

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio de oligomerización y
mecanismos de regulación génica de
la enzima nicotinamida/nicotinato
mononucleótido adenilil transferasa
de *Leishmania braziliensis***

Bryan Steven Rojas Ramos

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

2023

Estudio de oligomerización y mecanismos de regulación génica de la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis*

Bryan Steven Rojas Ramos

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

Magister en Ciencias - Bioquímica

Director:

Luis Ernesto Contreras Rodríguez Dr. Sc.

Línea de Investigación:

Bioquímica

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica - LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2023

*Lo que sabemos es una gota de agua,
lo que ignoramos es el océano*

Isaac Newton

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a la Universidad Nacional de Colombia por permitirme educarme en sus aulas durante mi pregrado en el departamento de ingeniería química y en mi posgrado en el departamento de química. Al grupo de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ) por abrir sus puertas proporcionándome el material, los reactivos, los espacios, los equipos para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a todos y cada uno de los profesores que me enseñaron en mi posgrado los conocimientos necesarios en la bioquímica. A la facultad de Ciencias, al profe Edgar Reyes y a la profe Nohora por haberme permitido ser estudiante auxiliar del curso de venenos. A la facultad de Ingeniería, al grupo innvaTE y en especial a el grupo de trabajo (el profe Alfonso, Ricardo y Paula) por las enseñanzas y la colaboración prestada durante mi estancia en el grupo.

A la Dirección de Investigación y Extensión de la Sede Bogotá por el apoyo bajo el proyecto de investigación “innovando metodologías: desarrollo de un sistema de infección in vitro de macrófagos murinos con parásitos fluorescentes de *Leishmania braziliensis*”. Al grupo de investigación en hormonas GIH por la orientación, dedicación y por acogerme para realizar las actividades de este proyecto.

A mi familia por el apoyo y amigos especialmente a Oscar, Carolina, Erica y a mis Perritos calientes (Nata, Angie, Esneider, Sebastián, Carito) por su ayuda y apoyo moral durante todo mi posgrado.

A toda la familia LIBBIQ: Esteban Chacón, Cony, Luis David, Laurita, Luisa, Jesús Esteban, Cristian, Valentina, Sharon, Miguel Ángel y a Alex por sus enseñanzas dentro del

laboratorio y fuera de él. A Rosalbita a la Doc Magda y a la profe María Helena por sus aportes.

Y, por último, resalto el gran aporte de mi profesor Luis Ernesto Contreras porque sin él nada de esto podría haber sido posible. Gracias por cada planeación experimental, gracias por cada momento que sacó para poderme explicar cada tema que me era difícil de entender, gracias por preocuparse por mi bienestar, gracias por tenerme en cuenta para todo e infinitas gracias por no solo haber sido mi orientador y docente sino por convertirse en un amigo.

Resumen

Estudio de oligomerización y mecanismos de regulación génica de la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis*

La Leishmaniasis es una enfermedad que puede manifestarse en tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral, siendo causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, del cual se conocen 22 especies patogénicas para el hombre. Según la Organización Mundial de la Salud, anualmente se registran 1,3 millones de casos, siendo Colombia uno de los países afectados, donde circulan varias especies, incluyendo *Leishmania braziliensis*.

Actualmente, no se dispone de vacunas aprobadas para la prevención de la Leishmaniasis y el tratamiento de primera línea, como son los antimoniatos pentavalentes, generan diversos y graves efectos adversos destacándose nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y mialgias. Adicionalmente, se ha reportado la aparición de cepas farmacorresistentes. Por lo tanto, se requiere la exploración de nuevas dianas terapéuticas, como, por ejemplo, la síntesis del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), que se destaca como una ruta metabólica promisoría, dada la importancia de este transportador electrónico.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la obtención y caracterización de las proteínas del metabolismo del NAD de protozoarios como *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *L. braziliensis*. Específicamente en *Leishmania*, se han realizado trabajos para la caracterización de proteínas como la NAD quinasa y la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (*LbNMNAT*); sin embargo, estos estudios se han enfocado principalmente en su actividad enzimática y estructura cuaternaria en ausencia de sustratos.

En este trabajo se analizó el efecto que ejercen los sustratos de la enzima *LbNMNAT* sobre su oligomerización, encontrándose que sus organizaciones en forma de dímeros, trímeros

y tetrámeros, no es modificada por la presencia de los sustratos analizados. Esta evidencia estructural es concordante con la cinética de tipo *Michaelis-Menten* reportada para la enzima, puesto que los sustratos no ejercen regulación homo-trópica sobre la *LbNMNAT*.

Por otro lado, considerando que uno de los principales niveles de regulación de expresión génica en los tripanosomátidos es post-transcripcional, entonces se efectuó una aproximación bioinformática basada en la identificación de sitios aceptores de *splicing*, para delimitar las regiones no codificantes (UTRs) del gen *lbnmnat*. En este sentido, se encontraron numerosos sitios aceptores que podrían generar UTRs de diferentes longitudes, como se ha reportado para otras especies del parásito.

Adicionalmente, se identificaron 29 proteínas de unión a ARN (RBPs) con probabilidad de reconocer dichas UTRs, las cuales participan en procesos diversos como *splicing*, poliadenilación y represión post-transcripcional. De este modo, se indican proteínas que posiblemente explican las diferencias reportadas por otros autores para la abundancia del transcrito del gen *lbnmnat* a través del ciclo biológico de *L. braziliensis*.

Con el propósito de comprobar experimentalmente algunos de los hallazgos bioinformáticos de este trabajo, se implementó la técnica de Retro-Transcripción acoplada a PCR (RT-PCR), partiendo del ARN obtenido de promastigotes de *L. braziliensis*, para identificar los UTRs asociados al gen *lbnmnat* en este estadio del parásito. Dicha técnica permitió la síntesis de ADN complementario apropiado para el estudio de UTRs y la amplificación de un producto de menor tamaño al esperado para el UTR 5'. Este resultado indica la necesidad de determinar la secuencia exacta del amplicón mediante eventuales técnicas de aislamiento y secuenciamiento de ADN.

En conclusión, el presente trabajo aporta evidencia experimental y bioinformática acerca del efecto estructural que ejercen los sustratos de la enzima *LbNMNAT* sobre su oligomerización y acerca de sus UTRs y proteínas de unión, que podrían explicar mecanismos de regulación de la expresión del gen *lbnmnat* en el parásito *L. braziliensis*.

Palabras clave: Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, NAD, *LbNMNAT*, oligomerización, regulación post-transcripcional, UTRs, RBPs.

Abstract

Study of oligomerization and mechanisms of gene regulation of the enzyme nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyl transferase from *Leishmania braziliensis*

Leishmaniasis is a disease that can manifest in three clinical forms: cutaneous, mucocutaneous, and visceral. This illness is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. There are 22 human pathogenic species. According to the World Health Organization, 1.3 million cases are recorded annually. Colombia is one of the affected countries, where several species circulate, including *Leishmania braziliensis*.

Currently, there are no approved vaccines available for the prevention of Leishmaniasis, and first-line treatment, such as pentavalent antimonates, generate various and serious adverse effects, including nephrotoxicity, hepatotoxicity, and myalgia. Additionally, drug-resistant strains have been reported. Therefore, the exploration of new therapeutic targets is required, such as the synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), which stands out as a promising metabolic pathway, since the importance of this electronic transporter.

In recent years, our research group has focused on obtaining and characterizing NAD metabolism proteins from protozoa such as *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *L. braziliensis*. Specifically, in *Leishmania* research has been carried out to characterize these kinds of proteins: NAD kinase and nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyl transferase (*LbNMNAT*); however, these studies have mainly focused on their enzymatic activity and quaternary structure in the absence of substrates.

In this Thesis, the effect of the substrates of the *LbNMNAT* enzyme on its oligomerization was analyzed, finding that its organizations in the form of dimers, trimers, and tetramers, is

not modified by the presence of the analyzed substrates. This structural evidence is consistent with the *Michaelis-Menten* kinetics reported for the enzyme since the substrates do not exert homotropic regulation on LbNMNAT.

On the other hand, considering that one of the main levels of regulation of gene expression in trypanosomatids is post-transcriptional, a bioinformatics approach based on the identification of *splicing* acceptor sites was carried out to delimit the non-coding regions (UTRs) of the *lbnmnat* gene. In this sense, numerous acceptor sites were found that could generate UTRs of different lengths, as has been reported for other species of the parasite.

Additionally, 29 RNA-binding proteins (RBPs) were identified with a probability of recognizing these UTRs, which participate in various processes, for instance, *splicing*, polyadenylation, and post-transcriptional repression. In this way, this study indicates proteins that possibly explain the differences reported by other authors for the abundance of the *lbnmnat* gene transcript throughout the life cycle of *L. braziliensis*.

In order to experimentally verify some of the bioinformatic findings of this work, the Retro-Transcription coupled to PCR (RT-PCR) technique was implemented, starting from the RNA obtained from *L. braziliensis* promastigotes, to identify the UTRs associated with the *lbnmnat* gene in this stage of the parasite. This technique allowed the synthesis of complementary DNA appropriate for studying UTRs and amplifying a product smaller than expected for the 5' UTR. This result indicates the need to determine the exact sequence of the amplicon by possible DNA isolation and sequencing techniques.

In conclusion, the present work provides experimental and bioinformatic evidence about the structural effect of the LbNMNAT enzyme's substrates on its oligomerization and its UTRs and binding proteins, which could explain mechanisms of regulation of the expression of the *lbnmnat* gene in the parasite *L. braziliensis*.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, NAD, LbNMNAT, oligomerization, post-transcriptional regulation, UTRs, RBPs.

Contenido

1. La Leishmaniasis	3
1.1 Marco teórico	3
1.2 Dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD).....	7
1.3 Nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT)	10
2. Oligomerización de la LbNMNAT	16
2.1 Oligomerización en proteínas	16
2.1.1 La oligomerización como una herramienta de regulación	17
2.1.2 La importancia de oligomerización de las proteínas a nivel farmacológico.....	18
2.2 Antecedentes de la estructura cuaternaria en las NMNAT	19
3. Regulación génica	21
3.1 Regulación al inicio de la transcripción.....	21
3.2 Controles post-transcripcionales	22
3.3 Regulación en el transporte desde el núcleo	22
3.4 Localización en el citosol.....	23
3.5 Regulación génica en Tripanosomátidos	23
4. Justificación	26
5. Planteamiento del problema	28
6. Objetivos	30
6.1 Objetivo general	30
6.2 Objetivos específicos	30
7. Hipótesis	31
8. Metodología	32
8.1 Esquema general de la metodología para el objetivo específico 1	32
8.2 Metodología detallada para el objetivo específico 1	33
8.2.1 Expresión de la enzima recombinante 6xHis-LbNMNAT	33
8.2.2 Purificación de la enzima recombinante 6xHis-LbNMNAT	34
8.2.3 Expresión y purificación de la enzima recombinante NMNAT humana 3 (6xHis-HsNMNAT3).....	34
8.2.4 Ensayos enzimáticos acoplados	35

8.2.5	Ensayos enzimáticos directos	35
8.2.6	Análisis de estructura cuaternaria mediante geles PAGE nativos.....	35
8.2.7	Electroforesis en gel de AGAROSA nativo	36
8.2.8	Cromatografía de exclusión de alta eficiencia (SEC-HPLC)	36
8.2.9	Análisis de estructura cuaternaria mediante geles PAGE nativos en presencia de ketoconazol.....	37
8.3	Esquema general de la metodología para el objetivo específico 2	37
8.3.1	Selección de la secuencia de trabajo	38
8.3.2	Análisis de sitios aceptores de <i>splicing</i>	38
8.3.3	Identificación de proteínas de unión a ARN (RBPs)	38
8.4	Esquema general de la metodología para el objetivo específico 3	39
8.4.1	Extracción de ARN a partir de promastigotes	39
8.4.2	Síntesis de cDNA	40
8.4.3	Amplificación de las regiones 3' y 5' UTR.....	41
9.	Resultados	42
9.1	Resultados objetivo específico 1	42
9.1.1	Obtención de clones que expresan las proteínas 6xHis- <i>Lb</i> NMNAT y 6xHis- <i>Hs</i> NMNAT3.....	42
9.1.2	Purificación y ensayos de actividad de las enzimas 6xHis- <i>Lb</i> NMNAT y 6xHis- <i>Hs</i> NMNAT3.....	45
9.1.3	La 6xHis- <i>Lb</i> NMNAT exhibe estructura cuaternaria en PAGE Nativos	50
9.1.4	La etiqueta de histidinas altera interacciones con la fase estacionaria en SEC- HPLC	55
9.1.5	La presencia de Ketoconazol no altera la estructura oligomérica de la 6xHis- <i>Lb</i> NMNAT	59
9.2	Resultados objetivo específico 2.....	62
9.2.1	El análisis bioinformático sugiere la presencia de diferentes sitios de <i>splicing</i>	63
9.2.2	Las UTRs del gen <i>lbnmnat</i> identificadas presentan motivos de unión a RBPs	68
9.3	Resultados objetivo específico 3.....	74
9.3.1	El protocolo de extracción de ARN permite la obtención de cDNA	74
9.3.2	Optimización de la temperatura de anillamiento para la UTRs del transcrito del gen <i>lbnmnat</i>	76
10.	Discusión de resultados.....	79
10.1	Efecto de los sustratos en la oligomerización de la <i>Lb</i> NMNAT.....	80
10.2	Estudio bioinformático de las UTRs del gen <i>lbnmnat</i>	84
10.3	Verificación experimental de las UTRs obtenidas <i>in silico</i>	87
11.	Conclusiones y recomendaciones	88
11.1	Conclusiones	88
11.1.1	Conclusiones específicas	88
11.2	Recomendaciones	89

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	5
Figura 2. Compuesto DNDi-0690. Nitroimidazol	6
Figura 3. Rutas de síntesis del NAD.	9
Figura 4. Identificación de las inserciones de la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i>	11
Figura 5. Aspectos estructurales de las NMNATs.....	13
Figura 6. Estructura cuaternaria de algunas NMNATs.....	20
Figura 7. Proceso de transcripción y maduración de ARNm en tripanosomátidos..	25
Figura 8. Metodología general usada para la realización del primer objetivo.....	32
Figura 9. Metodología general usada para la realización del objetivo específico 2.	37
Figura 10. Metodología general usada para la realización del tercer objetivo.....	39
Figura 11. Se aislaron colonias de las cepas M-15 y BL21 apropiadas para la expresión de proteínas recombinantes.	45
Figura 12. Las colonias aisladas M-15 y BL21 expresan las proteínas 6xHis- <i>LbNMNAT</i> y 6xHis-HsNMNAT3, respectivamente.	43
Figura 13. El protocolo IMAC permite la purificación parcial de las proteínas 6xHis- <i>LbNMNAT</i> y 6xHis-HsNMNAT3).....	45
Figura 14. Los ensayos enzimáticos acoplados directos confirman la actividad de las proteínas 6xHis- <i>LbNMNAT</i> y 6xHis-HsNMNAT3.....	47
Figura 15. Cromatogramas fracción soluble de partida para la purificación de la 6xHis- <i>LbNMNAT</i> y la 6xHis-HsNMNAT3.	48
Figura 16. Los geles nativos de acrilamida muestran que la 6xHis- <i>LbNMNAT</i> se oligomeriza.	50
Figura 17. Diagrama de Ferguson.....	52
Figura 18. La 6xHis-HsNMNAT3 está cargada positivamente en los geles de agarosa.	56

Figura 19. Curva Log MW vs Kav.....	57
Figura 20. Cromatograma cromatografía de exclusión de tamaño de la 6xHis-LbNMNAT y 6xHis-HsNMNAT3	58
Figura 21. Cambio de oligomerización de la NMNAT de <i>B. anthracis</i> debido a la unión del compuesto de clase 3.	60
Figura 22. La presencia del ketoconazol no afecta la oligomerización de la 6xHis-LbNMNAT.	61
Figura 23. La expresión a nivel de transcrito del gen <i>lbnmnat</i> en la cepa de referencia de <i>L. braziliensis</i> MHOM/BR175/M2904 varía en el ciclo de vida promastigote.	63
Figura 24 . El sitio de <i>splicing</i> predicho por los los servidores <i>web</i> presenta el motivo <i>polypyrimidine tract</i> característico de los aceptores de <i>splicing</i>	64
Figura 25. Determinación de las UTRs 5' y 3' del gen <i>lbnmnat</i>	67
Figura 26. Clasificación de las RBPs ortólogas que se unen posiblemente a las regiones no codificantes del gen <i>lbnmnat</i>	72
Figura 27. Resumen de las RBPs de unión de las regiones no codificantes del gen <i>lbnmnat</i>	73
Figura 28. El protocolo de extracción de ARN y síntesis de cDNA en <i>L. braziliensis</i> permiten la amplificación del control de α -Tubulina.	75
Figura 29. Las condiciones de reacción para la UTR del extremo 5' del transcrito del gen <i>lbnmnat</i> permiten aislar un producto de alrededor de 80 pares de bases.	77
Figura 30. Parámetros enzimáticos de la 6x-HisLbNMNAT.....	80
Figura 31. Modelación <i>in silico</i> de la proteína LbNMNAT y 6xHis-LbNMNAT.....	83
Figura 32. Las condiciones de ausencia de purinas en <i>L. donovani</i> generan un aumento la expresión del gen <i>ldnt3</i> , pero no varían las longitudes de la UTR del extremo 3' del gen.....	85

Lista de tablas

Tabla 1. Principales inhibidores de la NMNATs humanas y NadD de <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus anthracis</i>	14
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación de las UTRs.....	41
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las enzimas <i>LbNMNAT</i> y <i>HsNMNAT3</i>	45
Tabla 4. Tabla de purificación de las 6xHis- <i>LbNMNAT</i> y 6xHis- <i>HsNMNAT3</i>	49
Tabla 5. Factor de retención medido para las proteínas patrón.....	51
Tabla 6. Valores de la ecuación de la recta -log Rf vs % acrilamida.....	51
Tabla 7. Factor de retención medidos para la 6xHisLbNMNAT incubada con sus sustratos y productos.....	53
Tabla 8. Oligómeros formados por la 6xHis-LbNMNAT en presencia o ausencia sustratos.....	54
Tabla 9. Carga calculada para la 6xHis- <i>LbNMNAT</i> y 6xHis- <i>HsNMNAT3</i> mediante los programas Propit y Proteín Caculator v3.4.....	55
Tabla 10. Parámetros usados para SEC-HPLC.....	57
Tabla 11. Coeficientes de partición (K_{av}) de las proteínas patrón y las NMNATs recombinantes.....	57
Tabla 12. Sitios más probables de <i>splicing</i> para la región intergénica 5' obtenidos mediante los programas NetGene2 - 2.42, BDGP y SpliceRover.....	64
Tabla 13. Sitios más probables aceptores de <i>splicing</i> para la región intergénica 3' obtenidos mediante los programas NetGene2 - 2.42, BDGP y SpliceRover.....	66
Tabla 14 En la UTR 3' del transcrito del gen <i>lbnmnat</i> se predice el motivo <i>polypyrimidine tract</i> característico de los aceptores de <i>splicing</i>	66
Tabla 15. Proteínas identificadas en la región UTR del extremo 5' del gen <i>lbnmnat</i>	69
Tabla 16. Proteínas identificadas en la región UTR del extremo 3' del gen <i>lbnmnat</i>	70

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
6xHis- <i>Hs</i> NMNAT3	Isoenzima 3 de la Nicotinamida/nicotinato adenilil transferasa de <i>Homo Sapiens</i> recombinante con etiqueta de 6 hitidinas en extremo N-terminal.
6xHis- <i>Lb</i> NMNAT	Nicotinamida/nicotinato adenilil transferasa de <i>Leishmania braziliensis</i> recombinante con etiqueta de 6 hitidinas en extremo N-terminal.
ADNg	ADN genómico.
AMP	Adenina mono fosfato.
ARN	Ácido ribunucleico.
BSA	Albúmina de suero bovino.
cDNA	ADN complementario al ARN.
DEPC	Pirocarbonato de dietilo, usada para inhibir las posibles ARNasas.
<i>Hs</i> NMNAT1	Isoenzima 2 de la Nicotinamida/nicotinato adenilil transferasa de <i>Homo Sapiens</i> .
<i>Hs</i> NMNAT3	Isoenzima 3 de la Nicotinamida/nicotinato adenilil transferasa de <i>Homo Sapiens</i> .
K_{av}	Coefficiente de partición.
K_m	Constante de Michaelis Menten.
K_r	Coefficiente de retardo.
<i>Lb</i> NMNAT	Nicotinamida/nicotinato adenilil transferasa de <i>Leishmania braziliensis</i> .
<i>lbnmnat</i>	Gen de la Nicotinamida/nicotinato adenilil transferasa de <i>Leishmania braziliensis</i> .
<i>Lb</i> α -Tb	Alfa tubulina de <i>Leishmania braziliensis</i> .

LdNT3	Transportador 3 de purinas en <i>L. donovani</i> .
LmGAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>L. Major</i> .
min	Minutos.
mL	Mililitros.
MW	Peso molecular.
NA	Ácido nicotínico.
NAAD	Dinucleótido de ácido nicotínico y adenina.
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina.
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
Nam	Nicotinamida.
NAMN	Mononucleótido del ácido nicotínico.
NamPRT/NAMPT	Fosforibosil transferasa de la Nam.
NAR	Ribósido del NA.
NMN	Nucleótido de nicotinamida.
NMNAT	Nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa.
NR	Ribósido del Nam.
PARPs	Polimerasas de poli (ADP-ribosa).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDB	Protein data bank.
PRPP	Fosforibosil pirofosfato.
QA	Ácido quinolínico.
QAPRT	Fosforibosil transferasa del QA.
RBPs	Proteínas de unión a ARN: <i>RNA bilding protein</i> en inglés.
Rf	Factor de retención.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
UTR	Secuencias no codificantes. <i>Untranslated region</i> en inglés.
V ₀	Volumen vacío de la columna.

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad provocada por protozoarios del género *Leishmania* [1], [2] la cual no tiene una vacuna aprobada [3], [4], [5] por lo que solo se tratan sus síntomas a través de medicamentos; sin embargo, estos presentan efectos adversos como mialgias, nefrotoxicidad, daños al corazón e hígado [6], [7], debido a estos efectos se requiere la exploración de nuevas dianas terapéuticas, en este sentido se han propuesto diferentes rutas metabólicas en el parásito como la ruta de salvamento de purinas, biogénesis de peroxisomas, glicolisis, el mecanismo redox de la tioredoxina y el metabolismo del NAD [8].

El NAD es un metabolito presente como cofactor de reacciones metabólicas, puntualmente en las reacciones redox; no obstante, no es su única función ya que también está presente en la señalización celular y en la reparación del ADN siendo en este caso sustrato [9]. Dada su importancia a nivel celular y su gasto en reacciones donde actúa como sustrato, las células han desarrollado dos vías para su síntesis: la síntesis de *novo* y la de reciclaje [10]. Estas dos vías convergen a una misma enzima, la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) cuya función es transferir un grupo adenilo al mononucleotido de nicotidamida o de ácido nicotínico [11].

La NMNAT es una proteína globular que se ha encontrado en todos los organismos la cual presenta oligomerización o, dicho de otro modo, presenta estructura cuaternaria, esto se aprecia en las estructuras cristalográficas que se encuentran en el *Protein Data Bank* (PDB) como el dímero presentado por la NMNAT de *B. anthracis* (PDB:3HFJ) [12], el trímero característico de la NMNAT de *E. coli* (PDB: 1K4M) [13] o el tetramero de NMNAT de la isoforma 3 de humano (NMNAT3) (PDB: 1NUR) [14]. Esta enzima ha sido de gran interés puesto que se ha encontrado que es el paso controlante de la ruta metabólica, por lo que se han diseñado fármacos que la inhiben para el control de patógenos que afectan

el ser humano como *B. anthracis* sin afectar la función de la NMNAT de su hospedero [12].

Sin embargo, hasta el momento no se han hecho estudios del efecto de los sustratos en la oligomerización de la NMNAT por lo que se hace necesario el estudio del efecto de los sustratos en la oligomerización de la NMNAT procedente de *Leishmania braziliensis* (*Lb*NMNAT) con el fin de entender posible regulación metabólica mediante la oligomerización. Los estudios de la estructura cuaternaria se hacen mediante la aproximación de los geles nativos de acrilamida (PAGE) y la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-HPLC).

Por otro lado, se estudia la regulación génica del gen de la *nmnat* en este parásito entendiendo posibles regulaciones a nivel post-transcripcional mediante herramientas informáticas, prediciendo posibles sitios de *trans-splicing* y de corte en el extremo 5' y 3' del gen. Este tipo de estudio es relevante ya que en el parásito *Leishmania* la regulación, contrario a lo que pasa en eucariontes superiores, es a nivel post-transcripcional y entender este tipo de procesos e identificar las posibles proteínas de unión a ARN podrían ser de interés para el control de la enfermedad.

1. La Leishmaniasis

1.1 Marco teórico

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que incluye diferentes formas clínicas, las cuales pueden comprometer la piel (leishmaniasis cutánea), las mucosas (leishmaniasis mucocutánea) y los órganos internos (leishmaniasis visceral); debido a la infección por protozoarios del género *Leishmania*, transmitidos por la picadura de mosquitos de la subfamilia Phlebotominae. Actualmente, se conocen 22 especies del parásito capaces de afectar al hombre. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que más de mil millones de personas residen en zonas endémicas (regiones tropicales y subtropicales), registrándose 1,3 millones de nuevos casos anualmente [2].

En el continente americano, para el año 2.021 se reportaron 39.585 casos de la enfermedad, siendo Brasil el país con mayor número de infectados (16.509), seguido por Colombia (6.182) y Perú (5.201) [15], [16]. Para el año 2.022 en Colombia, se registraron 4906 casos [17]. El presupuesto colombiano del año 2.022 para la adquisición de medicamentos contra la leishmaniasis fue de \$ 2.000 millones de pesos, indicando la importancia de la enfermedad en la salud pública del país [18].

