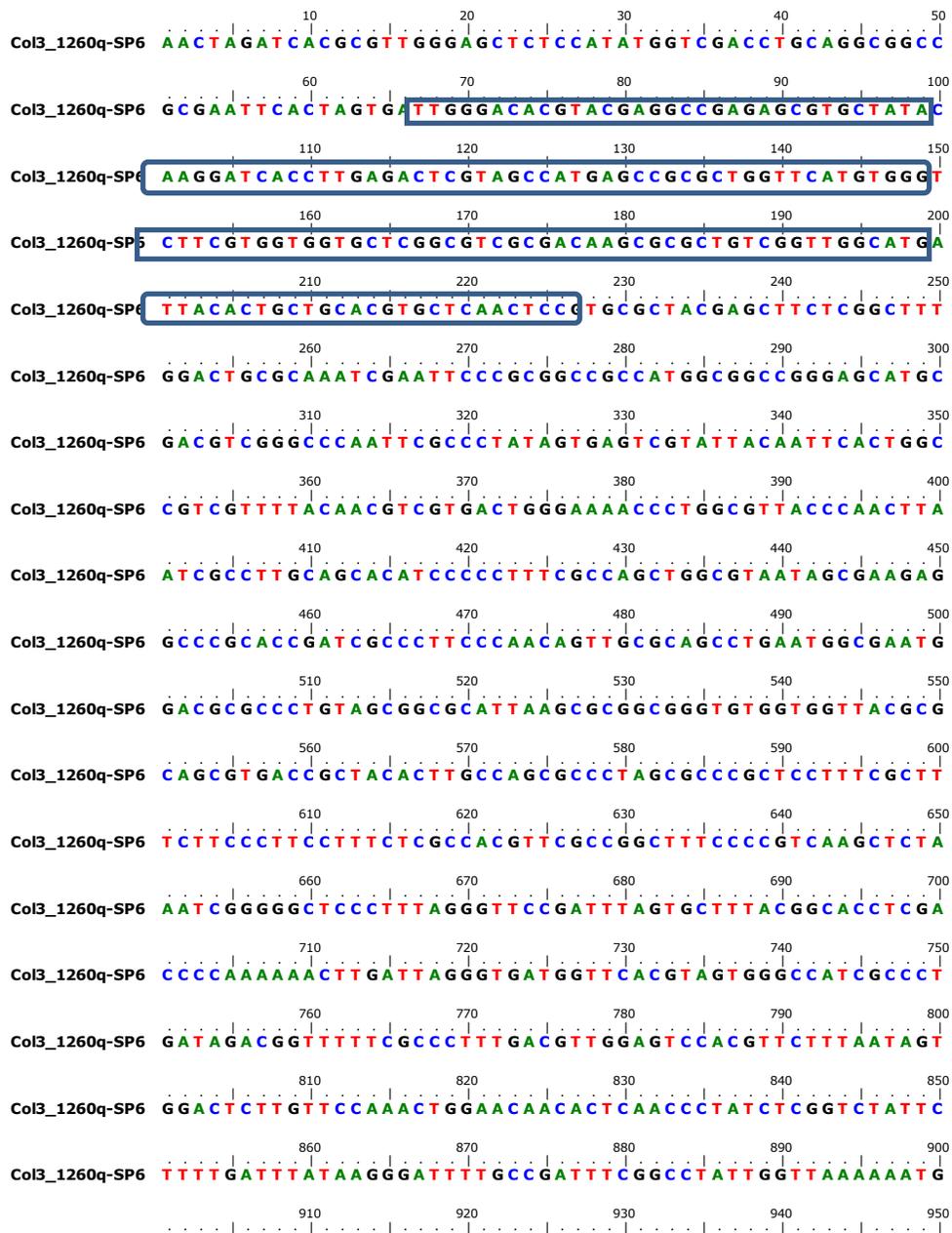


Figura 23. Secuencia *LbCLC2* obtenida en ADN plasmídico.