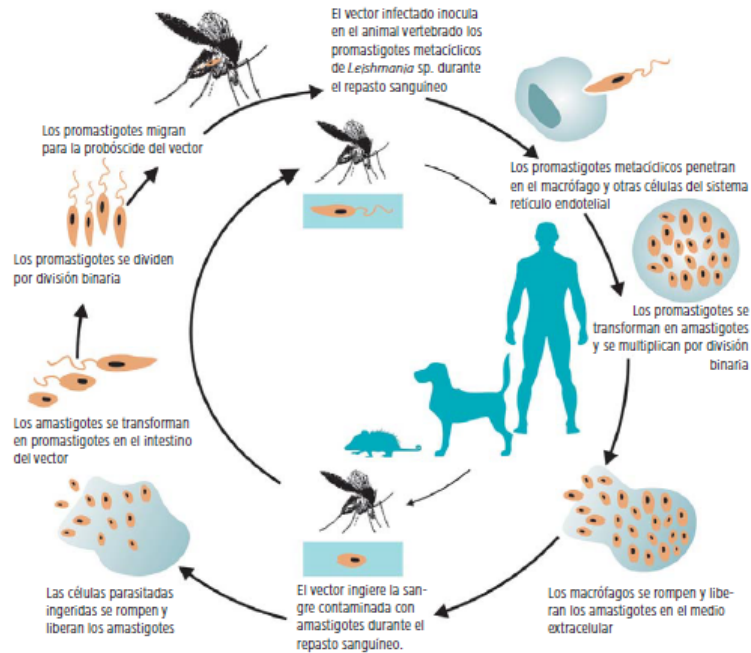
La leishmaniasis cutánea es causada por la mayoría de las especies del parásito que generan máculas que se extienden hasta convertirse en úlceras, susceptibles de coinfección con otros microorganismos. La forma mucocutánea, la cual es causada en su mayoría por *L. braziliensis*, se caracteriza por producir lesiones desfigurativas de las mucosas. Por su parte, la forma visceral, causada por *L. infantum* y *L. donovani*, genera infecciones e inflamación de órganos internos como el bazo (esplenomegalia) y el hígado

(hepatomegalia), principalmente, afectando también la médula ósea y causando cuadros graves de anemia. En el caso de no recibir tratamiento, la leishmaniasis visceral puede ocasionar la muerte en el 95% de los casos [2].

Específicamente *L. braziliensis* se ha identificado en Ecuador [19], Venezuela [20], Perú [21], Paraguay, Brasil [22], Guyana Francesa [23], Argentina [24] y Colombia. En nuestro territorio, está presente en 26 departamentos siendo Meta el que cuenta con el mayor número de contagios, seguido por Cundinamarca y Caquetá [25]. Los militares son la mayor población afectada, encontrándose que el 65,9% de los casos reportados por este grupo son infectados por *L. braziliensis* [26]. Esta especie no solo infecta humanos, sino que también puede infectar otros mamíferos como la paca, el mono tití [27], roedores [28] y animales domésticos como los perros [29].

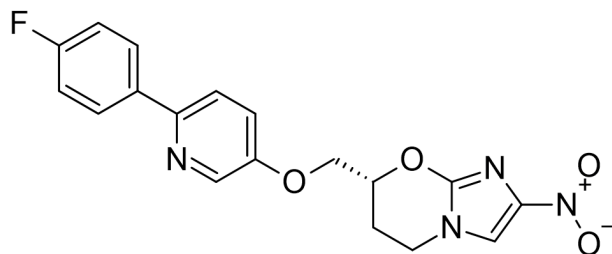
Las diferentes especies de *Leishmania* exhiben dos formas o estadios en su ciclo de vida, una forma alargada llamada promastigote, la cual presenta un flagelo que le permite el movimiento dentro del intestino del insecto vector, y una forma amastigote ovalada, inmóvil e intracelular, que reside en el fagolisosoma del macrófago del hospedero. La transmisión desde el insecto hacia el hospedero humano tiene lugar cuando las hembras de la subfamilia Phlebotominae infectadas con el parásito se alimentan de la sangre del hospedero e inoculan promastigotes en la dermis. Al ser inoculados, los parásitos son fagocitados por macrófagos, en cuyo interior se completa la diferenciación celular de promastigote a amastigote [2], debido a las condiciones de pH y temperatura a las que se expone el patógeno dentro del fagolisosoma [30]. En la **Figura 1** se presenta el ciclo de vida del parásito.

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania sp.* Se describen los principales eventos que permiten completar el ciclo de vida del parásito. Entre los hospederos mamíferos se incluyen el ser humano, perros y zarigüeyas. Tomado de [2].



Actualmente, no existe una vacuna efectiva para el tratamiento de la leishmaniasis y el control del vector ha sido limitado, siendo el uso de medicamentos la estrategia usual para el manejo de la enfermedad. Diferentes rutas metabólicas se han enfocado como posibles blancos terapéuticos, por ejemplo: el reciclaje de purinas, la biogénesis de peroxisomas, la glicólisis y el sistema de defensa anti-oxidante basado en el tripanotión (metabolito compuesto por dos moléculas de glutatión unidas por un conector de espermidina) [8]. El tratamiento farmacológico actual se basa en compuestos pentavalentes que contienen antimonio (estibogluconato de sodio, *Pentostam*® y N-metil-glucamina, *Glucantime*®) [31], anfotericina B y mitelfosina [32]; sin embargo, estos presentan desventajas como su toxicidad y la aparición de cepas resistentes [4]. Otros fármacos incluyen algunos imidazoles, capaces de inhibir la síntesis de ergosterol al unirse y bloquear a la enzima lanosterol-14- α -demetilasa del patógeno [33]. Recientemente, la iniciativa “Medicamentos para Enfermedades Olvidadas” ha avanzado en el uso de compuestos nitroimidazólicos derivados para el tratamiento de la leishmaniasis, como en el caso del compuesto DNDI-0690 (**Figura 2**), el cual se encuentra en Fase I de estudios clínicos [34].

Figura 2. Compuesto DNDi-0690. Nitroimidazol derivado en Fase I desde 2019 [34].



Considerando las desventajas de los medicamentos actuales para tratar la enfermedad, es necesario investigar nuevas rutas bioquímicas que representen blancos farmacológicos promisorios, en ese sentido la ruta de biosíntesis del NAD podría resultar interesante para el control efectivo de la leishmaniasis.

1.2 Dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD)

Las reacciones de oxido-reducción son esenciales para la vida, puesto que con estas se puede obtener energía y sintetizar compuestos importantes para los microorganismos, como bases nitrogenadas, aminoácidos y ácidos grasos. Una de las moléculas protagonistas en este tipo de reacciones es el dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), el cual es utilizado como coenzima en múltiples rutas metabólicas, dada su capacidad de actuar como agente aceptor y donador de electrones (agente oxidante y reductor, respectivamente), en reacciones catalizadas por enzimas oxido-reductasas o deshidrogenasas [35], [36].

Junto con su forma fosforilada (NADP), el NAD es una molécula implicada tanto en rutas catabólicas como anabólicas de gran relevancia a nivel celular. Entre las rutas catabólicas podemos destacar la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones. De la misma manera, podemos citar como ejemplos anabólicos; la síntesis de ácidos grasos, bases nitrogenadas y aminoácidos [37].

Adicionalmente, el NAD participa en la regulación de la expresión génica mediada por sirtuinas, deacetilasas que dependen del NAD para modificar de manera postraduccional histonas y otros sustratos. Así mismo, el NAD es utilizado en la reparación del ADN, gracias a polimerasas de poli (ADP-ribosa) (PARPs), que reclutan la maquinaria de reparación ante daños moderados de la doble hélice de ADN [38].

La estructura del NAD incluye dos nucleótidos (**Figura 3**), la adenina mono fosfato (AMP) y el nucleótido de nicotinamida (NMN), unidos entre sí por un enlace fosfodiéster. La AMP está constituida por la base nitrogenada adenina, una purina, unida en el nitrógeno 9 a la ribosa 5' fosfato. Por su lado, el nucleótido de nicotinamida está compuesto por una piridina sustituida en el carbono 3 por un grupo carbamilo, enlazada por su nitrógeno a la ribosa 5' fosfato. Debido a la presencia de la piridina, el NAD y el NADP se denominan nucleótidos

de piridina. En cuanto a su reactividad, como se mencionó anteriormente, estas moléculas son coenzimas de múltiples deshidrogenasas, las cuales participan en procesos de sustracción o adición de un par de hidrógenos en los sustratos. El NAD en su forma oxidada (NAD⁺) es capaz de aceptar uno de los dos protones en forma de ión hidruro, mientras que el protón remanente se libera en el medio de reacción [39].

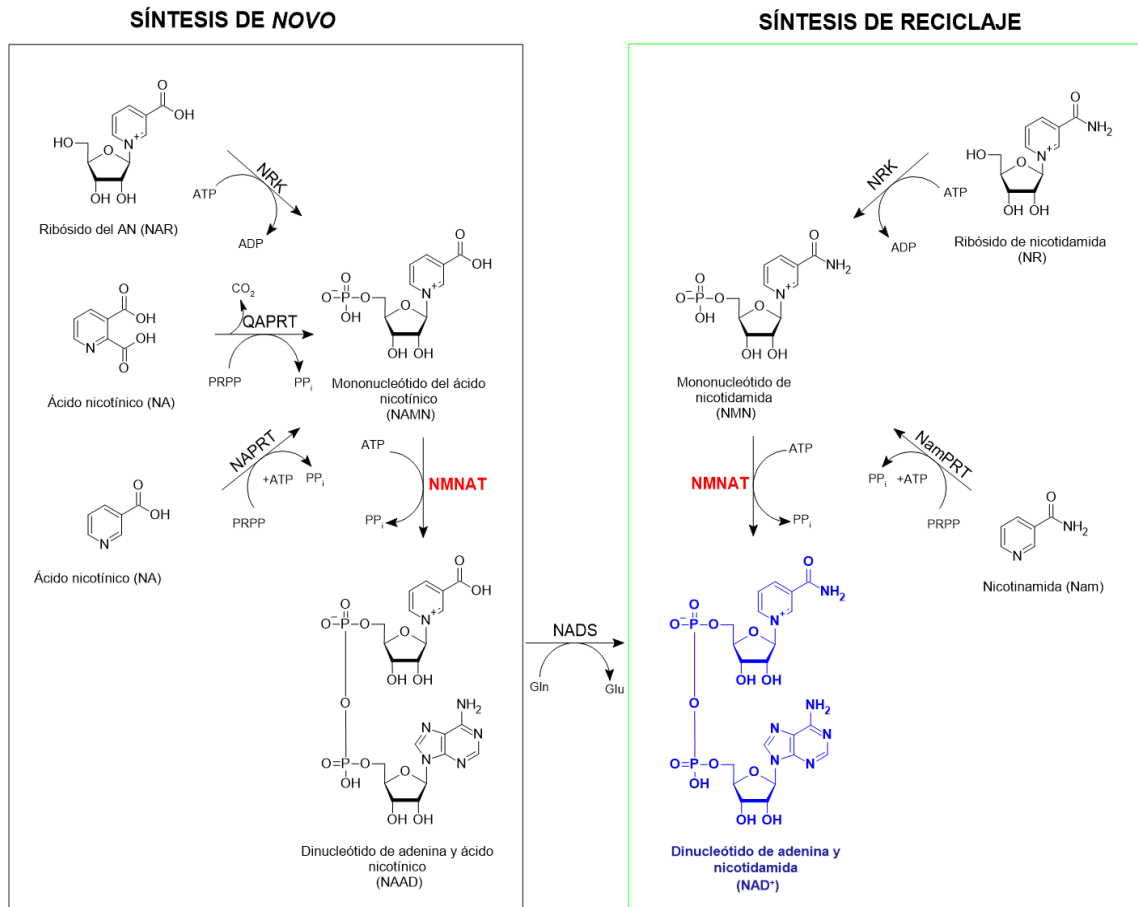
La síntesis del NAD puede completarse por dos vías, la vía *de novo* o la vía *de reciclaje*. En la síntesis *de novo*, se utiliza un aminoácido como precursor: aspartato en bacterias y plantas o triptófano en otros organismos, para transformarlo enzimáticamente en el ácido quinolínico (QA), el cual es sustrato de la fosforibosil transferasa del QA (QAPRT). Esta enzima cataliza dos reacciones, la descarboxilación selectiva en el carbono 2 de la piridina y la unión con la fosforibosa, usando fosforibosil pirofosfato (PRPP) para formar el mononucleótido del ácido nicotínico (NAMN). También se puede usar como precursor a la vitamina B3 (niacina o ácido nicotínico, NA), que por acción de la fosforibosil transferasa del NA, genera NAMN [10].

De modo paralelo, la vía *de reciclaje* utiliza la nicotinamida (Nam) procedente de los procesos en los cuales el NAD es usado como sustrato. La vía comienza con la modificación de la Nam por la fosforibosil transferasa de la Nam (NamPRT, también conocida como NAMPT), obteniéndose el mononucleótido de nicotinamida (NMN). Adicionalmente, se pueden utilizar como precursores los ribósidos del NA y la Nam (NAR y NR, respectivamente), cuya fosforilación por quinasas específicas, genera NAMN y NMN [39] En la (**Figura 3**) se ilustran las rutas de síntesis mencionadas.

Una vez sintetizados los mononucleótidos NAMN y NMN, estos se utilizan como sustratos para obtener los dinucleótidos respectivos, NAD y NAAD (dinucleótido de adenina y ácido nicotínico), por acción enzimática de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT). Esta enzima, utiliza ATP como sustrato para completar su reacción. Finalmente, el NAAD es amidado por la NAD sintetasa generando NAD [39].

El metabolismo del NAD ha sido de gran interés farmacológico debido a que su alteración en mamíferos está asociada con enfermedades como cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas y enfermedad de Huntington. Análogamente, en bacterias el metabolismo del NAD se ha fijado como un recurso de enzimas blanco para el desarrollo de nuevos antibióticos [40]. De la ruta de síntesis del NAD se destaca la NMNAT, la cual es el objeto de estudio del presente trabajo, y la NAD quinasa puesto que tienen un gran potencial terapéutico [41].

Figura 3. Rutas de síntesis del NAD. Considerando las vías metabólicas de *novo* (recuadro negro) y de reciclaje (recuadro verde) para la obtención de NAD (azul), se observa que ambas convergen en la NMNAT (rojo), protagonista de la presente propuesta. Adaptado de [41].



1.3 Nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT)

Como se describió anteriormente, la síntesis *de novo* y *de reciclaje* del NAD convergen en una misma enzima: la NMNAT. Esta enzima es una proteína globular que puede estar constituida por 160-400 aminoácidos con un peso que se encuentra en el rango de 20-50 kDa [42]. La NMNAT pertenece al grupo de las adenilil transferasas (EC 2.7.7) junto con enzimas como las aminocil-tRNA sintetetasas, CoA ligasas, luciferasas y ATP sulfurilasas [43].

La NMNAT ha sido estudiada en archaeobacterias, bacterias, parásitos, levaduras, insectos, plantas y mamíferos. En el caso de los humanos se han encontrado tres isoenzimas (*HsNMNAT* 1-3): la *HsNMNAT*1 con un peso molecular de 31,9 kDa y localización nuclear; la *HsNMNAT*2 (34,4 kDa) con localización en el citoplasma y en el aparato de Golgi; y la *HsNMNAT*3 (28,3 kDa) mitocondrial [36], [44]. Para la NMNAT recombinante de *L. braziliensis* (*His-LbNMNAT*), se reporta un peso molecular aproximado de 36 kDa [45] y los estudios preliminares de localización, la ubican a nivel citoplasmático en el estadio promastigote [39].

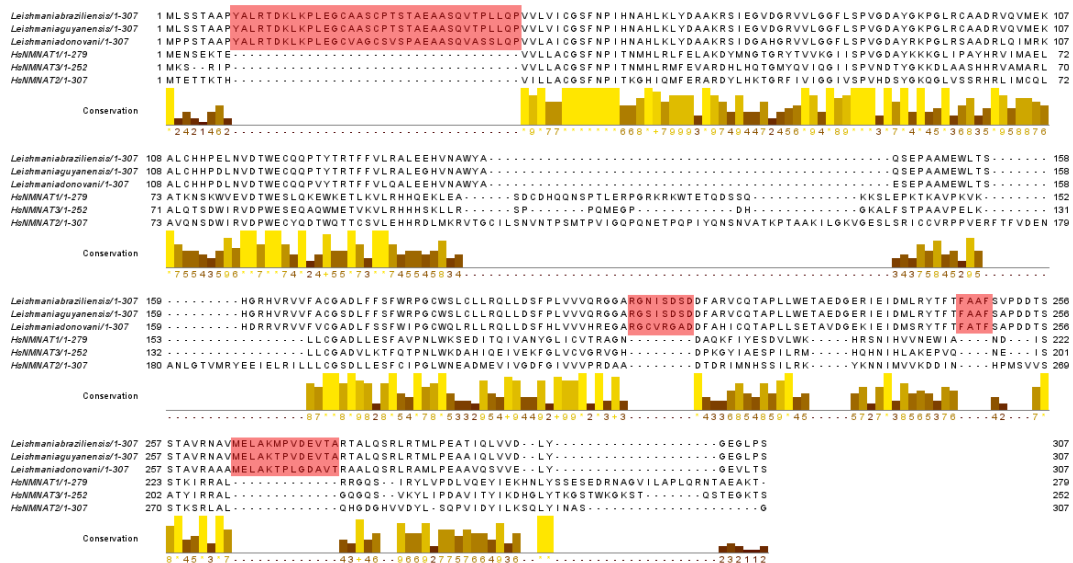
Las NMNATs requieren para su correcto funcionamiento cofactores correspondientes a metales divalentes. Por ejemplo, la *HsNMNAT*1 funciona óptimamente en presencia de Zn^{2+} [46], mientras que la *HsNMNAT*2 y *HsNMNAT*3 requieren Mg^{2+} [46], al igual que la proteína recombinante 6xHis-*LbNMNAT* [47] y la NMNAT de *Escherichia coli* [48]. Por su parte, se ha reportado que la NMNAT de *Saccharomyces cerevisiae* necesita cationes divalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} o Co^{2+} para ejercer su actividad [49].

La actividad catalítica de una enzima se caracteriza principalmente por su velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis Menten (K_m), estos parámetros son únicos para cada enzima y pueden ser diferentes para cada uno de sus sustratos. Estos valores varían

con las condiciones del medio como la temperatura, concentraciones de sales y pH. Para la enzima His-LbNMNAT nuestro grupo ha reportado los siguientes valores de K_m NMN: 178,7 μ M; K_m ATP: 3,5 μ M; K_m NAD: 412,2 μ M y K_m (anhídrido fosfórico PP_i): 166,6 μ M. Es de destacar que se ha observado que esta enzima puede catalizar la reacción reversa y es por ello que se reportan constantes de K_m para el NAD y el PP_i [45]. Estos valores se diferencian de aquellos reportados para las isoenzimas humanas *Hs*NMNAT 1-3.

Otro de nuestros estudios [50] demostró que en la estructura primaria de la NMNAT de *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* y *L. mexicana*, existen 4 inserciones específicas en las posiciones 8-43, 205-212, 241-249 y 264-276, respecto a *E. coli*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Bos taurus* y *Homo sapiens*. Se destaca la inserción del extremo N-terminal (8-43) que se encuentra cerca al motivo de unión del ATP, haciendo esta región interesante para posibles aplicaciones farmacológicas [47]. En la **Figura 4** se destacan las 4 inserciones mencionadas. Adicionalmente, aplicando la herramienta *NetPhos* 3.0, se encontraron 13 sitios de fosforilación con cinco tirosinas y dos treoninas en las inserciones identificadas [50].

Figura 4. Identificación de las inserciones de la NMNAT de *Leishmania braziliensis*. Alineamiento múltiple de las NMNATs de diferentes especies de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. guayanensis* y *L. donovani*) contra las tres NMNATs humanas. Alineamiento generado con el programa CLC sequence Viewer.



Estudios *in silico* de la estructura terciaria de la proteína *Lb*NMNAT, han permitido una caracterización más amplia de la proteína [47], cuya estructura presenta un dominio α/β común para estas enzimas, el cual consta de hojas β flanqueadas por hélices α y un dominio C-terminal compuesto por dos hélices α , típico de las NMNATs [51]. El dominio α/β exhibe una organización topológica que se asemeja al dominio de unión a dinucleótidos ampliamente descrito, también conocido como Plegamiento Rossmann. La **Figura 5** presenta la estructura del plegamiento Rossmann y su topología, junto con el modelo predictivo para la estructura terciaria de la *Lb*NMNAT en comparación con la proteína *Hs*NMNAT3.

Debido a la gran importancia que tiene la NMNAT en el metabolismo del NAD, ha sido objeto de estudios farmacológicos que modulen su actividad catalítica ya sea aumentándola o inhibiéndola. Berger et al. [52] encontraron que los galotaninos, compuestos derivados del ácido gálico unidos por un enlace tipo éster con azúcar [53], ejercen un efecto inhibitorio diferencial en las NMNATs humanas, siendo mayor en la NMNAT3 (2 μ M) comparado con la NMNAT1 (10 μ M) y NMNAT2 (55 μ M). Los mismos autores en su investigación destacan el efecto inhibitorio que presenta la 3-aminobezamida y el efecto potenciador que presenta el galato de epigallocatequina (EGCG) a concentración de 50 μ M, siendo mayor en la NMNAT2 en comparación con las NMNAT1-3 (**Tabla 1**). Del mismo modo, Sorci et al. [12] desarrollaron inhibidores de la NADd (una enzima análoga de NMNAT que produce NAAD) de *Bacillus anthracis* a partir de un screening virtual, en donde se encontraron 3 moléculas cabeza de serie (**Tabla 1**). A partir de estas moléculas, se realizaron modificaciones en las estructuras, obteniéndose compuestos con mayor afinidad.

En este mismo estudio se cristalizó la NMNAT con uno de estos inhibidores, encontrándose un cambio en la oligomerización de la enzima. En varias NMNATs, la oligomerización es una característica común relevante en su regulación, como se mencionará en el siguiente capítulo.

Figura 5. Aspectos estructurales de las NMNATs. **A:** Modelo representativo de láminas β (amarillo) y hélices α (azul) para el plegamiento Rossmann de la NMNAT humana, se denotan las láminas β con letras minúscula, las hélices α con letras mayúsculas. **B:** Diagrama topológico correspondiente del modelo anterior en donde se observa las láminas β (Círculos azules) flaqueadas por hélices α (triángulos amarillos). **C:** Estructura de la HsNMNAT3 (PDB: 1NUP). **D:** Modelo predictivo de la LbNMNAT. Los círculos verdes indican el plegamiento Rossmann involucrado en la unión a dinucleótidos como el NAD [47], [54].

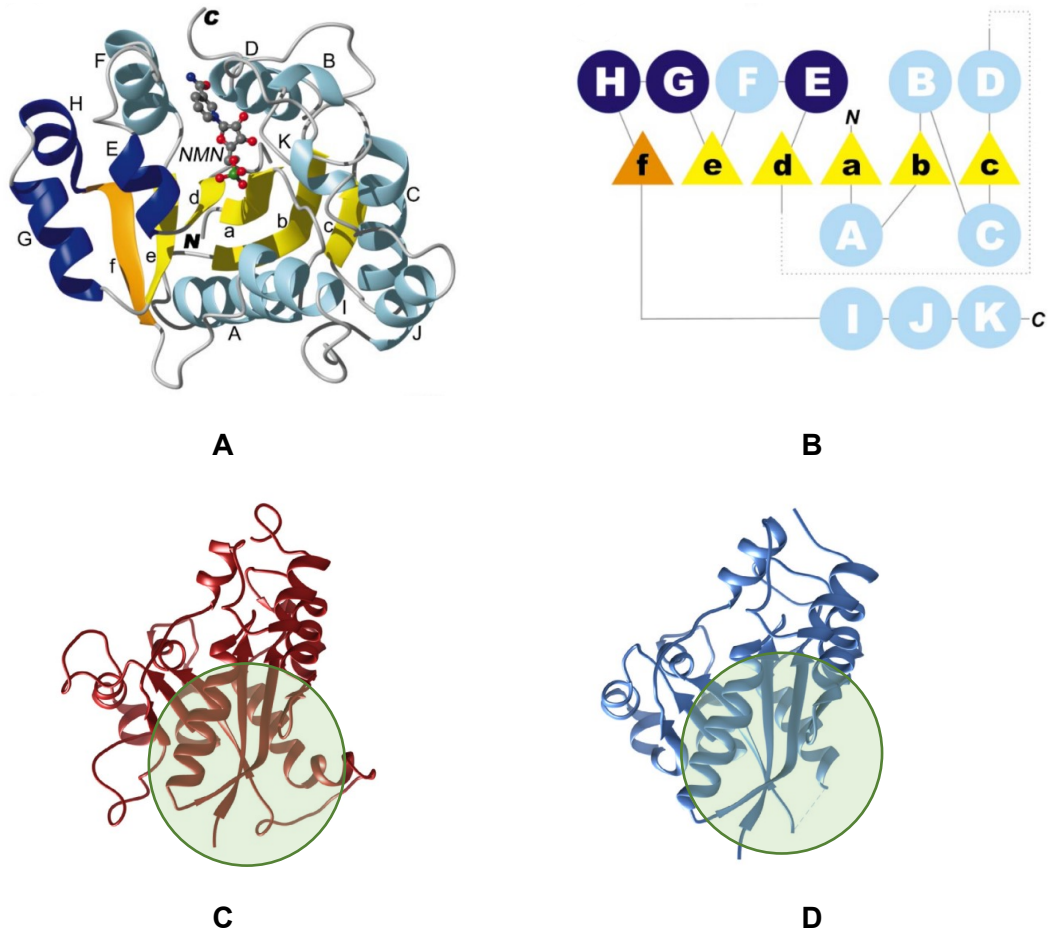
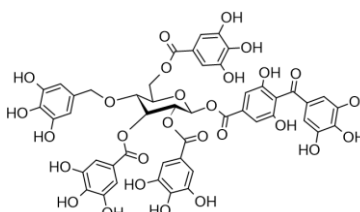
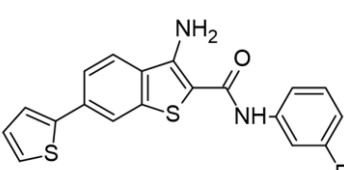
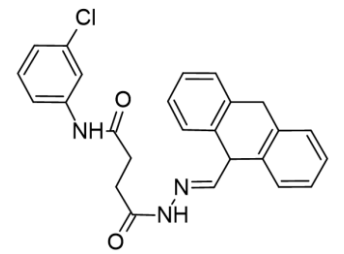
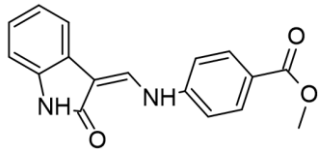
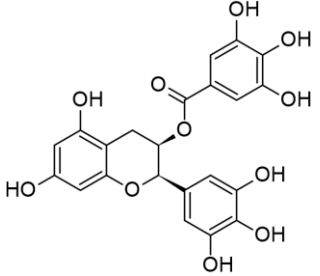


Tabla 1. Principales inhibidores de la NMNATs humanas y NadD de *Escherichia coli* y *Bacillus anthracis*. No inh: significa que no hay inhibición de la enzima por este compuesto.

Nombre del compuesto	Estructura química	Enzima objetivo	IC ₅₀ (μM)	Referencias
Galotanino		<i>Hs</i> NMNAT1	10	[52]
		<i>Hs</i> NMNAT2	55	
		<i>Hs</i> NMNAT3	2	
Class 3 ¹		<i>Ec</i> NadD	65	[12]
		<i>Ba</i> NadD	36	
		<i>Hs</i> NMNAT1-3	No inh.	
Class 1		<i>Ec</i> NadD	15	[12]
		<i>Ba</i> NadD	25	
		<i>Hs</i> NMNAT	No inh.	