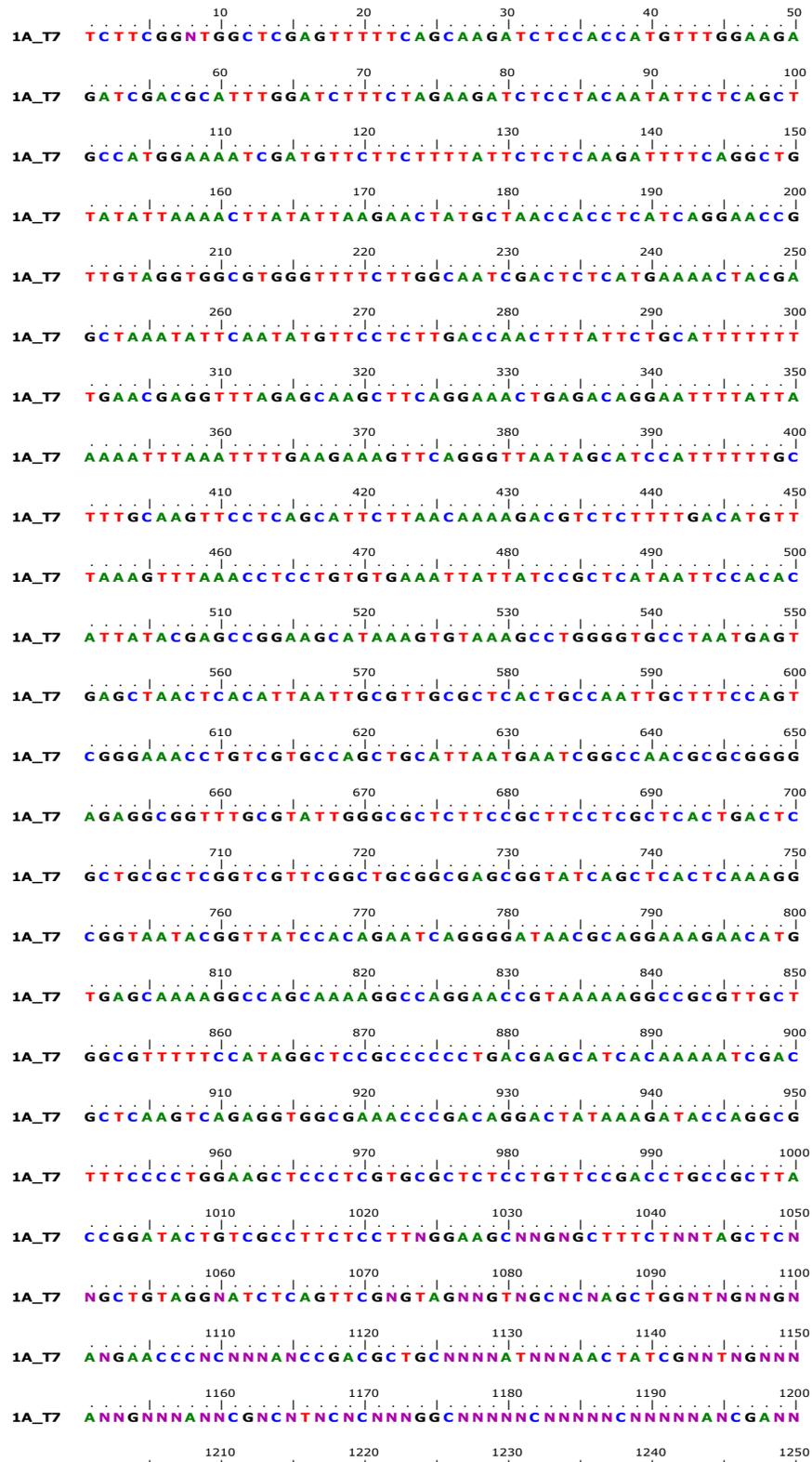


Figura 24. Secuencia *LbCLC_{D3}* obtenida en ADN plasmídico, donde no se obtuvo el producto deseado.

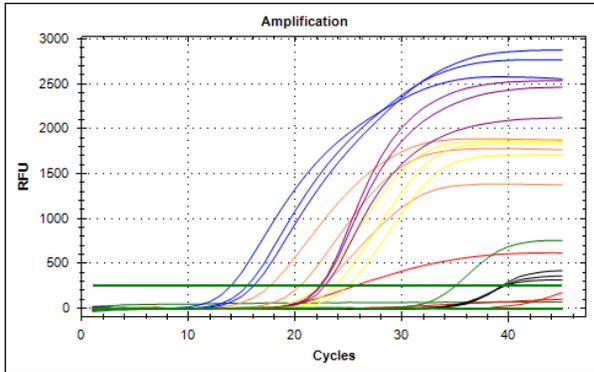
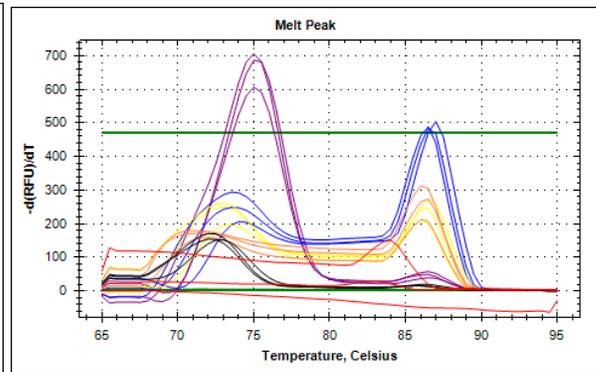
A.**B.**

Figura 25. Curva de calibración *LbCLC_B*. **A.** Mostrando que la amplificación no fue efectiva. **B.** genera una curva de tipo melting con varios picos.