¹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3289443>

Class 15		EcNadD BaNadD HsNMNAT	191 98 No inh.	[12]
EGCG		HsNMNAT1 HsNMNAT2 HsNMNAT3	110 228 142	[40], [52]

2. Oligomerización de la LbNMNAT

2.1 Oligomerización en proteínas

Las proteínas en la naturaleza pueden funcionar como monómeros y/o asociarse con otras proteínas o consigo misma, formando hetero y homo-oligómeros, respectivamente. Se ha visto que este tipo de ensamblaje no solo confiere estabilidad, sino que también se relaciona con [55]:

- **Resistencia a la desnaturalización:** Al conformarse un agregado proteico funcional, el acceso del solvente es menor, puesto que se expone una menor área superficial en la proteína y los aminoácidos hidrofóbicos en el centro del agregado proteico (clúster hidrofóbico) se protege del ataque del solvente. Entre estos aminoácidos no afines al agua se generan interacciones hidrofóbicas, principalmente, y de Van der Waals, necesitándose mayor energía para hacer un cambio en posición de los átomos (desnaturalización).
- **Cooperatividad:** Una gran ventaja que se encuentra en la asociación de proteínas son las funciones cooperadoras que permiten llevar a cabo la función específica de la proteína de mejor manera. Como ejemplo se puede mencionar la hemoglobina, que es la proteína encargada del transporte de oxígeno a los diferentes tejidos y que exhibe conformación tetramérica (4 unidades). En el transporte de oxígeno cada unidad experimenta un cambio conformacional que aumenta la afinidad de las otras unidades por el oxígeno.

- **Regulación alostérica:** Una forma de modular la velocidad de algunas enzimas es por medio de moduladores que generan cambios conformacionales, siendo este tipo de regulación predominante en oligómeros. En la modulación alostérica se observan dos clases; una relación ortoestérica en la cual el modulador se une entre la interfase de las subunidades del oligómero y una modulación alostérica pura en la que el modulador se une en un sitio diferente al sitio de contacto de las proteínas y provoca el cambio conformacional.

Las fuerzas que posibilitan estos acoplamiento proteína-proteína pueden ser de tipo hidrofóbicas, Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas y puentes disulfuro. Para que se den este tipo de interacciones se debe vencer la pérdida en entropía que experimenta el sistema debido a la pérdida de movilidad de las dos proteínas en una única estructura cuaternaria. Se ha calculado que esta pérdida de entropía se encuentra entre 80-120kJ/mol en el rango de 25-37°C, por lo tanto, para que el proceso de acople sea posible, la generación de estas fuerzas intramoleculares debe estar entre 130-220kJ/mol [56]. En este proceso de oligomerización, las fuerzas intermoleculares de tipo hidrofóbico contribuyen significativamente.

2.1.1 La oligomerización como una herramienta de regulación

Uno de los mecanismos que tiene la célula para la regulación de vías metabólicas es por medio de la inhibición de las enzimas que están involucradas en la vía en cuestión. De este proceso de inhibición existen diferentes formas de modificar la velocidad con la que una enzima trabaja o con la que la célula produce cierto metabolito de interés. Entre estos procesos se encuentran el aumento o la disminución de la cantidad de enzima presente que se realiza por medio de la regulación del gen como tal o por medio de la regulación del ARN que transcribe a la proteína. Este último será objetivo de la siguiente sección.

Otra manera de regular la cinética de una proteína, es por medio de modificaciones covalentes entre las se encuentra la fosforilación de residuos de aminoácidos que tienen hidroxilos activos como las serinas, tirosinas o treoninas. La célula también ha encontrado la forma de regular la actividad de estas enzimas por medio de su conformación oligomérica.

Como se había visto en la sección anterior, la conformación cuaternaria de algunas proteínas les confiere una mayor estabilidad; este no es el único factor importante, sino que también se ha visto que esta conformación les puede dar una ventaja de cooperatividad. En otras palabras, hablando concretamente de proteínas que tienen función catalítica o función transportadora se ha encontrado que modificaciones en cuanto a posición o interacción dadas entre las subunidades modifican su afinidad con el sustrato.

2.1.2 La importancia de oligomerización de las proteínas a nivel farmacológico

Debido a la cooperatividad que presentan algunas proteínas en su estructura cuaternaria y su efecto de regular algunas vías metabólicas resulta de interés farmacológico modular este tipo de interacciones. Una de las principales ventajas de enfocar estas interacciones como posibles dianas terapéuticas es que estos sitios de interacción proteína-proteína presentes en las estructuras oligoméricas presentan una mayor variedad estructural. Esto permite el diseño de moléculas que interactúen únicamente con estas porciones, evitando así efectos adversos derivados de la conjugación con otras proteínas. En contraste, fijar como sitio de interacción con el fármaco el centro catalítico, que es más conservado, puede resultar en que la molécula diseñada también interactúe con la proteína homóloga del paciente [57].

Del mismo modo, se ha usado la modulación oligomérica para mejorar propiedades farmacocinéticas. Por ejemplo, la insulina está constituida por dos péptidos unidos por puentes disulfuro que en solución forma dímeros que posteriormente forma hexámeros. Al establecerse estos hexámeros, la superficie importante para la función reguladora de la glucosa en la sangre se aloja en el cluster del oligómero, retardando su acción [56]. Gracias a la ingeniería genética se reemplazó la lisina 28 y la prolina 29 por un aminoácido cargado negativamente como el aspartato, impidiendo la formación de hexámeros en solución, generando un efecto más rápido y de corta duración [58].

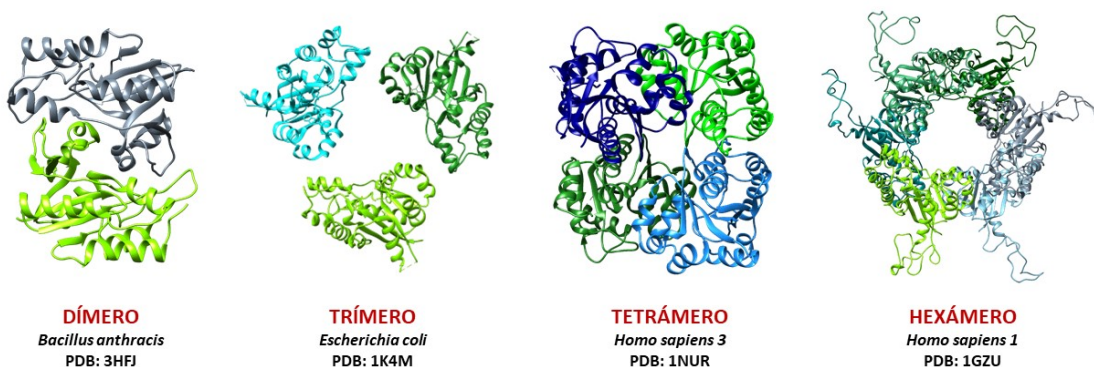
2.2 Antecedentes de la estructura cuaternaria en las NMNAT

Se ha encontrado que las NMNATs de diferentes organismos presentan oligomerización. Por ejemplo, en bacterias Gram-positivas como *B. anthracis* y *Staphylococcus aureus* se han reportado ensamblajes diméricos; sin embargo, no es la única forma oligomérica que se ha observado, también se han reportado trímeros en *E. coli*; tetrámeros en *B. subtilis* y en la HsNMNAT3 [36]; o hexámeros para la HsNMNAT1 y la NMNAT de *Methanococcus jannaschii* (**Figura 6**). Estos hexámeros forman un anillo cuya apertura se compone de una superficie cargada positivamente que podría atraer sustratos de carga negativa como el ATP, hacia los sitios activos. El hexámero de la HsNMNAT1 se estabiliza por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre los oligómeros [51], [54].

Sershon et al. [59] reportaron que la NMNAT de *B. anthracis* presenta cooperatividad negativa con respecto a los sustratos NaMN y ATP. El valor de $K_{0,5}$ encontrado a través de HPLC fue de 79 y 479 respectivamente. Paralelamente, los investigadores también reportan los valores de n_H de 0,750 y de 0,624. Estos parámetros son requeridos para la ecuación de la ecuación de Hill, la cual permite modelar la cooperatividad que presentan algunas enzimas; el valor de $K_{0,5}$ hace referencia a la concentración en donde el 50% de la enzima se encuentra ocupada, mientras que el valor de n_H , que en este caso está entre

0 y 1, indica que hay una cooperatividad negativa. En el mismo estudio se reafirma esta cooperatividad con ensayos de titulación calorimétrica (TCA). Por otro lado, se destaca también el trabajo realizado por Sorci et al. [12] en donde se observa que la molécula de clase 3 (**Tabla 1**) no solo inhibe esta enzima, sino que también cambia su conformación oligomérica de dímero a tetrámero.

Figura 6. Estructura cuaternaria de algunas NMNATs. Se indica las subunidades presentes en cada organismo con su correspondiente código del *Protein Data Bank* (PDB).



Para la proteína recombinante 6His-*Lb*NMNAT, nuestro grupo de investigación ha reportado su elución como monómero desde una columna de cromatografía por exclusión molecular (SEC) en ausencia de sustratos y/o inhibidores [45]. Adicionalmente, ensayos preliminares por Dispersión Dinámica de Luz (DLS) en presencia de ATP, indican un comportamiento poli-disperso de la proteína, sugiriendo su posible oligomerización. Por ello, el presente trabajo pretende profundizar el estudio de la estructura cuaternaria de la enzima *Lb*NMNAT en presencia de diferentes sustratos y/o inhibidores.

3. Regulación génica

Una vía metabólica puede ser regulada por dos niveles principales: a nivel del transcrito (el ARN que codifica para una proteína en especial) y a nivel enzimático, este último se divide en dos: en modificaciones por la adición de grupos como el fosfato y por modificación en sus interacciones proteína-proteína cuando la enzima forma oligómeros con ella misma como se expone en el capítulo anterior. A nivel de transcrito, los organismos vivos han diseñado diversas estrategias para la regulación metabólica en donde se tiene como objetivo la interrupción o aumento de la expresión de la proteína en cuestión y por lo tanto regulando la vía metabólica. La regulación del transcrito se puede hacer de las siguientes maneras:

3.1 Regulación al inicio de la transcripción

Alrededor de un 10% de los genes codificantes para proteínas en el genoma humano corresponden a factores de transcripción. Estos genes tienen la labor de unirse a secuencias específicas del ADN, denominadas promotores, mediante enlaces de hidrógeno, para activar o desactivar la transcripción de un gen particular. En organismos procariontes, los factores de transcripción regulan la transcripción de forma directa, al interactuar molecularmente con la ARN polimerasa. Por otro lado, en organismos eucariontes los factores de transcripción presentan una gran variedad y pueden interactuar con co-activadores o co-represores para modular la actividad de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción [60].

3.2 Controles post-transcripcionales

Una vez comienza la transcripción del gen, este sigue siendo objeto de regulación. A medida que se transcriben, algunos transcritos pueden interaccionar con la ARN polimerasa atenuando su propia transcripción. Cuando este gen es requerido, el ARN nascente interacciona con otras proteínas que impiden la interacción con la ARN polimerasa permitiendo la expresión del gen. El proceso de *splicing* puede ser regulado de manera positiva, en donde las proteínas de unión permiten la correcta edición del transcrito, generando así un ARN funcional. Adicionalmente, el proceso puede regularse de manera negativa, evitando el correcto proceso de edición [60].

Otro tipo de regulación post-transcripcional que también ocurre en las células animales es la modificación puntual de las bases nitrogenadas, en donde los dos mecanismos más usados es la desaminación de la adenosina a inosina y la desaminación de la citosina a uracilo. Este tipo de regulación puede generar paradas prematuras generando proteínas no funcionales o cambio en aminoácidos que generan proteínas con características diferentes [60].

3.3 Regulación en el transporte desde el núcleo

Luego del proceso de maduración del ARN en donde se adicionan bases modificadas en el extremo 5' (*cap*) e introducción de una sección de adeninas (cadena de poli A), el transcrito requiere ser transportado desde el núcleo hasta el citosol donde va a ser traducido. Sin embargo, las cadenas de ARN defectuosas no son exportadas [60].

3.4 Localización en el citosol

Después que el transcrito sale del núcleo este es atrapado por los ribosomas en donde se empieza a generar la cadena nascente de la proteína. Algunas cadenas de ARN presentan regiones no codificantes (UTR), las cuales se han visto implicadas en el proceso de localización y algunos de estos transcritos pueden ser objeto de degradación por dicha región, puesto que son sometidas a la acción de endonucleasas que hidrolizan la cola de poli A [60].

3.5 Regulación génica en Tripanosomátidos

A pesar de que los tripanosomátidos son organismos eucariontes, presentan mecanismos únicos para realizar su expresión génica. Los genes en estos microorganismos se organizan en agrupaciones de varias decenas a centenas de genes que se transcriben simultáneamente en un único policistrón² de ARN, exhibiendo semejanzas con la expresión policistrónica de los operones de los organismos procariontes [61]. Sin embargo, los genes del policistrón de los tripanosomátidos no se relacionan funcionalmente entre sí. Se especula que la transcripción comienza en una zona de empaquetamiento laxo del ADN alrededor de los nucleosomas (eucromatina), dada la modificación postraduccional de las histonas asociadas a estos. No obstante, el mecanismo molecular exacto aún no se comprende completamente.

El proceso de transcripción en los tripanosomátidos comienza con la acción de la ARN polimerasa II que transcribe la agrupación completa de genes. Luego, el transcrito policistrónico de estos genes experimenta un proceso de maduración caracterizado por los siguientes eventos simultáneos:

² Conjunto de genes que puede codificar una proteína o un RNA no codificante (rRNA, tRNA, snRNA entre otros). Tomado de [117]

- i. Adición de un miniexón de 39 nucleótidos en el extremo 5' de cada gen del policistrón.
- ii. Adición de una fracción de poli-A en el extremo 3' de cada gen del policistrón.

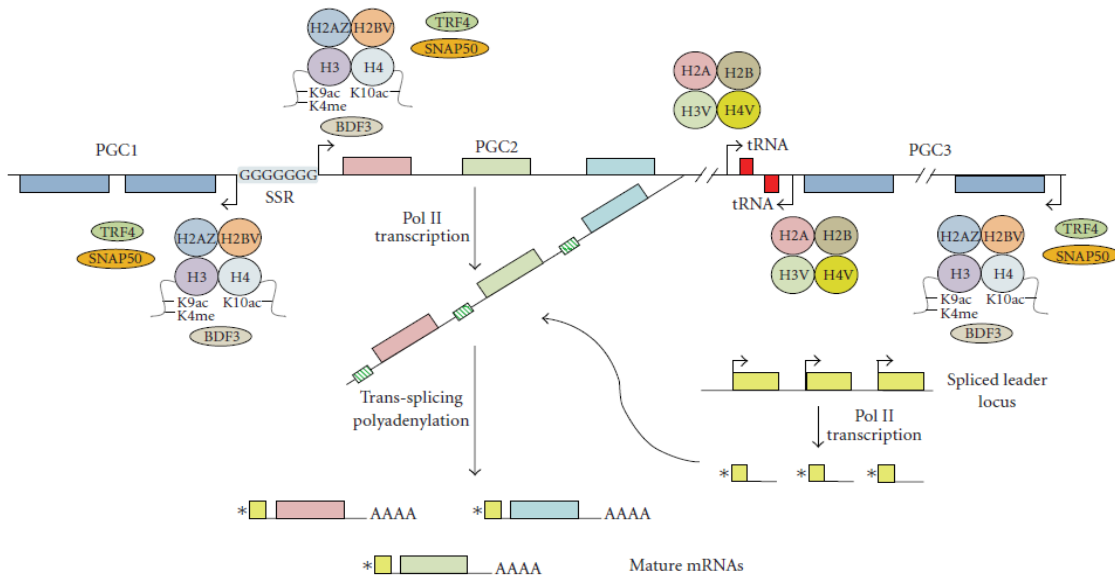
El miniexón contiene un cap 5' y procede de un locus denominado *Spliced Leader* (SL). Este proceso se denomina *trans-splicing*, dado que ocurre unión de secuencias de nucleótidos entre genes ubicados en locus diferentes, contrario al proceso de *Cis-splicing*, en el que la unión de secuencias se genera entre regiones contiguas, como los exones de un mismo gen. Adicionalmente, este proceso permite obtener un transcrito individual para cada gen del policistrón original [61].

En cuanto a los niveles de expresión génica, después del proceso de maduración del policistrón, los niveles de los transcritos individuales pueden variar mediante mecanismos post-transcripcionales que alteran su estabilidad, localización y/o el acceso de la maquinaria de traducción. Estos eventos son regulados por regiones no codificantes del transcrito denominadas UTRs, por su nombre en inglés (*Untranslated Regions*). Este proceso se resume en la **Figura 7**.

Como se mencionó, los transcritos individuales no solo contienen regiones codificantes, sino que también presentan regiones UTR que ejercen funciones de regulación génica, puesto que contienen secuencias para proteínas de unión a ARN, las cuales modulan el transporte, la traducibilidad y la estabilidad del transcrito [62]. Por ejemplo, la región UTR-3' de 450 nucleótidos del ARNm de la amastina de *L. infantum*, regula su expresión específica en la forma amastigote mediante un mecanismo que aumenta su traducción en esta etapa del ciclo de vida. Benabdellah K. *et al.* [63] encontraron que el gen *lyt1*, el cual codifica una proteína implicada en la virulencia de *T. cruzi*, puede exhibir dos regiones UTR-5' diferentes según la localización del transcrito en la zona del kinetoplasto o de la membrana celular.

Con el propósito de estudiar posibles mecanismos de regulación post-transcripcional de la *LbNMNAT*, en el presente trabajo se propone analizar las regiones UTR 5' y 3' del transcrito correspondiente en el estadio promastigote, mediante su secuenciamiento e identificación de secuencias para proteínas de unión a ARN.

Figura 7. Proceso de transcripción y maduración de ARNm en tripanosomátidos. Se ilustra una agrupación de genes transcritos por la ARN Pol II, que inicia la transcripción policistrónica en regiones con histonas modificadas (K9ac, K10ac y K4me). Posteriormente, en el proceso de *trans-splicing*, se divide el policistrón mediante su unión con el miniexón o *Spliced Leader* en el extremo 5' y la adición de una cola poli-A en el extremo 3'. El * en el miniexón representa su cap. Tomado de [61].



4. Justificación

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica producida por protozoarios del género *Leishmania*, transmitidos por la picadura de mosquitos de la subfamilia Phlebotominae. En la actualidad, se conocen 22 especies del parásito capaces de infectar al hombre [2], siendo endémica en 98 países. Recientemente, se ha registrado un incremento de casos en regiones urbanas [33], afectando potencialmente a más de mil millones de personas, razón por la que esta enfermedad es considerada como un problema de salud pública [64] además, la especie *L. braziliensis* se encuentra distribuida por 26 departamentos del territorio nacional [25] causando varios contagios por año,. Para la leishmaniasis no existe una vacuna efectiva [33], es por ello que el tratamiento de la enfermedad se basa principalmente en fármacos que resultan tóxicos para el microorganismo. Además, se ha reportado la aparición de cepas resistentes [4], sin olvidar los graves efectos adversos que estos fármacos generan en los pacientes [31]. Teniendo en cuenta lo anterior, se requieren nuevos estudios bioquímicos para encontrar posibles blancos farmacológicos.

En este sentido, el metabolito NAD puede resultar relevante en aras de identificar nuevos blancos terapéuticos, puesto que esta molécula es el principal cofactor en reacciones de oxido-reducción, esenciales en el metabolismo energético y en la síntesis de moléculas importantes para la vida como aminoácidos, lípidos y bases nitrogenadas. En el contexto de los parásitos del género *Leishmania*, el NAD participa en reacciones de defensa ante el estrés oxidativo que le confieren resistencia al parásito contra especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro del macrófago del hospedero [65]. Adicionalmente, el NAD está implicado en la regulación génica mediada por sirtuinas y en la reparación del ADN [38], entre otros.

En concordancia con lo anterior, se justifica el estudio de la proteína LbNMNAT, enzima esencial en la síntesis del NAD en *L. braziliensis*. Específicamente, el estudio de su estructura cuaternaria en presencia de diferentes sustratos y moléculas inhibitorias permitirá iniciar la elucidación de su disposición espacial y las interacciones entre sus oligómeros, información requerida posteriormente para el análisis de moléculas promisorias que enfoquen como diana terapéutica a esta enzima. Del mismo modo, la comprensión de los mecanismos de regulación génica de la *LbNMNAT* puede ser de suma importancia para comprender la expresión de esta enzima en el parásito a lo largo de su ciclo biológico.

5. Planteamiento del problema

Como se ha mencionado anteriormente, la leishmaniasis es una enfermedad para la cual no existen vacunas efectivas y cuyo tratamiento farmacológico resulta ineficaz, dados los graves efectos secundarios y la aparición de cepas resistentes del parásito ante estos.

Por tales razones, la exploración bioquímica de rutas metabólicas que permitan identificar nuevos y potenciales blancos farmacológicos es de gran interés y relevancia en el contexto de este problema de salud pública que afecta a Colombia.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha realizado varios estudios enfocados en la caracterización de la NMNAT de *L. braziliensis*, enzima esencial en la que convergen las rutas de síntesis *de novo* y *de reciclaje* del NAD y que exhibe diferencias estructurales y cinéticas con las proteínas humanas *HsNMNAT* 1-3 [45].

La estructura cuaternaria ha sido reportada en estas proteínas, siendo una característica descrita en organismos como *H. sapiens*, *B. anthracis*, *S. aureus* y *B. subtilis*, entre otros. Para el caso de la enzima *LbNMNAT*, estudios a nivel de proteína recombinante han indicado su elución en forma de monómero mediante ensayos de cromatografía de exclusión molecular en ausencia de sustratos o inhibidores [39] y su posible oligomerización en presencia de ATP mediante ensayos preliminares de Dispersión Dinámica de Luz (datos no reportados).

Adicionalmente, aunque los niveles de expresión génica para la NMNAT se han reportado en distintos organismos y tejidos, aún se desconocen aspectos relacionados con la regulación post-transcripcional de la NMNAT de *L. braziliensis*.

Entendiendo que el desarrollo racional de nuevas estrategias de control de enfermedades parasitarias como la leishmaniasis requiere la caracterización de aspectos estructurales como el establecimiento de oligómeros en presencia de sustratos y de los mecanismos de regulación génica de los potenciales blancos farmacológicos, aún desconocidos para la enzima *LbNMNAT*, por lo cual esta investigación pretende estudiar estos tipos de regulación.

En consecuencia, se plantea la siguiente pregunta de trabajo: ¿Qué tipo de oligomerización exhibe la proteína NMNAT de *L. braziliensis* en presencia de sustratos como ATP, NMN y NAD, o moléculas inhibitorias tipo imidazol y cómo es su posible regulación génica a nivel post-transcripcional?

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Identificar aspectos estructurales y mecanismos de regulación génica de la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT), mediante aproximaciones bioinformáticas y experimentales.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Analizar el efecto estructural de sustratos y moléculas derivadas del imidazol sobre la estructura cuaternaria de la enzima recombinante 6xHis-*LbNMNAT*.

6.2.2 Identificar bioinformáticamente la existencia de posibles mecanismos de regulación génica a nivel del transcrito correspondiente de la *LbNMNAT*.

6.2.3 Determinar experimentalmente la estructura del transcrito de la enzima *LbNMNAT*, identificando posibles secuencias de regulación post-transcripcional en sus UTRs.

7. Hipótesis

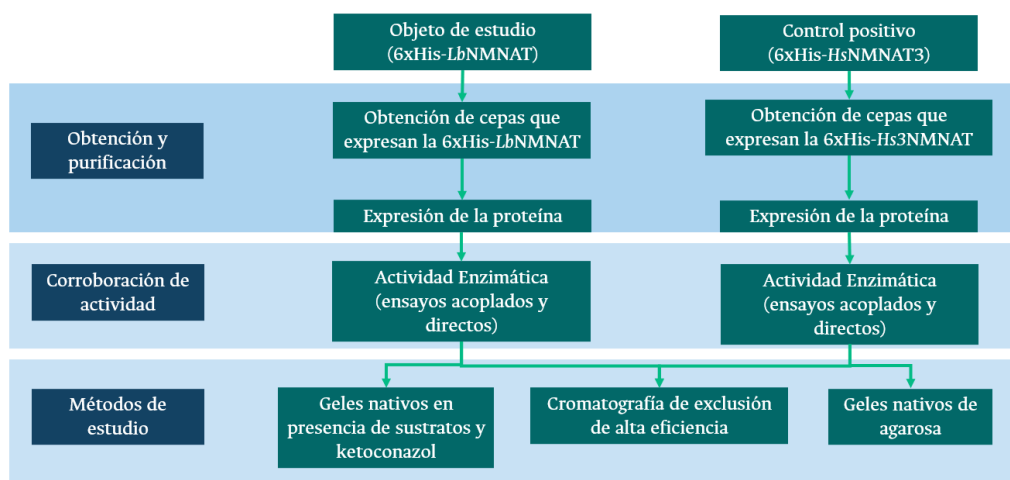
La proteína recombinante 6xHis-LbNMNAT experimenta alteraciones a nivel de estructura cuaternaria, por la presencia de sustratos o moléculas derivadas del imidazol, mientras que el transcrito de la NMNAT de *L. braziliensis* contiene secuencias involucradas en su regulación post-transcripcional en el estadio promastigote.

8. Metodología

En este proyecto se analizó el efecto de los sustratos (ATP, NMN) y producto (NAD⁺) en la oligomerización de la nicotinamida/mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT) por medio de geles nativos y cromatografía de exclusión de tamaño de alta eficiencia (SEC-HPLC). Se tomó como control la proteína 6xHis-HsNMNAT3, considerando que corresponde al ortólogo humano con mayor porcentaje de identidad con la enzima del parásito. Además, se realizó un análisis bioinformático de las regiones no codificantes del gen (5' y 3' UTRs) y se inició su comprobación experimental mediante retrotranscripción acoplada a PCR (RT-PCR). Para fines prácticos se mostrará un esquema general de la metodología y posteriormente se detallará cada paso

8.1 Esquema general de la metodología para el objetivo específico 1

Figura 8. Metodología general usada para la realización del primer objetivo.



8.2 Metodología detallada para el objetivo específico 1

Para la realización de este objetivo, en una primera instancia, se partió de plásmido aislado obtenido por Contreras [45] con el cual se transformó células *E. coli* M15 químicamente competentes y luego se realizó la expresión de la proteína de estudio. Adicionalmente, se expresó la proteína 6xHis-HsNMNAT3 como un control de oligomerización puesto que la oligomerización de esta enzima ya está reportada. La metodología usada fue la siguiente:

8.2.1 Expresión de la enzima recombinante 6xHis-LbNMNAT

Se transformaron células *E. coli* M15 químicamente competentes con el plásmido pQE30-LbNMNAT [39] mediante choque térmico, incubando las células a 42°C por 30 segundos seguido de 2 minutos sobre hielo y recuperando en medio SOC por 45 minutos. Luego, las células se seleccionaron en medios sólidos LB (VWR Life Science) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Se seleccionaron 2 colonias y se analizaron mediante PCR aplicando el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, anillamiento a 60°C por 25 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, terminando con extensión final a 72°C por 10 minutos. Se emplearon oligonucleótidos dirigidos contra el fragmento codificante para la *LbNMNAT* (Directo: 5'-GCATGCATGTTATCCTCTACT-3' Reverso: 5'-GGTACCTCAGGACGGAAGCCC-3').

Posteriormente, una de las colonias se pre-inoculó en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a 37°C, durante 16 horas a 180 rpm. El pre-inóculo obtenido se diluyó 1:50 en medio fresco completando a un volumen de 200 mL y se incubó a 37°C y 160 rpm hasta obtener una densidad óptica de (OD) ~ 0,6. Se adicionó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma) y se descendió la temperatura a 25°C. La expresión de la proteína se realizó por 16 horas a 120 rpm.

8.2.2 Purificación de la enzima recombinante 6xHis-*Lb*NMNAT

Luego de la expresión de la proteína, se recolectó el precipitado celular por centrifugación a 6000 rpm por 20 minutos. Por cada gramo de precipitado se adicionaron 5 mL de buffer de lisis pH 7,5 (25 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (Merck), 300 mM NaCl (PanReac AppliChem), 2 mM MgCl₂ (Amresco), 2 mM β-mercaptoetanol (Merck), 10 mM imidazol (Sigma) y glicerol 1% V/V), suplementado con inhibidor de proteasas (Bioquigen) y lisozima (1 mg/mL). A continuación, la suspensión se incubó 1 hora a 4°C y se aplicaron 12 ciclos de sonicación a 50% de amplitud por 20 segundos en baño de hielo, reposando 40 segundos entre ciclos. Luego, se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante obtenido se incubó 1 hora con agitación constante y en baño de hielo con resina de cobalto de agarosa (Gold Biotechnology), previamente equilibrada con buffer de unión (buffer de lisis sin β-mercaptoetanol). Se utilizaron 800 μL de resina húmeda por cada 5 mL de fracción soluble. Luego, se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos descartando el sobrenadante y resuspendiendo la resina en buffer de unión para empacar una columna por gravedad. Se realizaron dos lavados con el buffer usado anteriormente con concentraciones mayores de imidazol: el primer lavado con imidazol 35 mM y el mismo volumen de fracción soluble (5 mL). El segundo lavado con imidazol 75 mM y la mitad del volumen de la fracción soluble (2,5 mL). Para finalizar, se recogieron 4 fracciones usando buffer de elución con imidazol 200 mM. Los eluidos se cuantificaron por el método de Bradford utilizando BSA como patrón. El segundo eluido se dializó en 1 L de buffer fosfatos (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 300 mM NaCl, pH 7,5), durante toda la noche a 4°C.

8.2.3 Expresión y purificación de la enzima recombinante NMNAT humana 3 (6xHis-*Hs*NMNAT3)

Partiendo de un crioconservado de células *E. coli* BL21 [39] que contienen el plásmido pQE30-*Hs*NMNAT3, se realizó un estriado para aislar un clon de expresión de la proteína 6xHis-*Hs*NMNAT3. La expresión y purificación de la proteína se efectuó aplicando las condiciones previamente estandarizadas para la proteína 6xHis-*Lb*NMNAT, sin utilizar kanamicina en los medios de cultivo.

8.2.4 Ensayos enzimáticos acoplados

La actividad de las enzimas obtenidas se verificó mediante ensayos acoplados [39]. Estos ensayos se ejecutaron usando la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (E.C: 1.1.1.1) y monitoreando el aumento de absorbancia a 340 nm por 5 minutos. La mezcla de reacción contenía 40 mM etanol, 25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 2 mM NMN (Sigma), 2 UI ADH (Sigma) y 20 µL (15 y 63 µg para la 6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3 respectivamente) de las enzimas obtenidas. A esta mezcla se le adicionó ATP (Sigma) 1 mM para iniciar la reacción.

8.2.5 Ensayos enzimáticos directos

Se corroboró la actividad de las enzimas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) [39]. Los ensayos se realizaron usando mezcla de reacción (25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1,25 mM NMN, 1,25 mM ATP y 5 µg de enzima) en volumen final de 100 µl, a 37°C por 5 minutos. Para detener la reacción se adicionaron 100 µL de HClO₄ 1,2 M incubando sobre baño de hielo por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12000g durante 3 minutos a 4°C. Por último, se neutralizaron 150 µL del sobrenadante con 40 µL de 1M KCO₃, repitiendo la centrifugación. La composición del sobrenadante se caracterizó utilizando columna C18 (25 cm largo x 4.6 mm diámetro interno, tamaño de partícula 5 µm, Phenomenex) en el cromatógrafo Agilent 1260, usando buffer fosfato de potasio 10 mM, pH 6,0 (solvente A) y metanol (solvente B) con el siguiente perfil de corrida a temperatura ambiente: 2 minutos 100% A, 1,5 minutos 80% A y 20% B, 3 minutos 75% A y 25% B y 3, 5 minutos 100% A (tiempo total 10 minutos), flujo 1,5 mL/min y detección a 254 nm.

8.2.6 Análisis de estructura cuaternaria mediante geles PAGE nativos

Siguiendo metodologías estandarizadas [39], [66], se incubaron durante 1 hora a 4°C, 3,2 µg de la proteína 6xHis-*Lb*NMNAT en presencia de NMN (1 mM), ATP (1 mM) o NAD (10

mM). A continuación, se cargaron las muestras en gel de acrilamida en condiciones nativas (PAGE) de concentraciones 8, 10 y 12 %T, junto con proteínas patrón (Sigma) β -amilasa (200 kDa), albúmina de suero bovino (BSA) (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa), cargando 12 μ g, 30 μ g y 9 μ g, respectivamente. Los geles se tiñeron con Coomassie R-250 y se construyeron gráficos de Ferguson.

8.2.7 Electroforesis en gel de AGAROSA nativo

Se corrieron geles de agarosa sin condiciones denaturantes teniendo en cuenta la metodología descrita por [67] con ligeras modificaciones. En gel TAE pH 7.5 se cargaron las proteínas patrón β -amilasa (200 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo c (12 kDa), junto con las proteínas 6xHis-*Hs*NMNAT3 y la 6xHis-*Lb*NMNAT, separando las muestras por 1 hora a 100 V. El gel se tiñó con Coomassie R-250.

8.2.8 Cromatografía de exclusión de alta eficiencia (SEC-HPLC)

Los resultados obtenidos en geles nativos (PAGE) se corroboraron por SEC-HPLC. Inicialmente, se construyó una curva de calibración con las proteínas β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa, albúmina de suero bovino (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12 kDa) (MWGF200-1KT). La separación se efectuó utilizando una columna Yarra SEC-X300 (150 mm largo x 4,6 mm diámetro interno, tamaño de partícula 1,85 μ m, Phenomenex) en el cromatógrafo Agilent 1260 a temperatura ambiente, usando buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8, de forma isocrática con flujo 0,3 mL/min y detección a 220 nm.

8.2.9 Análisis de estructura cuaternaria mediante geles PAGE nativos en presencia de ketoconazol

Se montaron 4,3 µg de muestra ($1,2 \times 10^4$ µmolar³) de la 6xHis-LbNMNAT (20 µL), previamente incubadas durante 1 hora con Ketoconazol (stock 5314,3 µg/mL de DMSO) relaciones molares de 1 y 1,5, junto con la muestra sin tratamiento, la enzima más el vehículo del medicamento (DMSO) y proteínas patrón β-amilasa, BSA y anhidrasa carbónica en un gel de poliacrilamida al 12% T.

8.3 Esquema general de la metodología para el objetivo específico 2

Figura 9. Metodología general usada para la realización del objetivo específico 2.



³ Peso molecular de la proteína: 35067 Da

8.3.1 Selección de la secuencia de trabajo

Se eligieron las secuencias intergénicas de la hebra positiva del extremo 5' y del extremo 3' ubicadas entre la posición 674428 a 675382 y 676307 a 676952 respectivamente del cromosoma 17, colindantes al gen *lbnmnat* (LBRM2903_170021600) consignado en la base de datos de TriTryDB [68].

8.3.2 Análisis de sitios aceptores de *splicing*

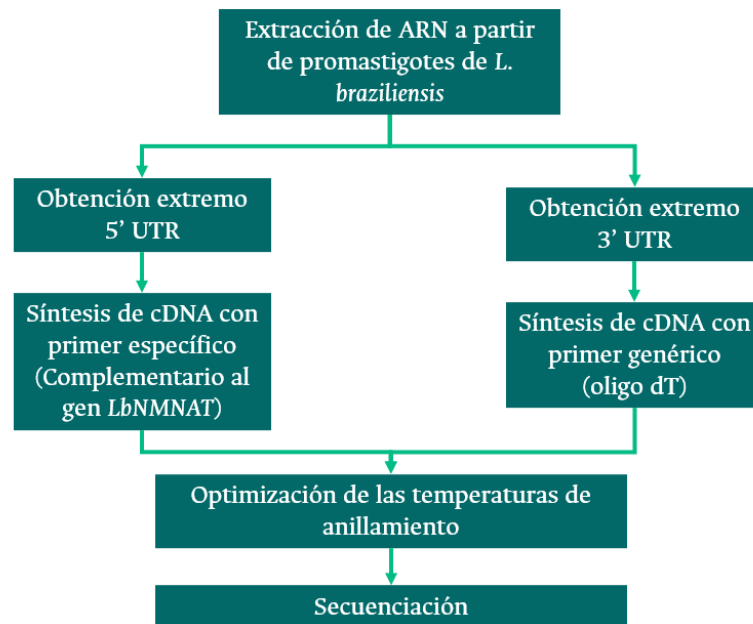
Con las regiones intergénicas seleccionadas y mediante los programas SpliceRober [69], Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) [70] y NetGene2 - 2.42 [71], se identificaron los sitios posibles aceptores de *splicing*, proponiendo así las posibles secuencias no codificantes (UTR) de los extremos 5' y 3' del transcrito del gen *lbnmnat*.

8.3.3 Identificación de proteínas de unión a ARN (RBPs)

Las regiones no codificantes del transcrito del *LbNMNAT* se analizaron mediante el programa RBPmap [72] identificando posibles proteínas de unión a ARN reportadas en *H. sapiens*, *M. musculus* y *D. melanogaster*. A partir de esta lista se buscó en la base de datos VEuPathDB [73] posibles proteínas ortólogas en la cepa de referencia de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).

8.4 Esquema general de la metodología para el objetivo específico 3

Figura 10. Metodología general usada para la realización del tercer objetivo.



8.4.1 Extracción de ARN a partir de promastigotes

De un cultivo axénico de 10 mL de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR175/M2903) en estado promastigote en fase de crecimiento exponencial, se obtuvo un pellet por medio de centrifugación a 5000 g a 4°C durante 10 minutos, el cual se resuspendió por pipeteo en 1 mL de Trizol (Ambion life technologies) y se colocó en un tubo de 1,5 mL. Paso seguido, se incubó en baño de hielo por 5 minutos y posteriormente se agregó 0,2 mL de cloroformo (MERK) agitándose vigorosamente mediante vortex. La mezcla resultante se dejó por 5 minutos en baño de hielo para permitir la separación de fases y se centrifugó a 12000 g

por 15 minutos a 4°C. Después, se colectó la fase superior (fase acuosa) sin tocar la fase intermedia ni la oleosa. A la fracción acuosa se le adicionó 0,5 mL de isopropanol (PanReac) puro y se dejó en hielo a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se homogenizó en 1 mL de etanol al 75% (v/v) y se agitó por medio de vortex suavemente, esta mezcla se centrifugó por 7500 g por 5 minutos a 4°C. Este último lavado con etanol se realizó dos veces y el sólido obtenido después de la última centrifugada se dejó secando en cabina de flujo laminar por 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 50 µL de agua DEPC. La muestra resultante se cuantificó en espectrofotómetro NanoDrop™ One Thermo Scientific a una longitud de onda de 260 y 280nm y se verificó su identidad por medio de gel de agarosa -TAE con hipoclorito de sodio al 1% que luego se tiñó con bromuro de etidio.

8.4.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de ADN complementario del extremo 3' y 5' UTR se realizó con el kit DyNAmo™ cDNA Synthesis kit (Thermo scientific) [74], brevemente el procedimiento que se siguió fue el siguiente:

A partir del ARN extraído se inicia con la eliminación del ADN excedente que tiene la muestra para lo cual se trataron 20 µg (2,49 µL) de ARN con 1 µL de DNAsa (Promega) y 1 µL de buffer de reacción del mismo kit [75] llevándolos a 9 µL de volumen final con agua DEPC. Dicha mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C en el termociclador, posteriormente se adicionó 1 µL más de DNAsa y se repitió la incubación anterior con las mismas condiciones. Por último, se adicionó 1 µL de buffer de parada y se calentó a 65°C por 10 minutos. De esta solución, se agregaron 2 µg de ARN (calculados teniendo en cuenta los volúmenes adicionados anteriormente) junto con 1 µL de Oligo dTs para el caso del extremo 3'UTR y 1 µL de primers específicos (**Tabla 2 fila 5**) para el extremo 5' UTR y se llevaron a un volumen 12,5 µL con agua DEPC. Esta mezcla se colocó a 65°C por 5 minutos y luego se le adicionó 4 µL de buffer m-Mulv x5 (Thermo Fisher), 0,5 µl Ribolock,

2 μ L (Thermo Fisher) Mix de dNTP (10 mM) y 1 μ l de retrotranscriptasa M-MuLV RT (Thermo Fisher). Por último, se calentó a 42°C durante 60 minutos con el objetivo de desactivar la enzima.

8.4.3 Amplificación de las regiones 3' y 5' UTR

La amplificación de los dos extremos no traducidos del gen *Ibnmnat* se realizó mediante PCR usando como plantilla el cDNA sintetizado previamente usando como control de síntesis de cDNA el gen que codifica para la α -Tubulina (*Lb α -Tb*). El perfil térmico utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, anillamiento a 62°C por 25 segundos para el control de la α Tubulina y de 45 a 60°C durante 25 segundos para las dos UTRs y amplificación a 72°C por 45 segundos, terminando con extensión final a 72°C por 10 minutos. Se emplearon oligonucleótidos dirigidos contra el fragmento codificante para la *Lb α -Tb*, un par para la amplificación del extremo 5' UTR y un par para el 3' UTR. La secuencia de los primers se indica en la **Tabla 2**. Por último, se corrieron las muestras en geles de agarosa TBE al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación de las UTRs.

Primer	Secuencia	Tm (50 mM Na+)
Fw <i>Lbα-Tb</i>	5'- GCGATTGCGACGATCAAGAC-3'	64
Rv <i>Lbα-Tb</i>	5'- TCGAACTTGTGGTCGATCCG-3'	64
Fw 5 UTR <i>Ibnmnat</i>	5'-GGGGATATAAGTATCAGTTTCTGT-3'	55
Rv 5 UTR <i>Ibnmnat</i>	5'- CAGTTGAGGTGGGGCAACTA-3'	61
Fw 3 UTR <i>Ibnmnat</i>	5'-AACTTGCAAAGATGCCGGTA-3'	61
Rv 3 UTR <i>Ibnmnat</i>	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	45

9. Resultados

Los resultados de este trabajo se presentarán de forma organizada conforme a los objetivos específicos planteados anteriormente. La discusión de resultados se hará en otra sección y será indexada de igual forma por objetivos planteados.

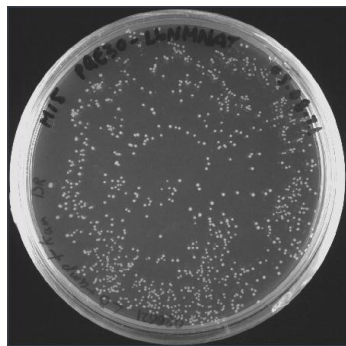
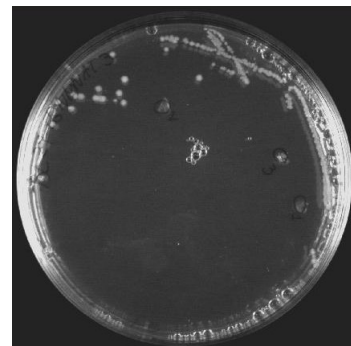
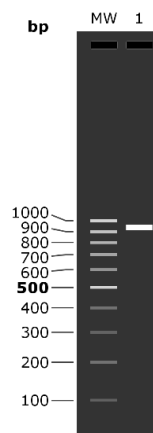
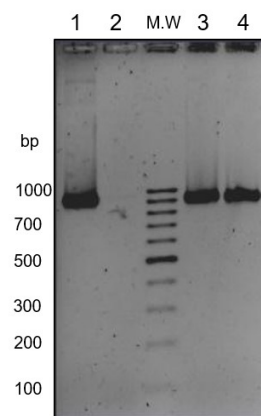
9.1 Resultados objetivo específico 1

9.1.1 Obtención de clones que expresan las proteínas 6xHis-*LbNMNAT* y 6xHis-*HsNMNAT3*

Se lograron obtener colonias aisladas M15 y BL21 para expresar las proteínas 6xHis-*LbNMNAT* y 6xHis-*HsNMNAT3*, respectivamente (**Figura 11A y B**). La presencia del gen *lbnmnat* en las colonias M15 se analizó mediante PCR virtual en el programa *SnapGene* usando el marco abierto de lectura del gen *lbnmnat* [39] (**Figura 11C**), este programa predijo un producto entre 900-1000 pb. El resultado *in silico* se verificó experimentalmente, obteniéndose el producto esperado (**Figura 11D**).

Figura 11. Se aislaron colonias de las cepas M-15 y BL21 apropiadas para la expresión de proteínas recombinantes. (A) Colonias obtenidas luego de la transformación de células *E. coli* M-15 con el plásmido pQE30-*LbNMNAT*, este plásmido confiere resistencia a penicilina lo que permite la selección de las colonias resistentes. **(B)** Estriado a partir del crioconservado de células *E. coli* BL21 que contienen el plásmido

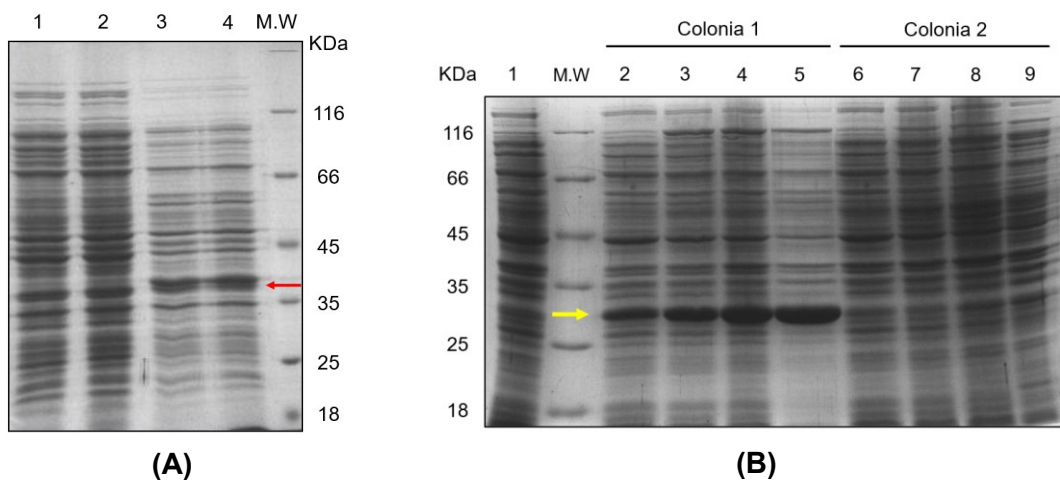
pQE30-6xHis-*HsNMNAT3*. **(C)** PCR virtual analizado en gel de agarosa 1,5%, simulado en *SnapGene*. **(D)** PCR experimental de colonias transformadas con el plásmido pQE30-LbNMNAT: Carriles: 1-Control positivo, plantilla: plásmido pQE30-LbNMNAT. 2-Control negativo, plantilla: agua. 3 y 4. Productos obtenidos de las dos colonias seleccionadas. M.W: marcador de peso molecular 100 bp. Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio.

**(A)****(B)****(C)****(D)**

Verificada la presencia del gen *lbnmnat* en las colonias M15, se procedió a realizar inducción de la proteína a partir de las dos colonias seleccionadas durante toda la noche (ON), observándose una banda del peso molecular esperado para la proteína 6xHis-*LbNMNAT* (36 kDa) en ambas muestras (**Figura 12A**). De la misma manera, se evaluó la

expresión de la proteína 6xHis-*Hs*NMNAT3 (28 kDa) en las 2 colonias aisladas en el estriado. En este caso, se evaluó la cinética de expresión a 2h, 4h y ON. Como se aprecia en la **Figura 12B** la expresión de la enzima es directamente proporcional al tiempo de inducción. También se observó que únicamente la colonia 1 expresa la proteína 6xHis-*Hs*NMNAT3, contrario a la colonia 2 que exhibe resistencia en el medio selectivo, pero no expresa la proteína de interés.

Figura 12. Las colonias aisladas M-15 y BL21 expresan las proteínas 6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3, respectivamente. (A) Expresión de la proteína 6xHis-*Lb*NMNAT (36 kDa señalada con flecha roja). Se indican las proteínas totales de células no inducidas (carriles 1 y 2) e inducidas (carriles 3 y 4) para las colonias 1 y 2, respectivamente. **(B)** Expresión de la proteína 6xHis-*Hs*NMNAT3 (28 kDa señalada con flecha amarilla). Carriles: 1- Proteínas totales de las células *E. coli* BL21 no transformadas. Se verificó la expresión a diferentes tiempos 0, 2, 4 horas y toda la noche para la colonia 1 (carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente) y para la colonia 2 (carriles 6, 7, 8 y 9 respectivamente). MW: marcador de peso molecular (kDa). SDS-PAGEs 12% teñidos con Coomassie R-250.



9.1.2 Purificación y ensayos de actividad de las enzimas 6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3

Luego de la obtención de los clones que expresan las proteínas de interés, se procedió con la purificación parcial de las mismas. Se comenzó con la lisis celular mediante la suspensión de los precipitados celulares en buffer de lisis suplementado con β -mercaptoetanol (condiciones reductoras). La adición de esta sustancia es importante para la enzima 6xHis-*Lb*NMNAT debido a su alto contenido de cisteínas (**Tabla 3**) y considerando que la expresión se realiza en un sistema heterólogo, es posible que esta proteína establezca puentes disulfuro intramoleculares inapropiados, los cuales se reducen en presencia de β -mercaptoetanol. Luego, se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados con resina de cobalto (IMAC), separando las proteínas no unidas y lavados, obteniendo, por último, 4 eluidos con la proteína parcialmente pura (**Figura 13 y B**, carriles 4). Se realiza un western blot con anticuerpo anti-histidinas corroborando la presencia de las proteínas recombinantes y un producto de degradación de la 6xHis-*Lb*NMNAT

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las enzimas *Lb*NMNAT y *Hs*NMNAT3. Se indica el número de cisteínas. Los datos se obtuvieron utilizando el servidor ProtParam tool de Expasy [76]

Propiedad	<i>Lb</i> NMNAT	<i>Hs</i> 3NMNAT
Número de aminoácidos	307	252
Peso molecular (kDa)	33,768	28,322
pI	5,41	9,28
Número de cisteínas	10	3

Seguido de la purificación, se realizó la diálisis de las dos proteínas teniendo en cuenta que la presencia de imidazol puede inhibir la actividad de las proteínas recombinantes (resultados no publicados). Con el fin de corroborar la actividad de las dos enzimas, se realizaron ensayos de actividad acoplados que evidenciaron el aumento de la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH por acción de la enzima ADH. Estos resultados indican que las proteínas parcialmente purificadas son activas (**Figura 14A y B**). La actividad enzimática se corroboró por ensayos directos analizados por RP-HPLC, los cuales confirmaron la actividad tanto de las proteínas purificadas (**Figura 14C y D**) como de las fracciones solubles desde las cuales se realizó la purificación parcial (**Figura 15A y**

B). En estos ensayos se verificaron los tiempos de retención de los dos sustratos (**Figura 15C**).

Figura 13. El protocolo IMAC permite la purificación parcial de las proteínas 6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3). **(A)** Purificación 6xHis-*Lb*NMNAT. Carriles 1-4: Fracción soluble, No unidas, Lavado 2 y eluído 2. **(B)** Purificación 6xHis-*Hs*NMNAT3. Carril 1 al 4: No unidas, fracción soluble, Lavado 1 y eluído 2. MW: marcador de peso molecular (kDa). SDS-PAGEs 12% teñidos con Coomassie R-250. **(C)** Western blot con anticuerpo anti-histidinas de los eluídos obtenidos de la purificación de las dos proteínas. En el carril de la 6xHis-*Lb*NMNAT se aprecia el producto de degradación de menor tamaño encontrado previamente [39]. La flecha roja indica el producto de degradación.