Bibliografía

- Agabian, N.. *Trans* splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 1990. 61:1157–1160.
- Antoine J C, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun*. 1990. 58(3): 779–787.
- Bakker y Grunwald. Ion Transport in Parasitic Protozoa. *J. exp. Biol*. 1992.172: 311-322.
- Barak E , Amin-Spector S, Gerliak E, Goyard S, Holland N, Zilberstein D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 May;141(1):99-108.
- Barnes RL, Shi H, Kolev NG, Tschudi C, Ullu E. Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in *Trypanosoma brucei* and provides insight into the core machinery. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002678. doi: 10.1371/journal.ppat.1002678.
- Belli SI. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol*. 2000 May;30(6):679-87.
- Boelaert.M . Socio-economic aspects of neglected diseases: sleeping sickness and visceral leishmaniasis. 2010. *Annals Of Tropical Medicine And Parasitology*. 2010.104-545-552.
- Bonifáz-Peréz D, Sosa L, y Choquehuanca Q. Diagnóstico de leishmaniasis cutánea por Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de material genético obtenido de frotis de lesión teñidos con Giemsa. *BIOFARBO*, 2011: 28-38.
- Boucher N., Wu Y., Dumas C. Wu Y, Dumas C, Dube M , Sereno D , Breton M, Papadopoulou B. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element, *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277, (22): 19511–19520,
- Buitrago. J. Estudio de la expresión de proteínas en el modelo *Leishmania*-Macrófago con énfasis en canales iónicos. Tesis de Maestría. Departamento de Química. 2014.
- CDC. 2012. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>, consultado en Julio del 2012.

Chini V, Foka A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Nov;45(5):479-84.

Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15, 532-53. 1993.

Croft, S, y Coombs G. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in parasitology*, 2003: 502-508.

Estevéz. AM. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, No. 14 4573–4586 . 2008.

Fairlamb A y Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol*. 46: 695–729. 1992.

Fernández-Moya SM, Carrington M, Estévez AM a) Depletion of the RNA-Binding Protein RBP33 Results in Increased Expression of Silenced RNA Polymerase II Transcripts in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*. 9(9): e107608. doi:10.1371/journal.pone.0107608. 2014.

Fernández-Moya SM, Carrington M, Estévez AM b) A short RNA stem–loop is necessary and sufficient for repression of gene expression during early logarithmic phase in trypanosomes. *Nucleic Acids Research*, 2014, Vol. 42, No. 11 7201–7209.

Forero ME, Marín M, Llano I, Moreno H, Camacho M. *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. *J Membr Biol*. 170: 173-180.

Furger A, Schurch N, Kurath U, Roditi I. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation, *Molecular and Cellular Biology*, 17, no. 8, pp. 4372–4380. 1997.

Gupta N, Goyal N, Rastogi A K. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *TRENDS in Parasitology*. 2001. 17: 150-153.

Haile S y Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Dec;10 (6):569-77.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, 6:986-994.

INS. Boletín Epidemiológico Semanal, semana No 47 del año 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2047.pdf>. Consultado el 30 de noviembre del año 2014.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 2002;82:503-568.

Kolev NG, Franklin JB, Carmi S, Shi H, Michaeli S, Tschudi C. The Transcriptome of the Human Pathogen *Trypanosoma brucei* at Single-Nucleotide Resolution. *PLoS Pathog.* Sep 2010; 6(9): e1001090.

Lagos L, Moran O, Camacho M. *Leishmania amazonensis*: Anionic currents expressed on oocytes upon microinjection of mRNA from the parasite. *Exp Parasitol.* 2007; 116:163-170.

Lahav T, Sivam D, Volpin H, Ronen M, Tsigankov P, Green A, Holland N, Kuzyk M, Borchers C, Zilberstein D, Myler PJ. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. *FASEB J.* 2011.25(2):515-525. doi: 10.1096/fj.10-157529.

Li Q, Zhao Y, Ni B, Yao C, Zhou Y, Xu W, Zhaoxia W, Gao W, Gao Z. Comparison of the expression profiles of promastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania donovani* using serial analysis of gene expression. *Parasitol Res.* 2008. 103:821–828.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell.* 2003 Oct;2(5):830-40.

Lodish H, Beerk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York; W. H.

Lozano Jiménez Y.Y, Posada ML, Forero ME, Camacho M. El canal de cloruro putativo *LbrM01_V2.0210* de *Leishmania* genera corrientes de cloruro sensibles a pH y osmolaridad. *Biomédica.* 2011;31(sup.3):23-205:106.

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.

Marchesini N & Docampo RA. Plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;119:225-236.

Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. 2003 11(5):1291-1299.

Martínez-Calvillo, S, Juan C. Vizuet-de-Rueda, Luis E. Florencio-Martínez, Rebeca G. Manning-Cela, Elisa E. Figueroa-Angulo. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010. Pages 1-15. doi:10.1155/2010/525241.

Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*. 1994 Feb 15;8(4):491-501.

Montoya G. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en el modelo *Leishmania* macrófago. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias - Química. Universidad Nacional de Colombia. 2010.

Moore, S. Pancreatic DNase. *The Enzymes*, Volume 14A, P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York, 281. 1981.

Morales NM y Roberts JF. A comparative study of the ribonucleic acids of three species of trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol B* 1978;59:1-4.

Murray H, Berman J, Davies C, Saravia N. Advances In Leishmaniasis. *Lancet*. 2005; 366: 1561–1577.

Niño A, Camacho M. *Leishmania braziliensis* replication rates in vitro culture rely on folic acid availability. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:309-310.

Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science*. 2010;328(5984):1398-401.

Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine and International Health*, 2001 6: 874-882.

Overbergh L, Valck X D, Waer M y Mathieu C. Quantification of murine Cytokine using real time quantitative reverse transcriptase. *Cytokine*. 1999., 11, 4 305–312.

Paff M y Hageleit M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 23: 2001. 275–282.

Parada O, Camacho M, Posada ML; Estudio molecular y bioinformático de un canal iónico de cloruro en *Leishmania braziliensis*. XXIX Congreso Latinoamericano de Química XVI Congreso Colombiano de Química –VI Congreso Colombiano de Cromatografía; 2010.

Parada O. Comportamiento electrofisiológico en un sistema heterólogo de la proteína putativa codificada por el gen *LbrM.33.1260* de *Leishmania* mediante la técnica *patch clamp*. 2013. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia.

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, , , White B, Thurston S, , 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 Jul; 39(7):839-47.

pGEM-T Easy Vector System. Promega.

<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>. 2010. [Consultado el 3 de Agosto del 2014].

Peláez RG, Muskus CE, Cuervo P, Marín-Villa M. Differential expression of proteins in *Leishmania (Viannia) panamensis* associated with mechanisms of resistance to meglumine antimoniate. *Biomedica*. 2012 Sep;32(3):418-29.

Promega. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual.

<http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20protocol.pdf>. 2010. [Consultado el 22 de Agosto del 2014].

Quijada L, Guerra-Giraldez C, Drozd M, Hartmann C, Irmer H, Ben-Dov C, Cristodero M, Ding M, Clayton C. Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res*. 2002 Oct 15;30(20):4414-24.

Rastrojo A, Carrasco-Ramiro F, Martín D, Crespillo A, Reguera RM, Aguado B, Requena JM. The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics*. 2013 Apr 4;14:223. doi: 10.1186/1471-2164-14-223.

Thermo Scientific. (<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedfiles/resources/k1230-product-information.pdf>). 2012". [Consultado el 3 de Agosto del 2014].

Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 165 (2009) 32–47.

Vieira L, Slotki I, Cabantchik ZI. Chloride conductive pathways which support electrogenic H⁺ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J Biol Chem*. 1995;270:5299-5304.

Vieira LI, Lafuente E, Gamarro F, Cabantchik Z. An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem J*. 1996;319:691-697.

Ullu, E, Mathews, K, R, Tschudi, C. Temporal Order of RNA-Processing Reactions in Trypanosomes: Rapid trans Splicing Precedes Polyadenylation of Newly Synthesized Tubulin Transcripts. *Mol Cell Biol*. 1993 Jan;13(1):720-725.

Yuan J, Reed A, Chen F, Stewart Cn Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006, 7:85.

Zilberstein D, Dwyer DM. Protonmotive force-driven active transport of D-Glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *PNAS*. 1985.Mar;82(6):1716-20.