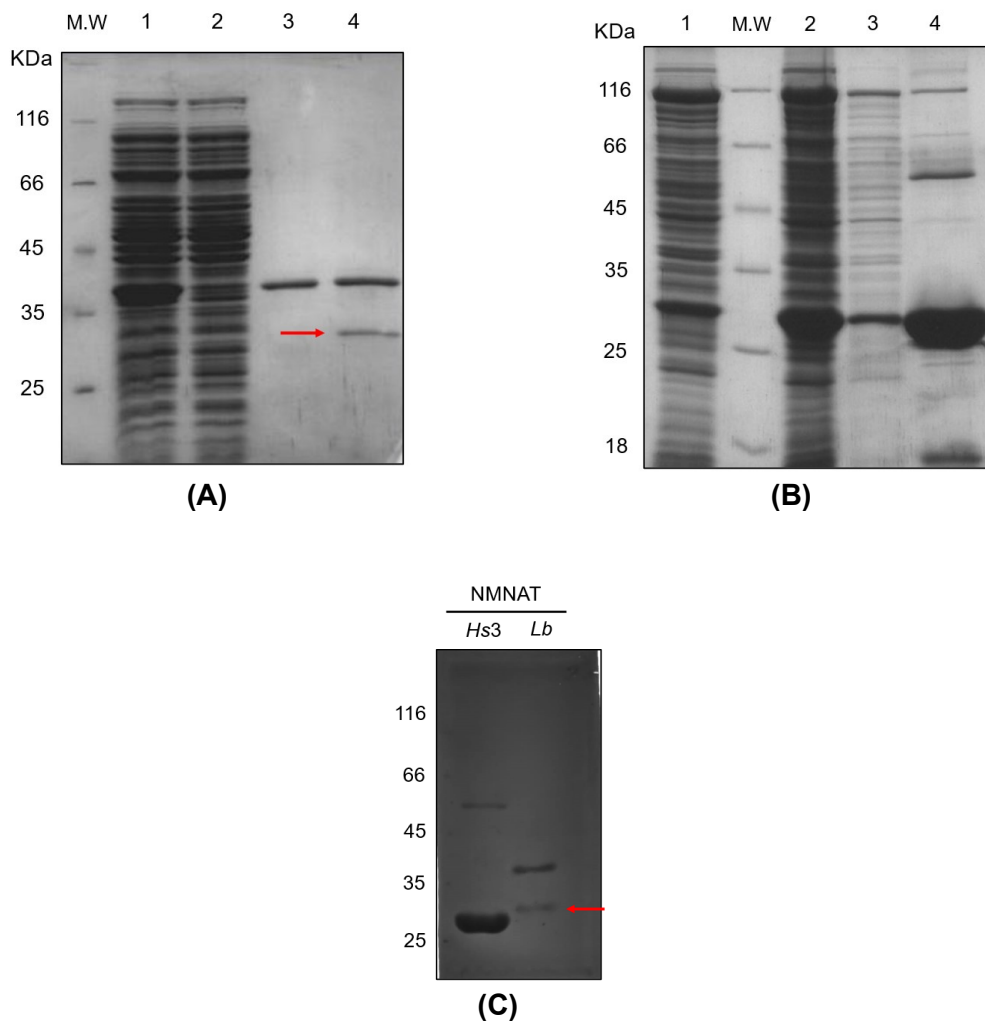


Figura 14. Los ensayos enzimáticos acoplados directos confirman la actividad de las proteínas 6xHis-LbNMNAT y 6xHis-HsNMNAT3. Ensayos enzimáticos acoplados para (A) 6xHis-LbNMNAT. (B) 6xHis-HsNMNAT3. Ensayos enzimáticos directos analizados por RP-HPLC para (C) 6xHis-LbNMNAT. (D) 6xHis-HsNMNAT3

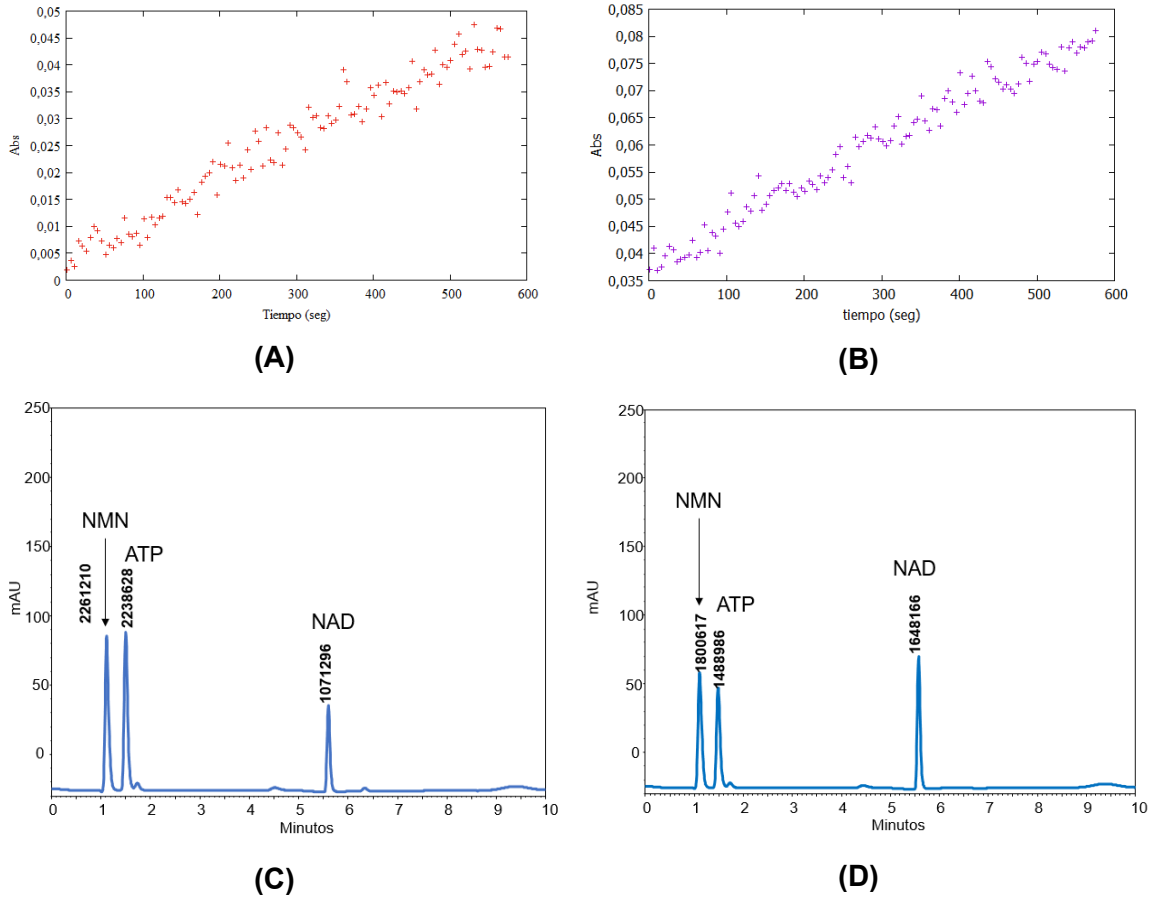
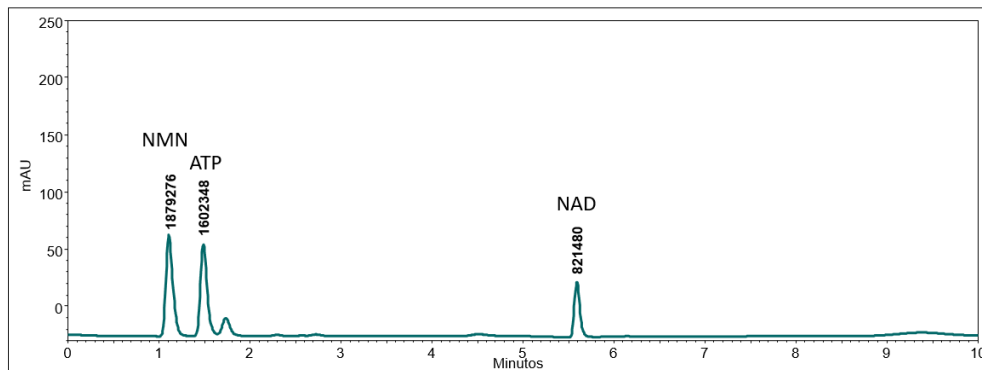
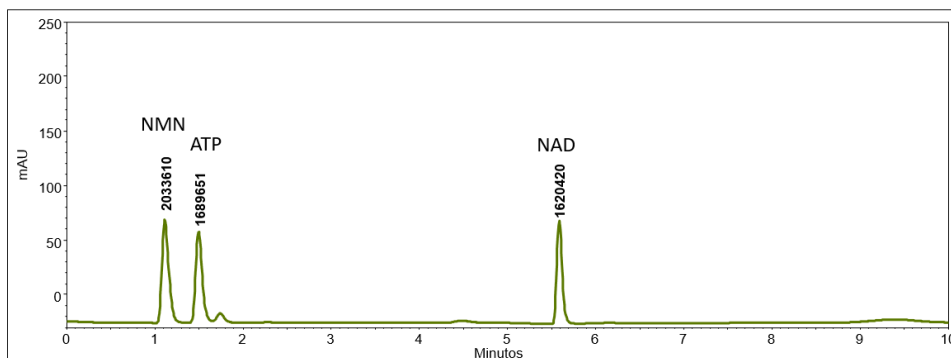


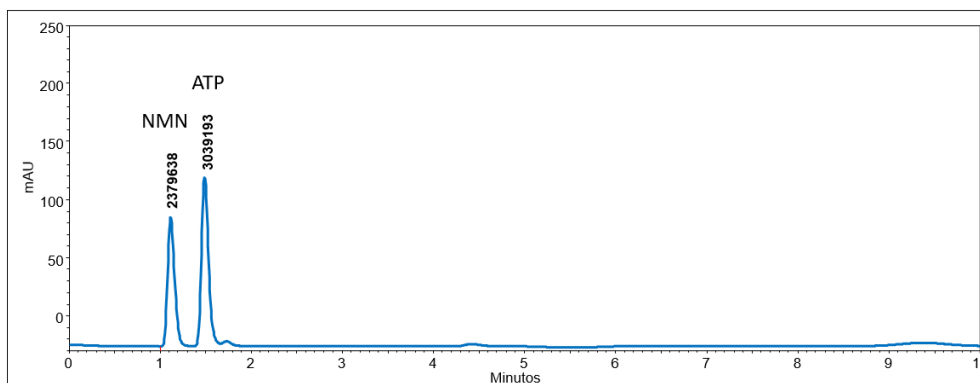
Figura 15. Cromatogramas fracción soluble de partida para la purificación de la 6xHis-LbNMNAT y la 6xHis-HsNMNAT3. (A) Ensayo enzimático para de la fracción soluble de la 6xHis-LbNMNAT se confirma que dicha fracción es activa (pico del NAD 5,6). **(B)** Cromatograma del ensayo de actividad para la fracción soluble 6xHis-HsNMNAT3, de la misma manera se verifica que la fracción es activa. **(C)** Buffer de reacción (control negativo sin enzima).



(A)



(B)



(C)

Se construyó una curva de calibración para la cuantificación del NAD (**Anexo A**) y junto con los datos del área bajo la curva de los cromatogramas de actividad se determinó el rendimiento de purificación para las dos enzimas, evidenciándose la purificación cuantitativa de ambas muestras a través de los diferentes procesos de separación (**Tabla 4**). Se evidencia mayor actividad específica en los eluidos en comparación con la fracción soluble tanto para la 6xHis-*Lb*NMNAT como para la 6xHis-*Hs*NMNAT3

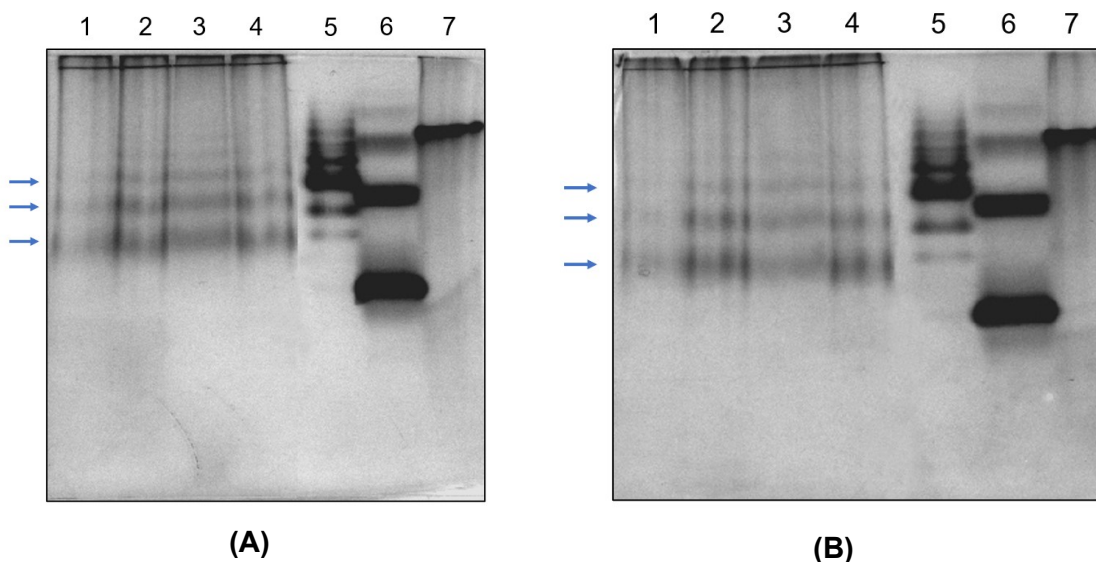
Tabla 4. Tabla de purificación de las 6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3. Se verifica el aumento de la actividad específica luego de la purificación por cromatografía de unión a metales en las dos enzimas.

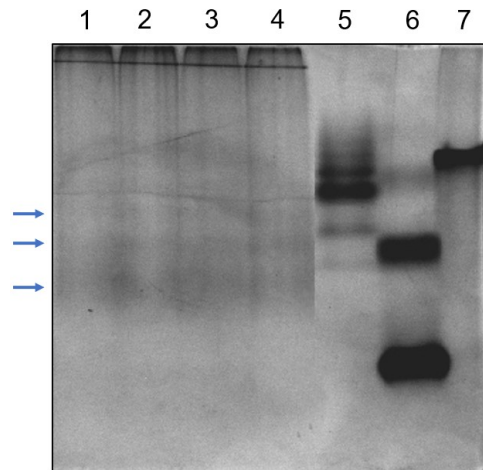
Proteína	Fracción	Concentración (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
<i>Lb</i> NMNAT	Soluble	2,97	16,3	2055	126	100	-
	Eluído	0,739	0,822	133	162	6,47	1,28
<i>Hs</i> NMNAT3	Soluble	8,33	33,3	25569	767	100	-
	Eluído	3,137	3,84	3123	814	12,2	1,06

9.1.3 La 6xHis-*Lb*NMNAT exhibe estructura cuaternaria en PAGE Nativos

Se analizaron las muestras incubadas previamente con los sustratos en geles nativos (PAGE) junto con las proteínas patrón (**Figura 16**). Con el objetivo de determinar el peso molecular de cada oligómero se construyen los gráficos de Ferguson, metodología usada por otros autores de nuestro grupo de investigación [39], [66], para ello, se midieron los Rfs de las proteínas patrón (**Tabla 5**) y de la 6xHis-*Lb*NMNAT (**Tabla 7**) y se calculó la pendiente de la función del logaritmo del Rf vs % de acrilamida (**Tabla 6**). A partir de las pendientes de la regresión, se determinó el Kr como el valor absoluto y se elaboró la gráfica $-\log Kr$ vs log de peso molecular (MW) (**Figura 17**).

Figura 16. Los geles nativos de acrilamida muestran que la 6xHis-*Lb*NMNAT se oligomeriza. Geles de acrilamida nativos (PAGE) 12 % T (**A**), 10% T (**B**), 8% (**C**). Carriles 1-4: 6xHis-*Lb*NMNAT incubada con NMN, NAD, ATP y sin la presencia de sustratos. Se señala con flechas azules las conformaciones oligoméricas encontradas Carriles 5-7: Proteínas patrón; anhidrasa carbónica, BSA y β -amilasa. Para la construcción de los diagramas de Ferguson, se tuvo en cuenta los dos oligómeros del BSA y el monómero de la anhidrasa carbónica. Como se aprecia en la imagen, la presencia o ausencia de sustratos no altera la oligomerización (presencia de bandas diferenciadas) o altera el equilibrio entre formas oligoméricas.





(C)

Tabla 5. Factor de retención medido para las proteínas patrón.

Proteína	Anhidrasa carbónica (29 kDa)	BSA (66 kDa)	BSA (132 kDa)	β -amilasa (200 kDa)
% Acrilamida	Log Rf	Log Rf	Log Rf	Log Rf
8	-0,289	-0,286	-0,104	-0,528
10	-0,290	-0,445	-0,229	-0,685
12	-0,395	-0,475	-0,269	-0,739

Tabla 6. Valores de la ecuación de la recta $-\log Rf$ vs % acrilamida. Se calcula el Kr como el valor absoluto de la pendiente de cada función.

Proteína	Pendiente	Intercepto	R ²	Kr
β -amilasa	-0,053	-0,123	0,926	0,053
BSA (kDa 132)	-0,047	0,070	0,864	0,047

BSA (kDa 66)	-0,041	0,211	0,920	0,041
Anhidrasa	-0,026	-0,061	0,755	0,026

Figura 17. Diagrama de Ferguson. Se emplearon los Kr determinados de las pendientes de la movilidad relativa de las proteínas en geles de diferente concentración de acrilamida (%T).

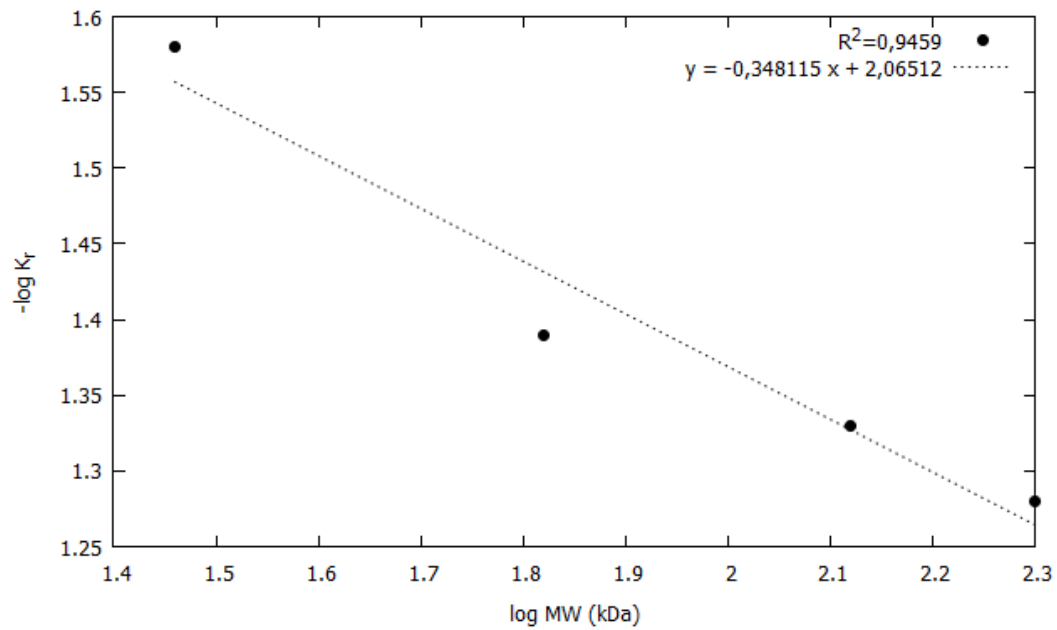


Tabla 7. Factor de retención medidos para la 6xHisLbNMNAT incubada con sus sustratos y productos.

% Acrilamida	6xHis-LbNMNAT			6xHis-LbNMNAT+ ATP			6xHis-LbNMNAT + NAD			6xHis-LbNMNAT + NMN		
	log Rf banda (inf)	log Rf (media)	log Rf (superior)	log Rf banda (inf)	log Rf (media)	log Rf (superior)	log Rf banda (inf)	log Rf (media)	log Rf (superior)	log Rf banda (inf)	log Rf (media)	log Rf (superior)
8	-0,222	-0,327	-0,387	-0,219	-0,324	-0,383	-0,223	-0,327	-0,388	-0,324	-0,315	-0,412
10	-0,299	-0,429	-0,521	-0,313	-0,431	-0,523	-0,292	-0,429	-0,547	-0,427	-0,441	-0,535
12	-0,377	-0,501	-0,577	-0,378	-0,497	-0,576	-0,372	-0,501	-0,588	-0,483	-0,471	-0,558

Con los datos obtenidos de la pendiente del diagrama de Ferguson se obtuvieron los pesos moleculares de los diferentes oligómeros formados por la 6xHis-LbNMNAT. Como se aprecia en la **Tabla 8** la 6xHis-LbNMNAT, bajo la metodología de los diagramas de Ferguson, forma dímeros, trímeros y tetrameros, además la presencia de sustratos no afecta los estados de oligomerización.

Tabla 8. Oligómeros formados por la 6xHis-LbNMNAT en presencia o ausencia sustratos. Los análisis correspondientes muestran conformaciones de dímeros, trímeros y tetrameros.

Tratamiento	Confórmero	-log Kr	log MW	MW (kDa)	MW/36	Oligómero
6xHis-LbNMNAT	Banda 1	1,41	1,88	75,22	2,09	Dímero
	Banda 2	1,36	2,02	105,10	2,92	Trímero
	Banda 3	1,32	2,13	136,21	3,78	Tetramero
6-His-LbNMNAT con ATP	Banda1	1,40	1,91	81,00	2,25	Dímero
	Banda2	1,37	2,01	102,10	2,84	Trímero
	Banda 3	1,32	2,15	141,28	3,92	Tetramero
6-His-LbNMNAT, NAD	Banda1	1,43	1,83	67,40	1,87	Dímero
	Banda2	1,36	2,02	105,10	2,92	Trímero
	Banda 3	1,30	2,19	156,09	4,34	Tetramero
6-His-LbNMNAT, NMN	Banda1	1,40	1,91	80,78	2,24	Dímero
	Banda2	1,41	1,88	75,73	2,10	Trímero
	Banda 3	1,44	1,80	63,53	1,76	Tetramero

Del mismo modo como se evaluó la 6xHis-LbNMNAT, se trató de evaluar la 6xHis-HsNMNAT3, sin embargo, no fue posible evaluarla debido a su estado catiónico al pH utilizado en los geles nativos, la cual se corroboró mediante los servidores *Pro pit⁴* y *Protein Calculator v3.4⁵* (**Tabla 9**). De este modo, la proteína 6xHis-HsNMNAT3 no migra al

⁴ <https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool>. Acceso 15/01/2023.

⁵ <https://protcalc.sourceforge.net/>. Acceso 15/01/2023.

electrodo negativo a diferencia de la proteína 6xHis-*Lb*NMNAT, imposibilitando su detección. El estado catiónico de la proteína 6xHis-*Hs*NMNAT3 se verificó experimentalmente mediante su análisis electroforético en geles nativos horizontales de agarosa a pH de 7,5 que indicaron su migración hacia el electrodo de carga opuesta (**Figura 18**).

Tabla 9. Carga calculada para la 6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3 mediante los programas Propit y Protein Caculator v3.4. La 6xHis-*Hs*NMNAT3 presenta carga catiónica a el pH de 8,8, pH en el cual se encuentran los geles nativos.

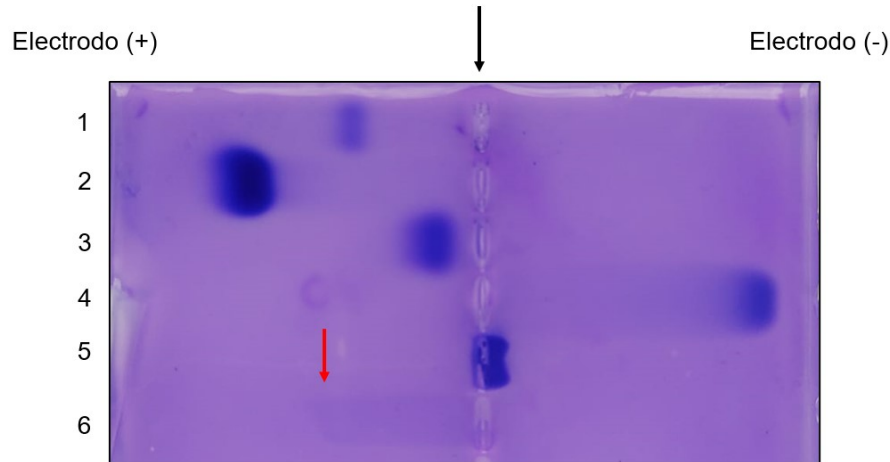
Proteína	Propit (pH 8,8)	Protein calculator v3.4 (pH 8,8)	Propit (pH 7,4)	Protein calculator v3.4 (pH 7,4)
6xHis- <i>Lb</i> NMNAT	-16,9	-15,3	-8,32	-6,7
<i>Hs</i> NMNAT3	+1,51	+2,7	+6,533	+8,2
<i>Hs</i> NMNAT3 (tetramero)	+9,56	N.N	+39,199	N.N

9.1.4 La etiqueta de histidinas altera interacciones con la fase estacionaria en SEC-HPLC

Con el propósito de corroborar los datos obtenidos por medio de los gráficos de Ferguson, se realizó cromatografía SEC-HPLC, técnica ampliamente usada para medición de pesos moleculares de proteínas en solución. Usando el caudal de inyección, el volumen de la columna, calculado con las especificaciones del fabricante, y usando el tiempo de retención del azul de dextran (patrón de peso molecular de alto peso) (**Tabla 10**) se determinó el volumen vacío de la columna. Con este dato y junto con los tiempos de retención de las

proteínas patrón (los cromatogramas se muestran en el **Anexo B**), se construyó la gráfica log MW vs K_{av} (**Figura 19**).

Figura 18. La 6xHis-*Hs*NMNAT3 está cargada positivamente en los geles de agarosa. Gel de agarosa 1,5 % en buffer TAE pH 7,5 corrido durante 1 hora a 100 v. Se confirma que la proteína 6xHis-*Hs*NMNAT3 tiene carga positiva y migra al electrodo negativo (cátodo). Del carril 1 al 6 (carga): β -amilasa (-), BSA (-), Anhidrasa carbónica (-), Citocromo c (+), 6xHis-*Hs*NMNAT3 (+) y 6xHis-LbNMNAT (-) la cual se señala con línea roja. Se identifica los pozos de siembra de las proteínas con la flecha negra.



En el caso de las proteínas 6xHis-LbNMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3, los tiempos de retención son mayores (7,97 y 7,47, respectivamente) con respecto al patrón de menor tamaño (citocromo c, 12 kDa), calculándose así tamaños aparentes menores a los esperados para los monómeros además de presentar valores de K_{av} cercanos a 1 (**Tabla 11**), un indicador de adsorciones de la muestra en la fase estacionaria [77]. Por lo tanto, se sospechan interacciones adicionales entre las proteínas recombinantes y la fase estacionaria utilizada. En consecuencia, se suplementó la fase móvil con EDTA, disminuyendo así posibles interacciones adicionales con metales contaminantes en la columna; Sin embargo, esta estrategia no generó cambios significativos en el tiempo de elución de las proteínas recombinantes (**Figura 20**).

Tabla 10. Parámetros usados para SEC-HPLC. El volumen de la columna se determina de acuerdo con las dimensiones reportadas por el proveedor.

Parámetros	
Caudal utilizado (mL/min)	0,3
Longitud (mm)	150
Diámetro (mm)	4,6
Volumen columna (mm ³)	2,5
V ₀ (mL)	0,95
Tiempo de retención Azul de dextran (min)	3,158

Figura 19. Curva Log MW vs K_{av}. Se observa un comportamiento lineal entre los volúmenes de elución y el log MW. Sólo se tuvo en cuenta el peso molecular del monómero para la anhidrasa carbónica.

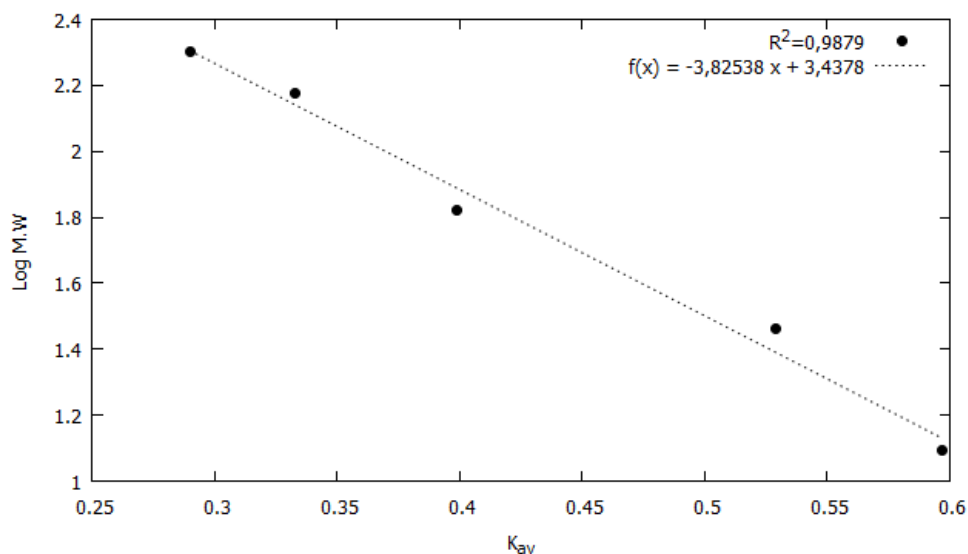
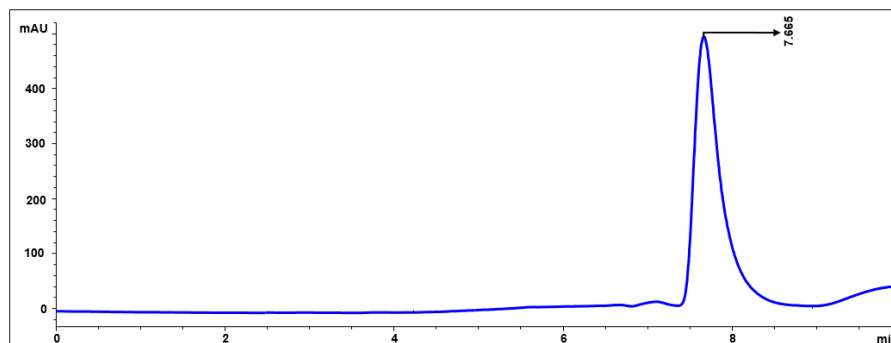


Tabla 11. Coeficientes de partición (K_{av}) de las proteínas patrón y las NMNATs recombinantes. Los pesos moleculares para la 6xHis-LbNMNATy 6xHis-HsNMNAT3 se

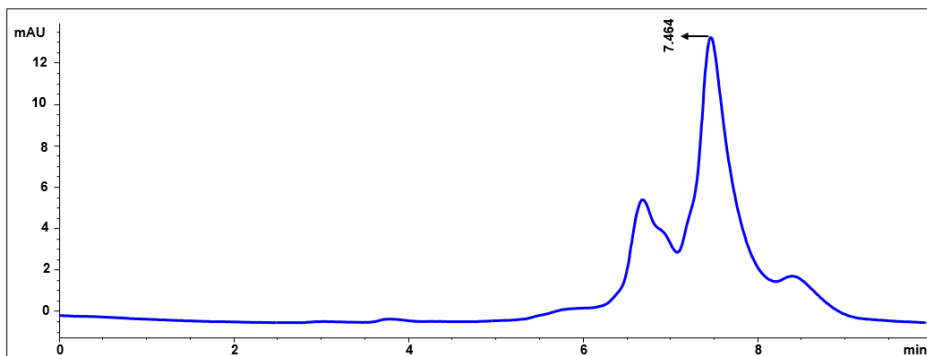
calcularon a partir de la regresión lineal elaborada por las proteínas patrón como se aprecia, los pesos obtenidos mediante SEC indican interacciones de las proteínas recombinantes con la fase estacionaria.

Proteína	Tiempo de retención (min)	Volumen de elucion (mL)	Kav	log M	Peso Molecular (kDa)
β -amilasa	4,65	1,395	0,290	2,30	200
Alcohol deshidrogenasa	4,876	1,4628	0,333	2,18	150
BSA	5,215	1,5645	0,399	1,82	66
Anhidrasa carbónica (monómero)	5,881	1,7643	0,529	1,46	29
Citocromo c	6,236	1,8708	0,597	1,09	12,4
Anhidrasa carbónica 1 (dímero)	5,399	1,6197	0,435	1,76	58
6xHis- <i>Lb</i> NMNAT	7,97	2,391	0,934	-0,157	0,7
6xHis- <i>Hs</i> NMNAT3	7,468	2,2404	0,837	0,215	1,6

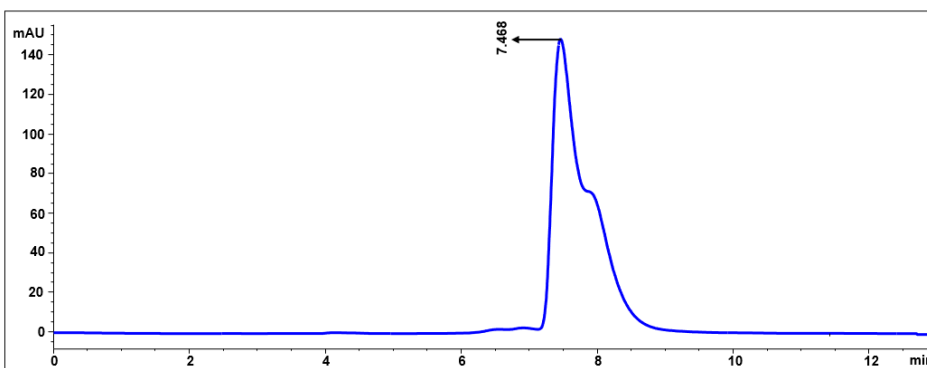
Figura 20. Cromatograma cromatografía de exclusión de tamaño de la 6xHis-*Lb*NMNAT (A) y 6xHis-*Hs*NMNAT3 (B). Se realizó una corrida cromatográfica adicional a 280 nm para la proteína 6xHis-*Lb*NMNAT en presencia de EDTA con el objetivo de disminuir posibles interacciones con la fase estacionaria; sin embargo, no se observa diferencias en los tiempos de retención (C).



(A)



(B)

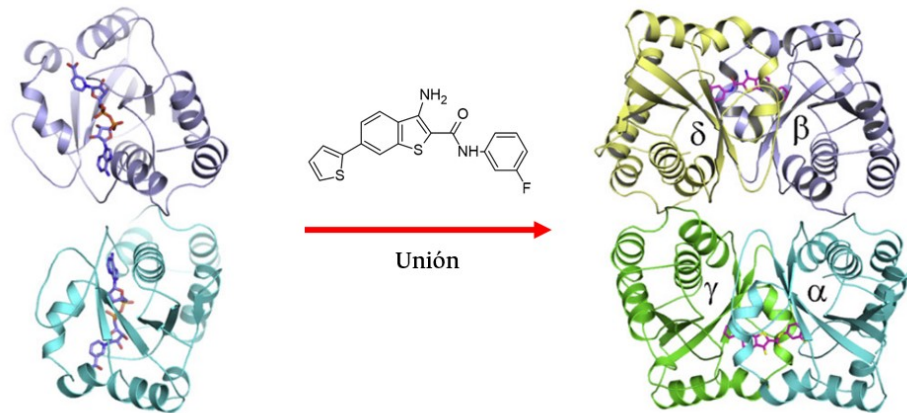


(C)

9.1.5 La presencia de Ketoconazol no altera la estructura oligomérica de la 6xHis-*Lb*NMNAT

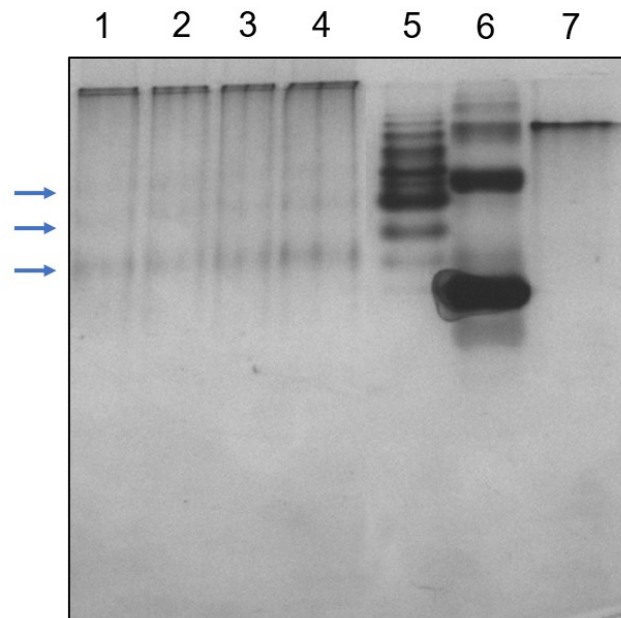
Estudios previos en nuestro grupo de investigación han mostrado una disminución de la actividad en la 6xHis-*Lb*NMNAT en presencia de compuestos imidazólicos, por lo que se planteó la hipótesis que el cambio de actividad se puede deber a modificaciones en la oligomerización debido a interacciones con medicamentos. Este tipo de cambios en la oligomerización se han visto en otras NMNATs como la de *B. anthracis* en donde hay un cambio de dímero a tetrámero debido a la unión del compuesto de clase 3 (**Tabla 1**) [12]

Figura 21. Cambio de oligomerización de la NMNAT de *B. anthracis* debido a la unión del compuesto de clase 3. La interacción de este compuesto genera cambio en la oligomerización de dímero a tetramero. Adaptado de [12].



Con el objetivo de comprobar si moléculas como el ketoconazol pueden generar modificaciones en la organización de la estructura cuaternaria, se incubó la 6xHis-*Lb*NMNAT en presencia del fármaco y posteriormente se sembraron las muestras en geles nativos, encontrándose que a concentraciones donde el ketoconazol estaba 1 y 1,5 relaciones molares no hay diferencia en la oligomerización (**Figura 22**).

Figura 22. La presencia del ketoconazol no afecta la oligomerización de la 6xHis-LbNMNAT. Carriles del 1 al 7: 6xHis-LbNMNAT en presencia de ketoconazol relación 1:1,5, relación 1;1, control con el vehículo del fármaco (DMSO), 6xHis-LbNMNAT en ausencia de alguna sustancia, anhidrasa carbónica, BSA y β -amilasa. Se indica con flechas azules las bandas respectivas para cada confórmero.



9.2 Resultados objetivo específico 2

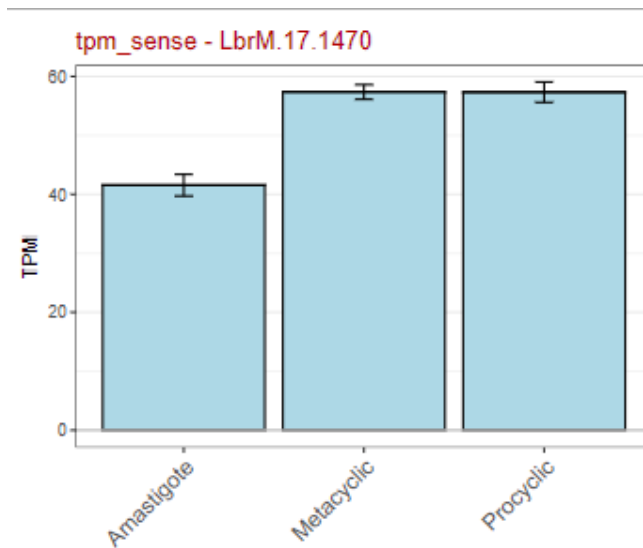
Actualmente, para la cepa de referencia de *L. braziliensis* (MHOM/BR175/M2904) se dispone de datos de transcriptómica en diferentes estadios del parásito, incluyendo amastigotes y promastigotes procíclicos y metacíclicos [78]. En relación con el gen *lbnmnat* (LbrM.17.1470), se reportan diferencias en los niveles de su transcrito en el amastigote con respecto a los otros estadios (**Figura 23**).

Sin embargo, los mecanismos de regulación subyacentes a estos patrones de expresión son desconocidos. Adicionalmente, para este gen no se han descrito sus UTRs y las proteínas de unión a estos tampoco han sido identificadas, a nivel experimental o *in silico*.

En consecuencia, en este apartado se aborda el estudio de estas UTRs y la posible existencia de proteínas de unión a ARN (RBPs) que puedan unirse a estas regiones y explicar las diferencias en los niveles del transcrito del gen *lbnmnat*, puesto que algunas RBPs promueven la estabilidad o inducen la degradación del ARNm.

Para identificar las UTRs se debe considerar que la transcripción en el género *Leishmania* es policistrónica. Luego, el ARNm policistrónico experimenta procesos de *trans-splicing* entre las secuencias intergénicas y el *Spliced Leader*, con lo cual se generan transcritos monocistrónicos, cada uno con sus UTRs 5' y 3'. Por lo tanto, la delimitación de las UTRs comienza con la identificación de los sitios de *splicing* en las secuencias intergénicas, como se describe a continuación.

Figura 23. La expresión a nivel de transcrito del gen *lbnmnat* en la cepa de referencia de *L. braziliensis* MHOM/BR175/M2904 varía en el ciclo de vida promastigote. La figura indica la abundancia del transcrito por cada millón de lecturas en los diferentes estadios del parásito. Tomada de TriTrypDB gen *LbrM.17.1470*.



9.2.1 El análisis bioinformático sugiere la presencia de diferentes sitios de *splicing*.

Con el ánimo de delimitar las UTR en el extremo 5' del gen *lbnmnat*, la región intergénica 5' seleccionada de la base de datos del TriTrypDB (longitud 954 pares de bases) (**Anexo C**), se analizó mediante tres servidores *web* (NetGene2 - 2.42, BDGP y SpliceRover), encontrándose 44 posibles sitios aceptores de *splicing* cuyos tamaños varían entre 856 y 146 pares de bases.

De estos posibles sitios de unión, la posición 431 obtuvo los mayores valores de probabilidad para aceptar el *Spliced Leader* de acuerdo con los tres predictores (**Tabla 12**). Por esta razón, se escogió la posición 431 para los posteriores análisis bioinformáticos.

La **Tabla 12** indica únicamente los dos sitios con mayor puntaje en los tres predictores. Sin embargo, no se descartan los demás sitios, por lo que se sugiere su estudio en investigaciones posteriores (**Anexo D**).

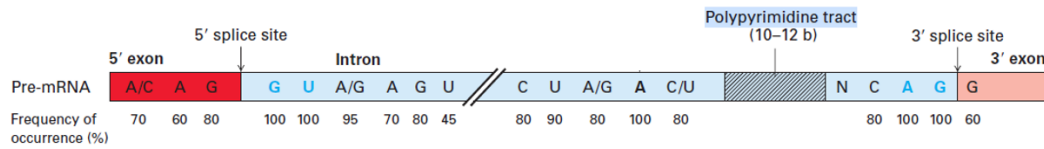
Tabla 12. Sitios más probables de *splicing* para la región intergénica 5' obtenidos mediante los programas NetGene2 - 2.42, BDGP y SpliceRover. Se escoge la posición 431 (señalada en rojo) como la posición más probable debido a que en los tres servidores es la posición con mayor puntaje. ^ indica el punto de corte y el inicio de la UTR.

Programa	Posición sitio aceptor de <i>splicing</i>	Puntaje	Región de <i>splicing</i>
NetGene2 - 2.42	431	0,82	AG^ACACT
	441	0,34	AG^ATAGC
BDGP	431	0,86	AG^ACACT
	728	0,62	AG^ACCAA
SpliceRover	431	0,98	AG^ACACT
	697	0,268	AG^GCGCA

La posición escogida como posible sitio aceptor de *splicing* aguas arriba presenta el motivo *polypyrimidine tract*, característico de las regiones de intrones cercanas a los sitios de unión 3' [79] (**Figura 24**). Este motivo al parecer también es reconocido por los tripanosomátidos al igual que es reconocido por organismos eucariontes superiores para el empalme de los dos exones, o más preciso en este caso, el empalme del *Spliced Leader* con el transcrito [80].

Figura 24 . El sitio de *splicing* predicho por los los servidores web presenta el motivo *polypyrimidine tract* característico de los aceptores de *splicing*. (A) Secuencia consenso de los intrones en eucariotas. En el proceso de cis-*splicing* de eucariotas superiores se ha identificado el motivo *polypyrimidine tract*, el cual también está presente en las regiones intergénicas de los tripanosomátidos. Adaptado de [79]. (B) Motivo *polypyrimidine tract* asociado con el sitio predicho como posible aceptor de *splicing* en la

región intergénica 5' UTR del gen *lbnmnat*. Se señala en rojo la región de inicio de la posible UTR y en verde el posible motivo *polypyrimidine tract*.



(A)

Posición posible del motivo <i>polypyrimidine tract</i>	Secuencia
418-429	CTTTCCTATTGTACAGACACT

(B)

Por su lado, para definir la UTR en el extremo 3' del gen *lbnmnat*, se inició con la identificación de una señal de poliadenilación eucarionte en la región intergénica del extremo 3' (645 pares de bases de longitud) (**Anexo C**), utilizando el programa DeepGenGrep [81]. Esta estrategia no arrojó resultados al respecto, lo cual no es sorprendente puesto que diversos reportes bibliográficos indican la ausencia de secuencias consenso para sitios de poliadenilación en los tripanosomátidos [80], [82]–[84]. En cambio, se ha reportado que la poliadenilación depende de la secuencia intergénica entre el gen de interés y aquel presente en el extremo 3' de este. Adicionalmente, el proceso de poliadenilación varía entre especies [82].

Por lo tanto, se definió la UTR 3' como la secuencia que antecede a la posición aceptora de *splicing* en este extremo del gen. Específicamente, el sitio de *splicing* corresponde a la posición 305 que también se reconoció en los tres predictores como se indica en la **Tabla 13**. Dicha tabla muestra los dos sitios más probables para cada uno de los programas, mientras que en el **Anexo D** se consignan todos los sitios sugeridos mediante esta aproximación. La posible secuencia UTR 3' del gen *lbnmnat* se presenta en el **Anexo E**.

Tabla 13. Sitios más probables aceptores de *splicing* para la región intergénica 3' obtenidos mediante los programas NetGene2 – 2.42, BDGP y SpliceRover. Se selecciona el sitio 305 (señalado en rojo) debido a que es la posición común en los tres servidores. ^ indica el punto de corte y el inicio de la UTR.

Programa	Posición sitio aceptor de <i>splicing</i>	Puntaje	Región de <i>splicing</i>
NetGene2 – 2.42	182	0,77	AG^AACAT
	305	0,38	AG^GAACA
BDGP	182	0,97	AG^AACAT
	136	0,76	AGA^GTGC
	305	0,63	AG^GAACA
SpliceRover	305	0,684	AG^GAACA
	393	0,024	AG^TGAAC

De igual forma, se hace la identificación del motivo *polypyrimidine tract*, este se indica en verde en la **Tabla 14**.

Tabla 14 En la UTR 3' del transcrito del gen *lbnmnat* se predice el motivo *polypyrimidine tract* característico de los aceptores de *splicing*. Se señala en rojo la region de inicio de la posible UTR y en verde el posible motivo *polypyrimidine tract*

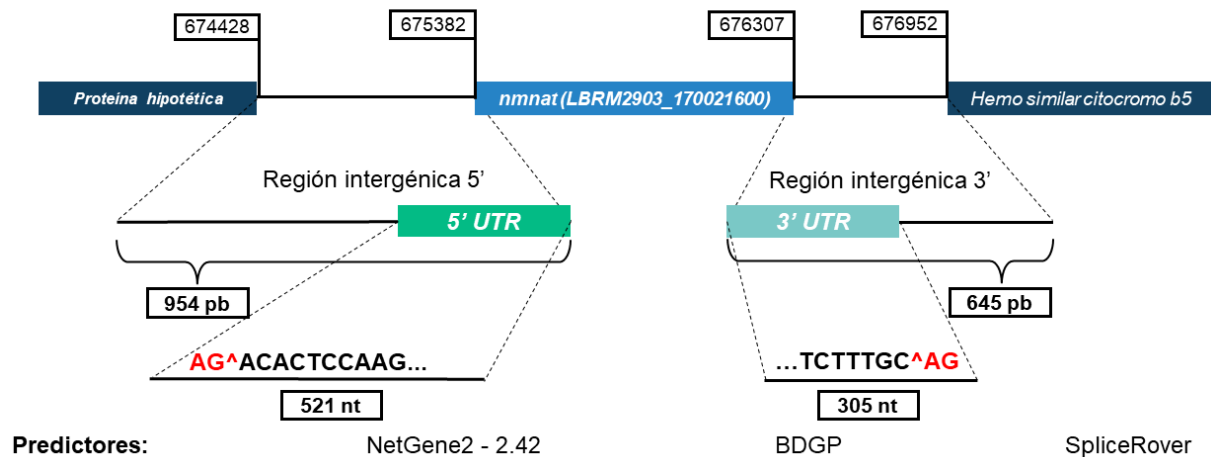
Posición posible del motivo <i>polypyrimidine tract</i>	Secuencia
293-312	CTCTTTAATTCAAGGAACA

Los resultados obtenidos en este apartado son congruentes con datos reportados para el gen ortólogo de la *lbnmnat* (LmjF.17.1340 en el TriTrypDB) de *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin; clone V1). En dicha especie se identificaron numerosos UTRs de tamaños variables en ambos extremos del gen [85].

Para resumir, a partir de las secuencias intergénicas de la secuencia 5' y 3' del gen *lbnmnat*, se determinaron UTRs posibles de 521 y 305 pares de bases, respectivamente (**Figura 25**). A partir de las UTRs delimitadas en este apartado, se realizarán análisis bioinformáticos para identificar posibles RBPs capaces de unirse a estas regiones no codificantes. Considerando que los predictores de RBPs actualmente disponibles se diseñaron para organismos superiores como insectos y mamíferos, entonces se buscarán las proteínas ortólogas correspondientes en *L. braziliensis*. Los resultados se mostrarán en la siguiente sección.

Figura 25. Determinación de las UTRs 5' y 3' del gen *lbnmnat*. Se representan gráficamente las posiciones de las bases nitrogenadas de cada una de las regiones intergénicas y su longitud, junto con los genes colindantes al gen *lbnmnat* (entrada *LBRM2903_170021600* del TriTrypDB). En la última sección, se colocan las longitudes de las UTRs encontradas para cada caso. Se indican los programas usados para esta predicción.

Cromosoma 17 *Leishmania braziliensis* cepa 2903/ hebra positiva



9.2.2 Las UTRs del gen *Ibnmnat* identificadas presentan motivos de unión a RBPs

Las UTRs posibles reconocidas en el apartado anterior se analizaron en el predictor *web* RBPmap [72]. Esta página permite reconocer motivos de unión para 145 proteínas caracterizadas en organismos como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*. De las 145 proteínas que incluye este programa, se identificaron 122 proteínas que posiblemente se unen a cada una de las UTR 5' y UTR 3' (**Anexo F**). Con esta lista, se buscó en la base de datos VeuPathDB los identificadores de cada una de las proteínas y mediante la estrategia de búsqueda de genes por ID, se identificaron proteínas ortólogas en la cepa de referencia para *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). De este modo, se encontraron 15 y 14 RBPs diferentes que posiblemente se unen a las UTR 5' y 3', respectivamente. Los genes ortólogos en *L. braziliensis* se reportan en las **Tabla 15** y **Tabla 16**.

Los genes obtenidos se buscaron en la base de datos UniProt [86] para determinar la función que desempeñan, clasificándose en procesos de *splicing*, metabolismo de ARN y represión post-transcripcional. De este análisis hubo 5 proteínas que no se clasificaron debido a que 4 representan funciones de diferenciación en *D. melanogaster* y 1 no se encontró función asociada (**Figura 26**).

Tabla 15. Proteínas identificadas en la región UTR del extremo 5' del gen *Ibnmnat*. Se enlista el código del gen, la característica principal encontrada en la base de datos VeuPathDB, la posible localización subcelular y su clasificación de acuerdo con la información reportada de Uniprot. N/A indica que el campo no se reporta en las bases de datos. Se señala en rojo los genes que se identificaron en *H. sapiens*/*M. musculus* y *D. melanogaster*.

Organismo	ID gen	Proteína reconocida en <i>Leishmania</i>	Característica	Ontología (localización)	Ortólogo	Clasificación
<i>H. sapiens</i> , <i>M. musculus</i>	LbrM.04.1190	DRBD3	Proteína 3 de doble dominio de unión a ARN	citoplasma; citosol; nucleoplasma; núcleo; complejo ribonucleoproteico	PTBP3	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.11.0480	Putativa	Repeticiones de Ankyrin (3 copias) /Repeticiones de Ankyrin (muchas copias)	N/A	ANKHD1	Metabolismos ARN
	LbrM.16.1650	U1-70K	Ribonucleoproteína nuclear pequeña u1 70 kda	U1 snRNP; núcleo	SNRNP70	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.18.1450	PUF2	Proteína pumilio, putativa	citoplasma	PUM2, PUM1	Represora post-transcripcional
	LbrM.25.0080	PABP3	Proteína de unión a poli(A) 3	citoplasma; núcleo	PABPC1, PABPC4, PABPC3	Metabolismos ARN
	LbrM.26.0790	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	núcleo	RBM8A	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.28.0880	putativa	Proteína de unión a ARN rbp16, putativa	citoplasma; mitocondrión; nucléolo	YBX1	Metabolismos ARN
	LbrM.29.0900	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	nucleoplasma	SNRPA	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.29.2890	Putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP)	citoplasma	TRA2A	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.30.2560	Putativa	Proteína de unión a ARN	N/A	PABPN1	Metabolismos ARN

	LbrM.32.0940	DRBD4	Proteína de unión al <i>polypyrimidine tract</i> , putativa	gránulo de estrés citoplasmático; nucleoplasma; núcleo	PTBP3	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.32.3050	putativa	Proteína de unión a ARN, putativa	núcleo	RBM28	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.33.1360	PUF6	Pumilio proteína 6, putativa	citoplasma	PUM2, PUM1	Represora post-transcripcional
	LbrM.34.4980	PABP1	Proteína de unión a poliadenilato 1	citoplasma; gránulo de estrés citoplasmático; núcleo	PABPC1, PABPC4	Metabolismos ARN
<i>D. melanogaster</i>	LbrM.25.0080	PABP3	Proteína de unión a poli(A) 3	citoplasma; núcleo	PABP	Metabolismos ARN
	LbrM.34.4980	PABP1	Proteína de unión a poliadenilato 1	citoplasma; gránulo de estrés citoplasmático; núcleo	PABP	Metabolismos ARN
	LbrM.35.5680	putativa	Proteína de unión al punto de ramificación	nucleoplasma; núcleo	SF1	Implicada en <i>splicing</i>

Tabla 16. Proteínas identificadas en la región UTR del extremo 3' del gen *lbnmat*. Se enlista el código del gen, la característica principal encontrada en la base de datos VeupathDB, la posible localización subcelular y su clasificación de acuerdo con la información reportada de Uniprot. N/A indica que el campo no se reporta en las bases de datos. Se señala en rojo los genes que se identificaron en *H. sapiens*/*M. musculus* y *D. melanogaster*.

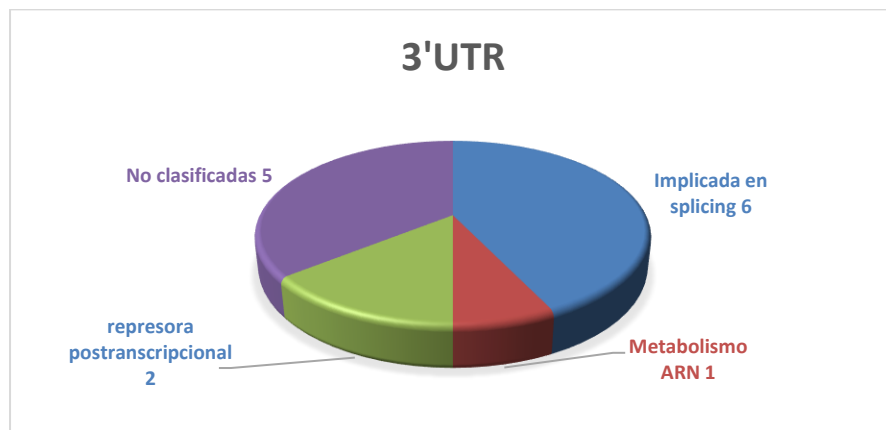
Organismo	ID gen	Proteína reconocida en <i>Leishmania</i>	Característica	Ontología (localización)	Ortólogo	Clasificación
<i>H. sapiens</i> , <i>M. musculus</i>	LbrM.04.1190	DRBD3	Proteína 3 de doble dominio de unión a ARN	citoplasma; citosol; nucleoplasma; núcleo; complejo ribonucleoproteico	PTBP3	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.16.1650	U1-70K	Ribonucleoproteína nuclear pequeña u1 70 kda	U1 snRNP; núcleo	SNRNP70	Implicada en <i>splicing</i>

	LbrM.18.1450	PUF2	Proteína pumilio, putativa	citoplasma	PUM2, PUM1	Represora post-transcripcional
	LbrM.26.0790	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	núcleo	RBM8A	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.28.0880	putativa	Proteína de unión a ARN rbp16, putativa	citoplasma; mitocondrion; nucléolo	YBX1	Metabolismo RNA
	LbrM.29.0900	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	nucleoplasma	SNRPA	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.32.0940	DRBD4	Proteína de unión <i>al polypyrimidine tract</i> , putativa	gránulo de estrés citoplasmático; nucleoplasma; núcleo	PTBP3	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.32.3050	putativa	Proteína de unión a ARN, putativa	núcleo	RBM28	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.33.1360	PUF6	Proteína pumilio 6, putativa	citoplasma	PUM2, PUM1	Represora post-transcripcional
<i>D. melanogaster</i>	LbrM.18.0190	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	N/A	SXL	Desarrollo sexual
	LbrM.18.0200	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	N/A	SXL	Desarrollo sexual
	LbrM.18.1450	PUF2	Proteína pumilio, putativa	citoplasma	PUM	Represora post-transcripcional
	LbrM.29.0900	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	nucleoplasma	SNF	Implicada en <i>splicing</i>
	LbrM.29.1500	putativa	Proteína de unión a ARN, putativa	N/A	SXL	Desarrollo sexual
	LbrM.29.1510	putativa	Proteína de unión a ARN, putativa	N/A	SXL	Desarrollo sexual
	LbrM.29.2890	putativa	Motivo de reconocimiento de ARN. (también conocido como dominio RRM, RBD o RNP), putativa	citoplasma	CG5213	N/A
	LbrM.33.1360	PUF6	Proteína pumilio 6, putativa	citoplasma	PUM	Represora post-transcripcional

Figura 26. Clasificación de las RBPs ortólogas que se unen posiblemente a las regiones no codificantes del gen *lbnmna1*. A partir de las UTRs delimitadas en este estudio se encuentran 15 proteínas que se unen al extremo no codificante 5' **(A)** y 14 proteínas al extremo no codificante 3' **(B)**. Estas proteínas se clasifican de acuerdo con su función.



(A)

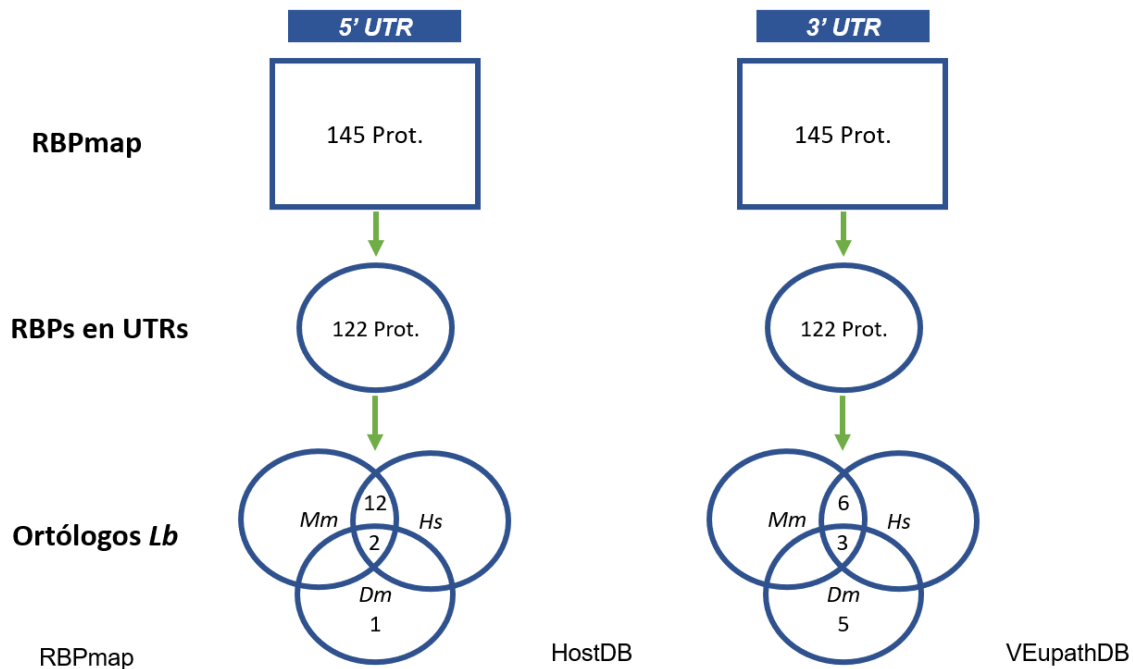


(B)

En resumen, en este apartado se identificaron 122 RBPs previamente reportadas en *M. musculus*, *H. sapiens* y *D. melanogaster* que posiblemente se unen a las UTRs 5' y 3' delimitadas en este estudio. A partir de estas 122 proteínas, se encontraron ortólogas en *L. braziliensis* para la UTR 5' (15 RBPs) y 3' (14 RBPs), respectivamente **(Figura 27)**.

Figura 27. Resumen de las RBPs de unión de las regiones no codificantes del gen *lbnmat*. Se identificaron 15 RBPs para la UTR del extremo 5' y 14 para el extremo 3' del gen de estudio. Mm: *M. musculus*, Hs: *H. sapiens*, Dm: *D. melanogaster*.

Análisis de proteínas de unión a ARN (RBPs)



Los datos obtenidos bioinformáticamente deben ser verificados en el plano experimental. En consecuencia, en este estudio se incluyó un objetivo específico para la obtención de las UTRs del gen desde muestras de ARN de promastigotes de *L. braziliensis*, puesto que se encontraron diferentes sitios de posible *trans-splicing*. Los resultados obtenidos se abordarán en el siguiente capítulo.

Por su parte, la comprobación experimental de las proteínas de unión a ARN se plantea como perspectiva de este trabajo, lo cual podría establecer una línea de investigación interesante para entender la biología del parásito, puesto que la regulación de la expresión génica y los cambios morfológicos asociados al ciclo de vida de este patógeno depende de la unión de estas proteínas.

9.3 Resultados objetivo específico 3

En el apartado anterior se realizó una aproximación *in silico* para delimitar las regiones no codificantes del gen *lbnmnat* que son importantes para la regulación post-transcripcional en *L. braziliensis*. No obstante, se encontraron diferentes sitios posibles para el proceso de *trans-splicing*. Todos estos podrían conducir a la maduración del transcrito final.

En consecuencia, la verificación de las UTRs obtenidas en el apartado anterior es de vital importancia en modelos *in vitro*, además, disponer de este tipo de ARN sería indispensable para estudios posteriores para explorar la estructura secundaria de dichas regiones que puede ser de utilidad para entender la biología del organismo y analizar proteínas de unión a las UTRs.

9.3.1 El protocolo de extracción de ARN permite la obtención de cDNA

Partiendo de promastigotes de *L. braziliensis* en fase estacionaria, se extrajo el ARN con el método del Trizol. Posterior a la extracción, el ARN se resuspendió en 50 μL de agua DEPC y se midió la concentración, encontrándose a 1288,8 ng/ μL . Adicionalmente, a la muestra se le midió la relación de 260/280 y 260/230nm, hallándose valores de 2,05 y 2,45, respectivamente. Estas dos relaciones son un indicativo de la pureza de la muestra, pues a 280nm se mide la absorción de aminoácidos aromáticos como tirosina y triptófano y a 230nm se mide pureza con respecto a trazas de fenol o urea. Los valores entre 1,9 y 2,0 indican un ARN extraído con buena pureza [87].

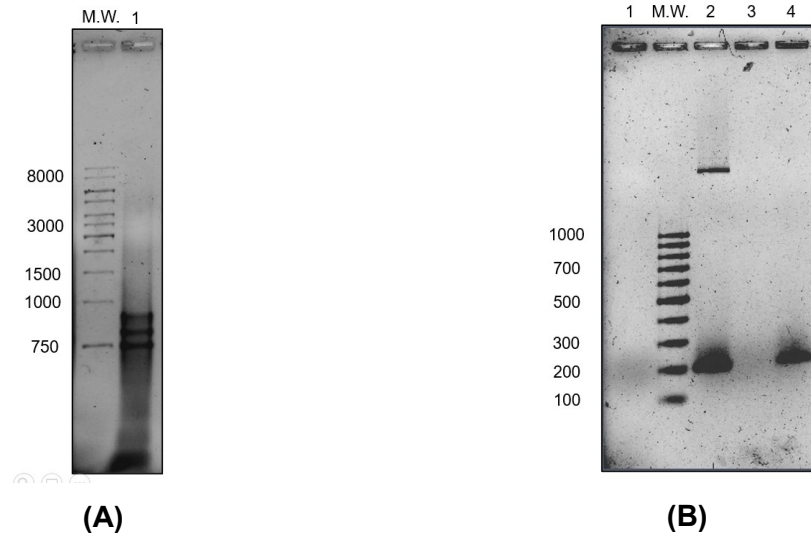
Las mediciones de absorción son un buen indicativo del contenido de bases nitrogenadas; no obstante, estos valores no pueden determinar la integridad de la muestra, por esta razón se realizó un gel de agarosa en presencia de hipoclorito de sodio (condiciones

denaturantes para ARNasas). En el gel obtenido se observan 3 bandas características del ARN ribosomal de *Leishmania* que constituye el 80% del ARN extraído, indicando una buena integridad de la muestra obtenida (**Figura 28A**) [88].

Una vez verificada la pureza e integridad de la muestra, se procedió a la síntesis de cDNA usando primers OligoT y la enzima retrotranscriptasa. La síntesis de cDNA se verificó por medio de la amplificación del transcrito de α -Tubulina, una proteína del citoesqueleto [89] que se transcribe constitutivamente y que es usada como control de síntesis de cDNA en reportes científicos [90], [91]. Como plantillas para el experimento se utilizaron tres muestras: **1)** ARN no tratado con DNAsas, donde se aprecia el amplicón esperado de 197 pares de bases y un producto de alto peso molecular (la secuencia del gen de α -tubulina se encuentra en el **Anexo G**), indicando que la muestra contenía trazas de ADN genómico (ADNg). **2)** ARN tratado con DNAsas antes de la retrotranscripción, donde no se obtiene ningún amplicón, indicando la digestión exitosa de cualquier traza de ADNg. **3)** cDNA sintetizado, donde se obtiene un producto esperado de 197 pares de bases, correspondiente al transcrito del gen control (**Figura 28B**).

Figura 28. El protocolo de extracción de ARN y síntesis de cDNA en *L. braziliensis* permiten la amplificación del control de α -Tubulina. (A) Gel de agarosa 1% con hipoclorito de sodio en TAE. M.W: pesos patrón de pesos moleculares de 1kb. Carril 1: ARN extraído de *L. braziliensis*, donde se observan las tres bandas características del ARN ribosomal de estos parásitos. Este patrón concuerda con reportes previos [88]. **(B)** Control de síntesis de cDNA. Gel de agarosa TBE 1%. Carriles 1-4: control negativo (sin plantilla); plantilla de ARN sin tratar con DNAsa, se observa el amplicón esperado de 197 pares de bases y un producto de alto peso molecular demostrando contaminación por ADNg; plantilla de ARN tratado con DNAsa que no indica productos; plantilla de cDNA, donde se

confirma que el proceso de síntesis de cDNA fue exitoso. Los dos geles se tiñeron con bromuro de etidio.



9.3.2 Optimización de la temperatura de anillamiento para la UTRs del transcrito del gen *lbnmnat*.

Con el cDNA sintetizado a partir del primer Oligo dT, se montaron los experimentos para amplificar la región UTR del extremo 3' del transcrito del gen *lbnmnat*, pero dicha región; usando las temperaturas de anillamiento de 45, 50, 55 y 60°C, además de diluciones de 1:10, 1:50, 1:100; no se pudo amplificar. Esta evidencia plantea la necesidad de implementar una estrategia de amplificación con primers diferentes o incluso, el uso de otros experimentos basados en secuenciamiento de ARN. Considerando que estas estrategias superan el alcance del presente trabajo, se proponen como perspectiva de investigación.

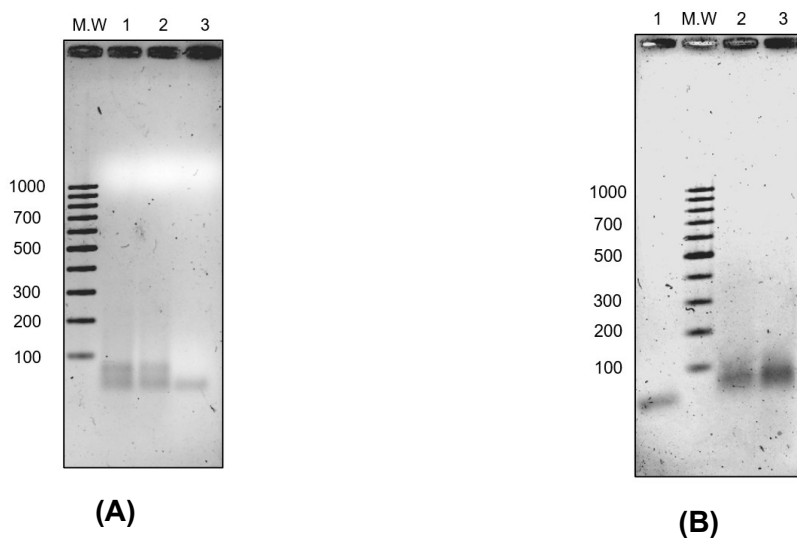
Por su parte, para obtener la UTR de la región 5' del gen, se sintetizó el cDNA utilizando un primer reverso específico para esta región (**Tabla 2, fila 5**). Luego, el cDNA obtenido se utilizó como plantilla en reacciones con 50, 55 y 57°C como temperatura de anillaje. A

esta última temperatura, se obtuvo una banda de 80 pares de bases, cuyo tamaño es menor al tamaño esperado para el UTR 5' delimitado en este estudio (521 pb) (**Figura 29**).

Considerando el tamaño del amplicón obtenido, se hace necesario implementar técnicas para su purificación y posterior secuenciamiento, con el propósito de verificar la secuencia amplificada y compararla con los posibles UTRs sugeridos por la estrategia *in silico* implementada en este estudio. Actualmente, se está adelantando la estandarización de estos experimentos.

Hasta este punto, el resultado presentado en la (**Figura 29**) constituye la primera aproximación experimental relacionada con la determinación de la UTR 5' del gen *nmnat* en la especie *L. braziliensis*.

Figura 29. Las condiciones de reacción para la UTR del extremo 5' del transcrito del gen *lbnmnat* permiten aislar un producto de alrededor de 80 pares de bases. (A) PCR usando la plantilla del cDNA sintetizado con el primer específico reverso para la UTR 5'. Gel de agarosa TBE 1%: M.W: marcador de peso molecular. Carriles 1-2: temperatura de anillamiento de 50°C y 55°C, respectivamente. Se observa un producto tenue de 80 pares de bases; Carril 3: negativo (sin plantilla), se observa una banda de 50 pares de bases que corresponde a dímeros de primers. **(B)** Productos de la amplificación de la región UTR 5' a mayores temperaturas. Gel de agarosa TBE 1%. Carriles 1-3: negativo (sin plantilla), se aprecian dímeros de primers; temperatura de 55°C de anillamiento; temperatura de 57°C de anillamiento.



En resumen, a partir de la metodología planteada, se pudo sintetizar un cDNA íntegro que puede servir como plantilla para la amplificación de la UTRs 5', estableciéndose un precedente para este tipo de estrategia experimental

10. Discusión de resultados

El NAD es una molécula que cada vez adquiere más relevancia a nivel biológico debido a su participación en diferentes procesos celulares pues, junto con su forma fosforilada, está implicada en los procesos de síntesis de biomoléculas como aminoácidos, lípidos, bases nitrogenadas y carbohidratos, así como en el catabolismo de estas. Además, su metabolismo es objeto de estudio de diferentes síndromes y enfermedades como cáncer [92], [93], envejecimiento [94], cardiopatías [95] y desordenes neurodegenerativos [96].

De las enzimas que sintetizan al NAD se destaca la NMNAT, que se ha propuesto como un blanco quimioterapéutico para combatir microorganismos como *Bacillus anthracis* [12]. Además, se ha estudiado su efecto neuro protector [97] y su función como chaperona [98], [99]. Es por estas razones que el entendimiento de la oligomerización de esta enzima, así como su regulación génica en parásitos causantes de enfermedades tropicales como la leishmaniasis, adquiere importancia en el contexto molecular y en la salud pública.

En este trabajo, implementando herramientas experimentales y bioinformáticas, se abordó el estudio de los posibles efectos estructurales de la presencia de sustratos y medicamentos como el ketoconazol sobre la organización oligomérica de la *LbNMNAT*, así como el análisis de potenciales mecanismos de regulación post-transcripcional para la expresión del gen correspondiente, destacándose los aspectos de discusión que se presentan a continuación.

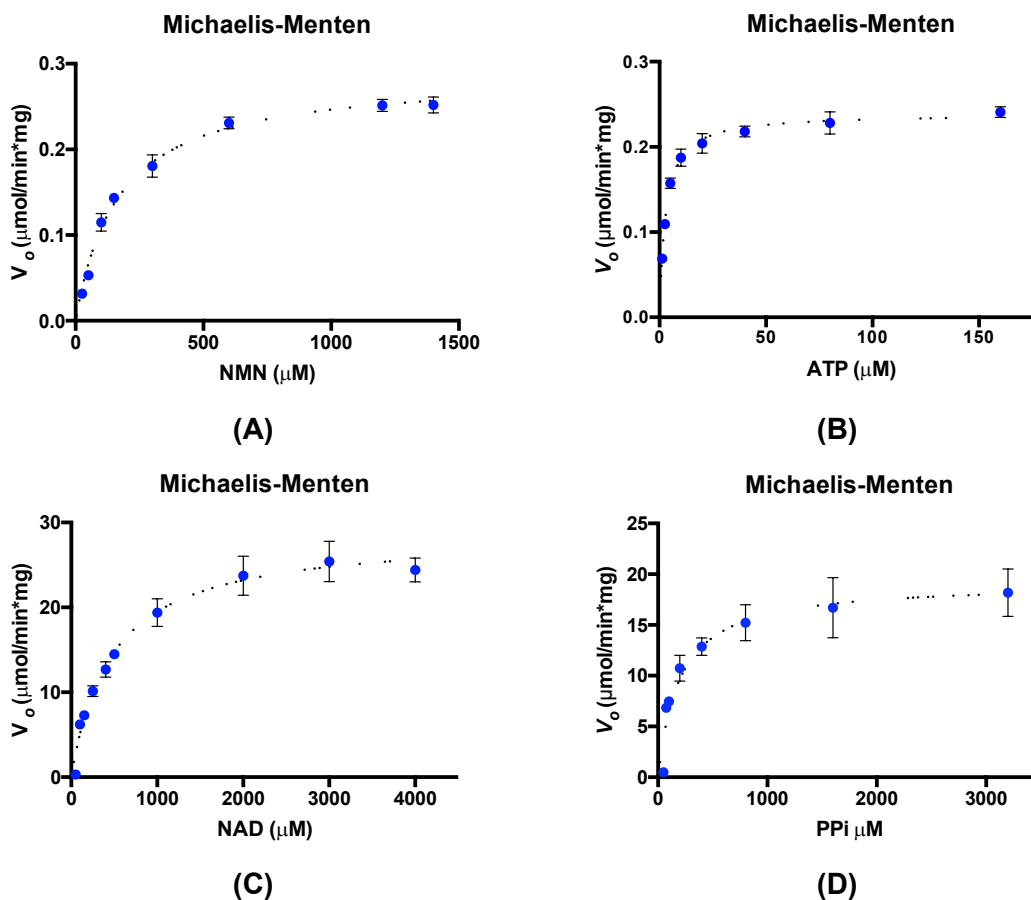
10.1 Efecto de los sustratos en la oligomerización de la *Lb*NMNAT

La construcción y análisis de diagramas de Ferguson indicaron que la proteína recombinante 6xHis-*Lb*NMNAT presenta conformaciones oligoméricas de dímero, trímero y tetramero, tanto en presencia como en ausencia de NMN, ATP y NAD. No se observaron diferencias en la abundancia de alguna estructura cuaternaria cuando la enzima se incubaba con estas sustancias. Estos datos estructurales corroboran observaciones cinéticas previas para esta enzima [39], puesto que no se registran comportamientos sigmoideos, como se espera en enzimas alostéricas sujetas a cambios estructurales a nivel de estructura cuaternaria (**Figura 30**). En este sentido, los sustratos y producto de la enzima analizados en este estudio parecen no ser reguladores homotrópicos.

Adicionalmente, nuestras observaciones reafirman resultados reportados por Sershon *et al* [59], dado que en la mayoría de estas enzimas no se presentan cambios en la oligomerización, sino que su regulación se efectúa por cambios en las interacciones establecidas entre las superficies de los dímeros.

Figura 30. Parámetros enzimáticos de la 6x-His*Lb*NMNAT. El comportamiento cinético no presenta una curva sigmoide indicando que estos sustratos no ejercen una regulación alostérica de tipo homotrópico. Tomado de [39]. **(A)**: Variación de la velocidad con respecto

al NMN. **(B)**: Variación de la velocidad con respecto al ATP. **(C)**: Variación de la velocidad con respecto al NAD. **(D)**: Variación de la velocidad con respecto al pirofosfato (PPi)



Por otro lado, la construcción de diagramas de Ferguson basados en técnicas en matriz sólida como PAGE, pueden presentar diferencias entre los datos obtenidos en solución, ya que en los geles nativos se realiza el experimento con concentraciones de proteína mayores a las usadas en solución, reportándose que la concentración de estas puede cambiar la forma de su asociación [100]. En consecuencia, se sugiere para estudios próximos, métodos en los cuales se disponga la proteína en matriz acuosa tipo FPLC y contrastarlos con los datos obtenidos en este trabajo. La cromatografía de exclusión de tamaño es una alternativa viable para este tipo de estudios y, en caso de usarla, se recomienda suplementar la fase móvil con las sustancias a evaluar (sustratos y/o producto), para evitar que mientras la muestra se desplaza a través de la columna pierda

el metabolito y el equilibrio se desplace hacia la forma disociada o, dicho de otro modo, hacia la forma monomérica.

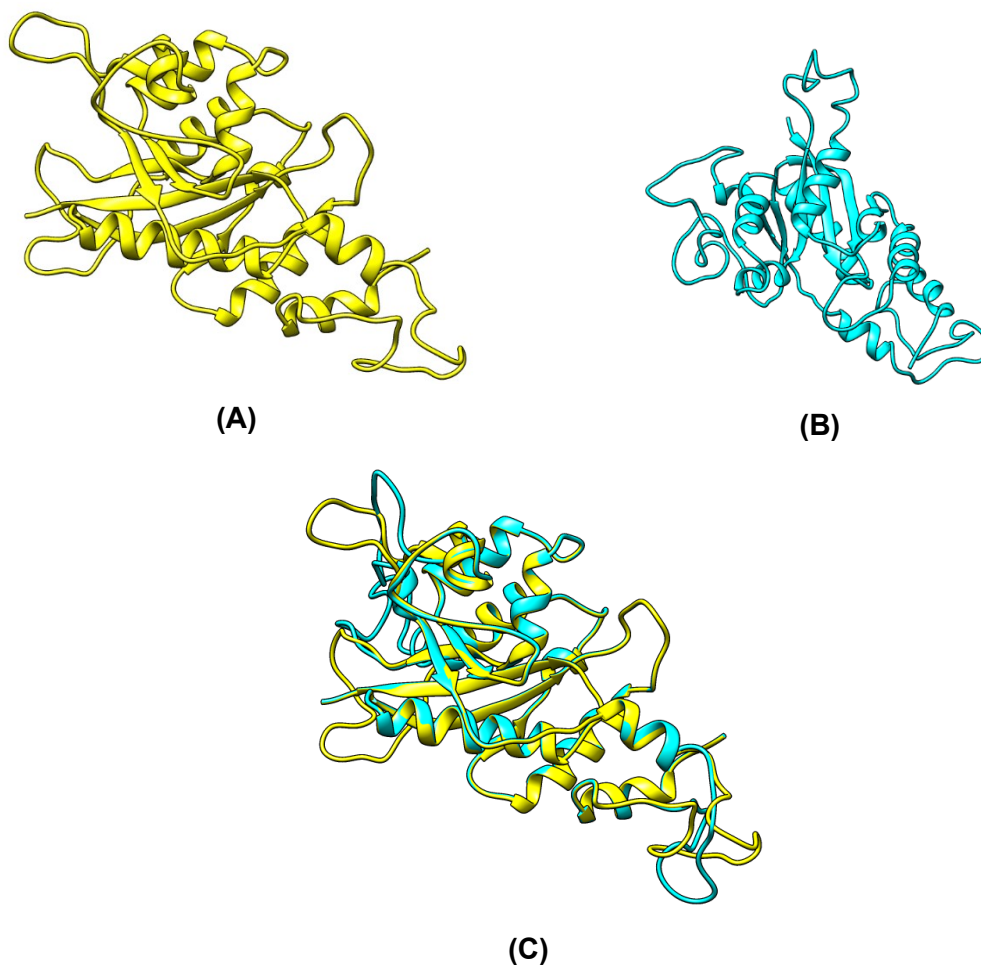
Respecto a los resultados obtenidos en columna de exclusión por tamaño (SEC-HPLC), se espera que la separación de las proteínas en este tipo de técnicas sean debidas a efectos entrópicos [101], es decir, que la separación solo se dé como un tamiz molecular y no por interacciones adicionales como interacciones iónicas. Por lo tanto, los experimentos que se realizaron en presencia de EDTA seguían la lógica de aumentar la fuerza iónica y quelar metales que estuvieran presentes en la fase estacionaria, sin embargo, esta estrategia no funcionó para impedir la exclusión anómala de las proteínas recombinantes con etiqueta 6xHis utilizadas en este estudio (6xHis-*Lb*NMNAT y 6xHis-*Hs*NMNAT3). A manera de sugerencia se propone experimentar con otro tipo de contra ión como el potasio, es decir, usar sales de fosfato de potasio para preparar la fase móvil en vez de usar sales de sodio [102].

Además de utilizar los sustratos de la enzima, se sugiere explorar el efecto de otros metabolitos, en este sentido, de acuerdo con los resultados reportados por Berger *et al* [52], se pueden utilizar metabolitos reducidos como el NMNH y el NADH, puesto que la enzima es capaz de procesarlos y actualmente no se conocen estudios de su efecto estructural. Por otro lado, dada la conexión entre el metabolismo energético del NAD y rutas catabólicas como, por ejemplo, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, se sugiere hacer estudios con citrato u otros ácidos pertenecientes a esta ruta metabólica. Esta idea se encuentra fundamentada, dado que en estudios previos en donde se han cristalizado las proteínas homólogas de la NMNAT en *E. coli* [13] y *Pseudomonas aeruginosa* [103], se ha observado que el citrato usado en la solución de cristalización se une a cavidades de las enzimas, sugiriendo una posible regulación heterotrópica por este metabolito.

Se ha reportado que la presencia de la etiqueta 6xHis no genera efectos significativos en actividad de la enzima recombinante [59]; sin embargo, modelaciones *in silico* para la *Lb*NMNAT en el programa SWISS-MODEL [104] exhiben diferencias en regiones

diferentes a las del sitio catalítico que podrían cambiar las interacciones proteína-proteína (**Figura 31**). Por lo tanto, se sugiere remover la etiqueta de histidinas que podría variar los resultados obtenidos en este estudio.

Figura 31. Modelación *in silico* de la proteína *Lb*NMNAT y 6xHis-*Lb*NMNAT. (A) *Lb*NMNAT en amarillo. Se observa el plegamiento típico Rossmann con las hélices α y láminas β . (B) 6xHis-*Lb*NMNAT en azul. (C) Superposición de las dos enzimas. Como se aprecia, no hay diferencia en el centro catalítico (plegamiento Rossmann) pero si en las regiones *coils*, que podrían participar en interacciones proteicas de oligomerización. Todas las figuras se modelaron en SWISS-MODEL [104].



Como aspecto adicional, en este trabajo se corrobora la carga positiva que presenta la proteína 6xHis-HsNMNAT3 a pH 7,4, lo cual contrasta con el punto isoeléctrico reportado (6–0 - 7.0) cuando se purificó por primera vez la enzima endógena desde tejido humano placentario [105]. La diferencia se puede explicar por modificaciones postraduccionales que presentan las NMNATs endógenas y que no pueden recrearse en un sistema de expresión heterólogo procariota como el utilizado en este estudio.

10.2 Estudio bioinformático de las UTRs del gen *lbnmnat*.

Considerando que los tripanosomátidos se caracterizan por la ausencia de factores de transcripción y promotores definidos, entonces los mecanismos de regulación de expresión génica a nivel post-transcripcional adquieren una relevancia especial en estos modelos.

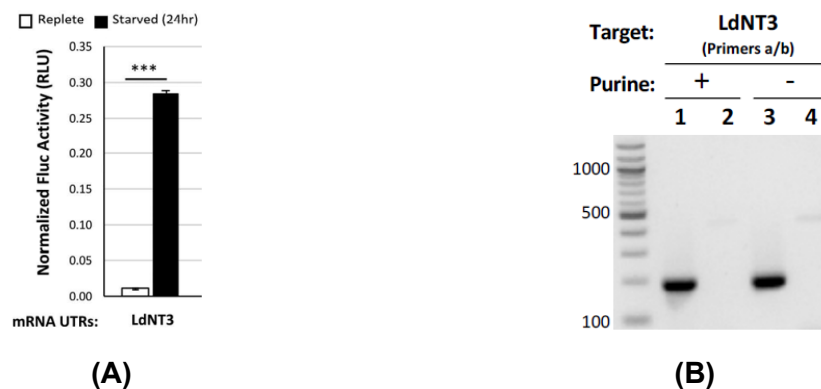
Por esta razón y con el propósito de realizar un acercamiento a los mecanismos de regulación relacionados con el gen *lbnmnat*, se abordó el estudio de sus UTRs y las RBPs asociadas que podrían explicar las variaciones del transcrito que han sido reportadas.

En este aspecto, se han abordado estudios similares que relacionan la longitud de los UTRs del gen codificante para el transportador 3 de purinas y condiciones de estrés o los estadios del ciclo de vida en *L. donovani* (*LdNT3*) [106]. Específicamente, cultivando parásitos en condiciones de estrés como la ausencia de purinas, se encontró un aumento de la señal del transcrito y de la proteína correspondiente (**Figura 32A**), con respecto a la condición control, sin haber diferencias en la longitud de la UTR 3' en las dos condiciones (**Figura 32B**). El estudio concluye que la diferencia en la abundancia del transcrito se debe a un motivo de estructura secundaria denominado *stem-loop*, sugiriendo que la regulación de la expresión del transportador no solo se debe a la unión de RBPs, sino también a elementos de estructura secundaria en el transcrito.

Estas evidencias indican la utilidad de abordar el estudio de UTRs en parásitos de *Leishmania* para analizar eventos bioquímicos, validando en parte nuestro acercamiento, puesto que en el trabajo en mención también se aplicó la técnica RT-PCR.

En consecuencia, la verificación experimental de las UTRs sugeridas en este estudio para el gen *lbnmna1* es de vital importancia en modelos *in vitro*, además, tener este tipo de ARN sería indispensable para estudios posteriores como explorar la estructura secundaria de dichas regiones que puede ser de gran utilidad para entender la biología del organismo y la identificación de proteínas de unión a las UTRs.

Figura 32. Las condiciones de ausencia de purinas en *L. donovani* generan un aumento la expresión del gen *ldnt3*, pero no varían las longitudes de la UTR del extremo 3' del gen. (A) Expresión diferencial del gen *ldnt3* en presencia (blanco) y en ausencia (negro) medido con el gen reportero de la luciferasa. Se observa un aumento de la expresión de la proteína. **(B)** Productos de PCR de ARN maduro mediante la amplificación de primers OligoT. Producto del extremo 3'UTR en presencia de purinas (1) y ausencia (3), negativos respectivos (2 y 4). No se aprecia diferencia en el producto de PCR en los dos experimentos. Adaptado de [106].



En cuanto a las RBPs identificadas que podrían unirse a las UTRs del gen *lbnmna1*, se destaca la proteína DRBD3 (LbrM.04.1190), dadas sus siguientes características: esta RBP es una proteína citoplasmática que participa en el complejo de traducción de *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* [107], la cual bajo condiciones de estrés oxidativo se

transloca al núcleo [108]. Es conocida la función del NAD como coenzima en los sistemas de respuesta ante estrés oxidativo [109], pues constituye el cofactor que regenera estos sistemas en el parásito. De este modo, resulta interesante que, bajo condiciones oxidantes, la proteína DRBD3 pueda unirse a las UTRs del gen *lbnmnat* estimulando su traducción y favoreciendo una mayor síntesis de NAD en el parásito, necesario para activar los sistemas anti-oxidantes para resistir las condiciones hostiles del macrófago infectado.

Un aspecto de discusión adicional se relaciona con los múltiples posibles sitios aceptores de *splicing* identificados, los cuales podrían generar UTRs de distinta longitud en el gen *lbnmnat*, otorgándole funciones diversas, como aquellas reportadas en las proteínas de tipo *moonlighting*. Estas proteínas se caracterizan por ejercer varias funciones según las condiciones celulares [110], constituyendo ejemplos clásicos la aconitasa y la fructosa-bisfosfato aldolasa que no solo actúan en la glicólisis, sino que también son RBPs [111] o factores de transcripción [112], respectivamente.

En el caso específico de *Leishmania* también se ha reportado la existencia de este tipo de proteínas. Por ejemplo, la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *L. major* (*LmGAPDH*), participa en la ruta glicolítica del parásito, pero adicionalmente puede exportarse hacia los macrófagos infectados del hospedero, donde actúa como RBP. En este caso, la enzima se une al UTR 3' del transcrito del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), proteína importante para combatir el parásito, reprimiendo su traducción [113].

Dos características que comparte la enzima *LmGAPDH* con la *LbNMNAT* es que ambas, además de presentar el dominio Rossmann de unión a nucleótidos [114], ejercen varias funciones *moonlighting*. Para la NMNAT se ha reportado su participación en la síntesis de NAD, así como su función de tipo chaperona [99]. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, sería interesante indagar si la presencia de UTRs de diferente longitud en el gen *lbnmnat* podría relacionarse con sus funciones *moonlighting*.

Por último, si bien la estrategia bioinformática implementada en este trabajo permitió la identificación de RBPs para las UTRs del gen *lbnmat*, no se descarta la obtención de proteínas adicionales mediante estrategias *in silico* más sofisticadas o incluso, técnicas experimentales como el entrecruzamiento de proteínas blanco con secuencias específicas de ARN [115].

10.3 Verificación experimental de las UTRs obtenidas *in silico*

La metodología de síntesis de cDNA y su uso como plantilla para amplificación mediante PCR, ha sido usada en *Leishmania* para la caracterización de las UTRs de la α -Tubulina [89] y de proteínas de choque térmico [116]. Aunque esta es una técnica de biología molecular bastante sólida, en ocasiones genera resultados experimentales diferentes a los resultados esperados según las predicciones bioinformáticas, como se observó en este trabajo para la UTR 5'. Posiblemente, la existencia de múltiples sitios aceptores de *splicing* impide predecir con exactitud la longitud del UTR. En este sentido se requiere la optimización de este tipo de técnicas o la implementación de otras aproximaciones experimentales como RACE-PCR o RNA seq.

11. Conclusiones y recomendaciones

11.1 Conclusiones

En este trabajo se estudiaron mecanismos estructurales y de regulación génica acerca de la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis*; efectos sobre la estructura cuaternaria por la presencia de sustratos y un medicamento de tipo imidazol; y la regulación post-transcripcional tanto por sus elementos *Cis* (UTRs) como por elementos *Trans* (RBPs), contribuyendo al conocimiento de la enzima clave en la ruta de síntesis del NAD en este importante parásito.

11.1.1 Conclusiones específicas

A través de los diagramas de Ferguson se encontró que la proteína 6xHis-*Lb*NMNAT presenta oligomerización como dímeros, trímeros y tetrámeros, además la presencia de sustratos y el fármaco ketoconazol no afecta los estados de oligomerización.

Mediante la técnica SEC-HPLC con la columna Yarra SEC-X300 y buffer fosfato de sodio 100 mM a pH 6.8, las proteínas con etiqueta 6xHis exhiben interacciones adicionales con la fase estacionaria, aumentando sus tiempos de retención esperados.

El transcrito de la *Lb*NMNAT presenta elementos aceptores de *splicing* que posiblemente estén implicados en la regulación en los extremos 5' y 3'. Las longitudes más probables

halladas por análisis bioinformático para estas regiones UTRs 5' y 3' posibles son de 521 y 305 pares de bases, respectivamente.

Se identificaron 15 RBPs que posiblemente se unen al extremo regulador 5' del transcrito de la proteína *LbNMNAT* y 14 proteínas al extremo 3', las cuales participan en procesos de *splicing*, poli-adenilación y regulación transcripcional.

Se estandarizó el protocolo de extracción de ARN y síntesis de cDNA para estudios posteriores de las UTRs asociadas al gen *lbnmnat*.

11.2 Recomendaciones

Se sugiere la evaluación de la oligomerización con otro tipo de metabolitos, como los del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y así determinar si existe regulación heterotrópica de la enzima *LbNMNAT*.

Para estudios posteriores se recomienda la eliminación de la etiqueta de 6xHis, dado que se sospecha que interfiere con los análisis SEC-HPLC.

El estudio de las proteínas encontradas que interaccionan con las UTRs pueden ser una nueva línea de investigación para entender la regulación génica de la *LbNMNAT*.

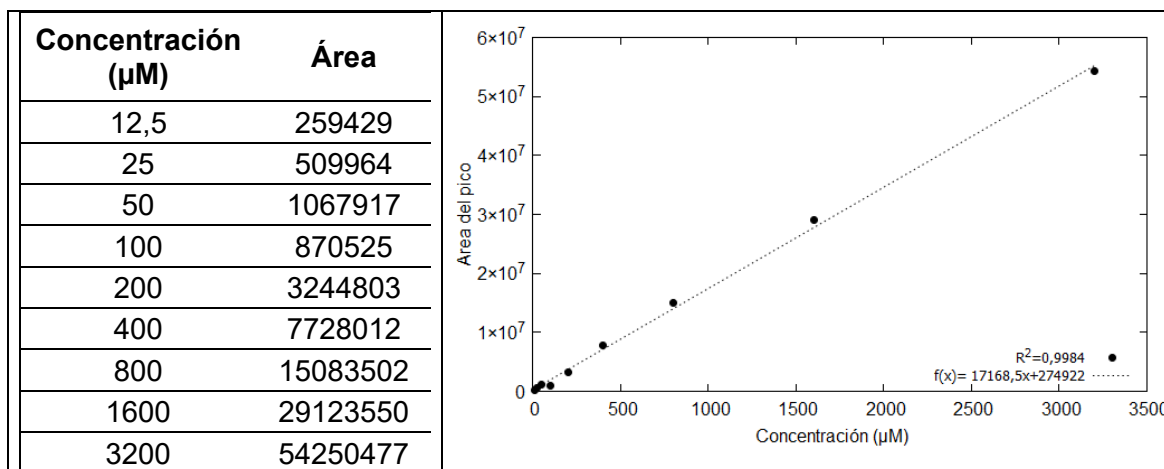
Se recomienda el estudio de los diferentes UTRs asociados al gen *lbnmnat* y su relación con las funciones *moonlighting* de la enzima correspondiente.

Se plantea la obtención experimental de las UTRs del gen *lbnmnat* por medio del diseño de nuevos primers o condiciones de reacción, así como su secuenciamiento.

A. Anexo A

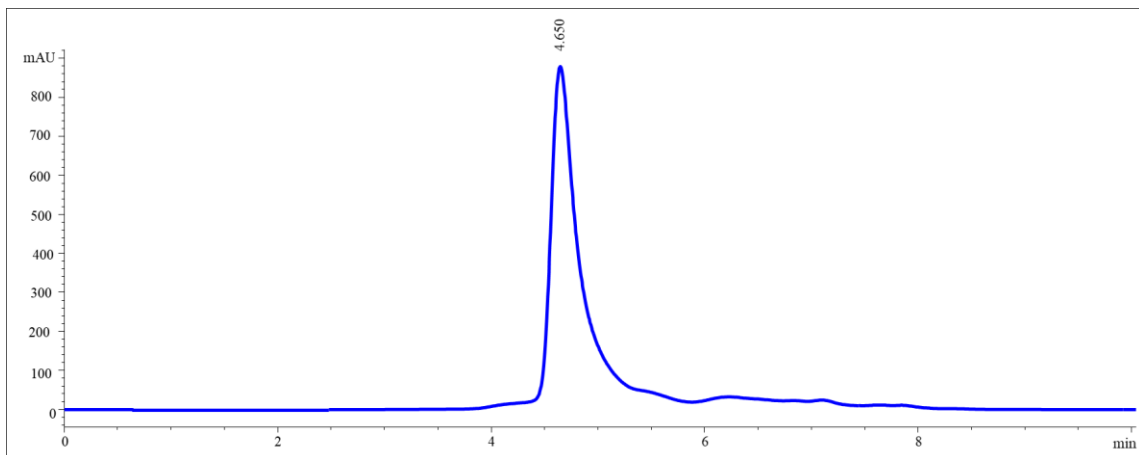
Curva de calibración del NAD

La curva de calibración del NAD se creó tomando el área de la curva del pico y se relacionó con la concentración correspondiente. Posteriormente se hizo la regresión lineal de las dos variables encontrándose una tendencia lineal ($R^2= 0,9984$):

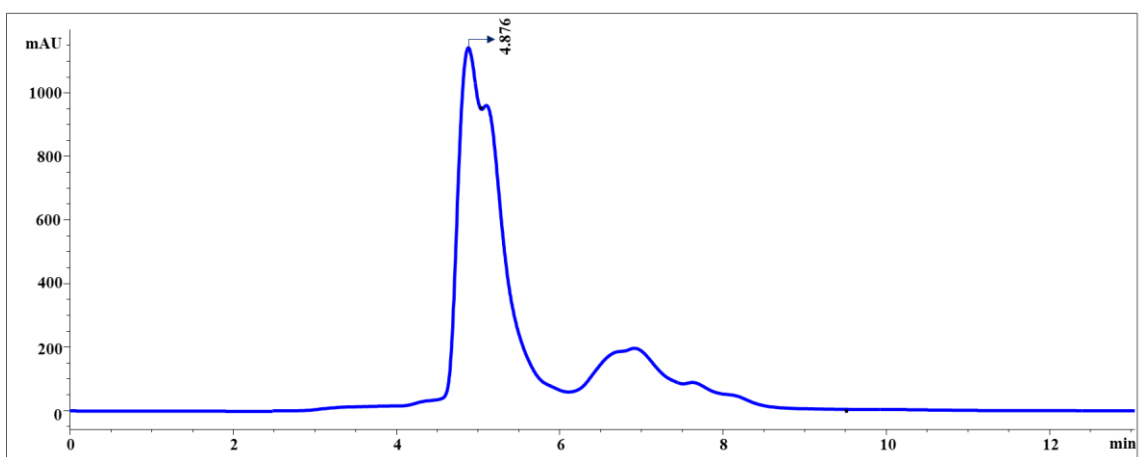


B. Anexo B

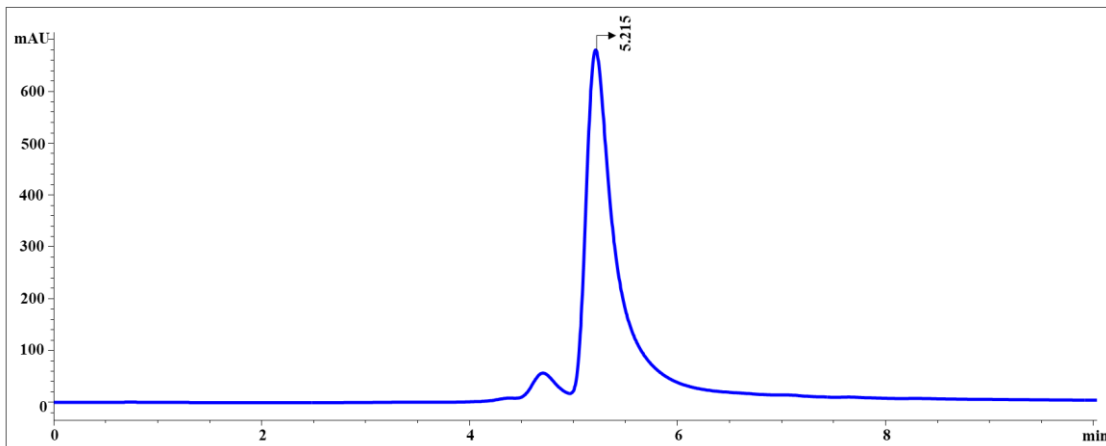
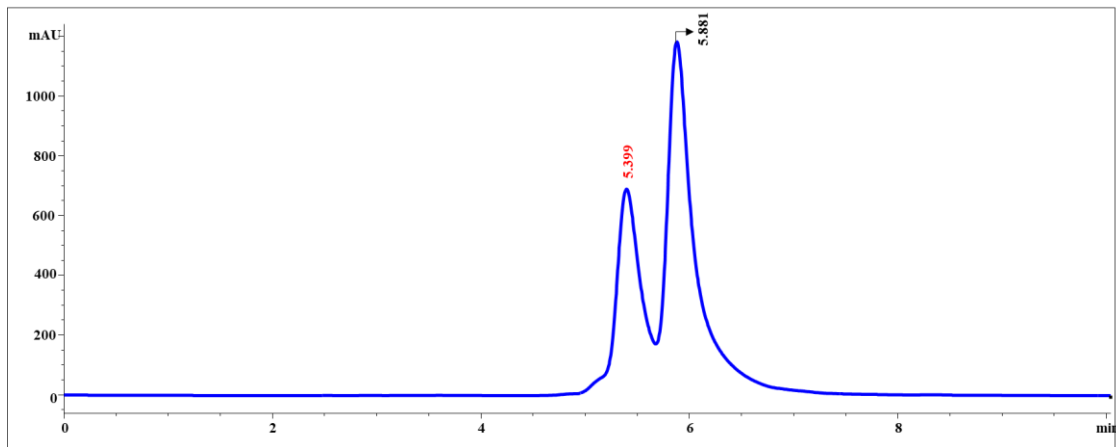
Cromatogramas de las proteínas patrón usadas en SEC.



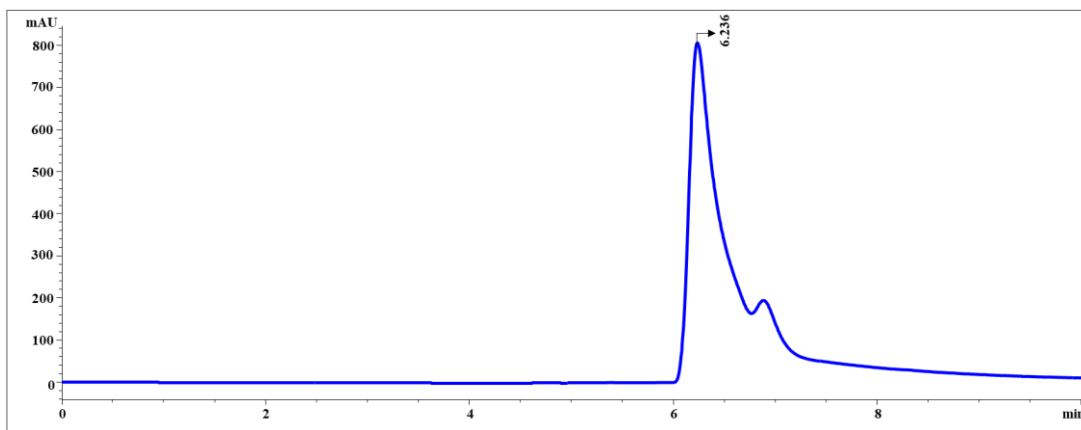
β -amilasa



Alcohol deshidrogenasa

**BSA**

Anhidrasa carbónica. Se indica el tiempo de retención del monómero en negro y del dímero en rojo.

**Citocromo c**

C. Anexo C

Secuencias intergénicas 5' y 3'

En rojo se señala la región posible aceptora de *splicing* y en verde el motivo *polypyrimidine tract* característico de los sitios de *splicing* 3'

>5UTR_ibNMNAT

```
AGGTGGAGGCGCACCTGCGGCTGACACGTACGTGCGCACCCCCGCTCACTGAGG
AATTGGTGGTGTGTCAAGGGACATACCACACTACGTTTGCTAGTATTTTCTGAGCCC
GTGTCCTTCGTGACGGAGGGCGACCTGCTTTTGCCGCTAGAGAACACAACGAGGCG
GCATGTAGAGCGCAAGTGGTATGGGGAGTGC GGCGCACAAGACGTTGGGCTCGCA
TTTTGCGCAACCTAAAAACGAGATGACGCAACGCTGCACTTTGTGCGCCGTTGTGACG
TGCCTCGCTCCCCACCCCCGCCCCGCTACTCATCACGCGAGGAGTTGCCATCTCGGT
GCTTCGGGCGGTAGATGGTCACCATCATTTCTCTCCCTTGGACTCCCCCGTACCCTC
ACCCTGTCCGCTCCTTCGTGCTTACTTTCTATTGTACAGACTCCAAGATAGCTGA
ACCAGCCGCCACGCTGTGCCTGCGCGAGGAAGTGGTGGACAAGCAGAGACGAGGC
CCGGATTAGACCCGCCGCTGCAACCTCGTTCAATCTCGTACAACCCAGGCTGCCAC
TGCGCCTCCCCCCCCCCCCCTCGAGGAGAGACAAAATCAAACAACTAACACGAG
CCAAGACAGGGAAGAAAAGGAGCGTTGACTACAAGAAGAGGCGCACGCTCTGCACC
TTACGCAGCGAACGATCATTCTCAGGCGCAGACTGCCTCTCGCCGTCTCCGCTAGA
CAAACGAGAGGAAGTGCTTCCCTGCGTATGTCGTGAGTTGTAGTCGCTGTGCGTG
TGCGTCTGTTTGGCAAGGCCAGTGTGTCTGCTGCTCTCGATGTGGTCTGCTCCATCG
GCCAGCTGGTGGGAGAGAAGAAAGCGAGAGTGTGCGGGGCGACGTCCCCGTAC
TGACGCCAACGACTGAGAAGAAAAGCCAAAGCAAAGACGTGGTGGGGAGCCAAAA
```

>3UTR_ibNMNAT

```
CAGGGCACGCAGTAGGCAGATGAAGGCGAGGCGGCAGCGAGTAGAGTGAGGAGG
CAGCCGTGCTGCAGTCGTCACGAGAGCACAGTGCGGCTCCCGTGGGCGTACCCCC
CTTTCATCCTCCGTTCACTTTTGATCTAGAGTGCTGAACATGGGTGTGCCTAGTTCTT
GTATTGCTTCTTTGCAGAACATATCATGTGACACGGGTGACACGGTACAATGCACAA
TGAGTGATGCACACAGTCACGCTGCCAGCGAATCAAGTGCGCCCTCTCCAGCACTG
TTTCCTGTTTCTCTTTAATTTCAAGAACATCAGTTACACGGCACTATCAGACA
GGACTCATCATACGCGTGTTTGTGCCGTTAACCTTGATGCGTTGAGTCTCTTTTAGT
```

GAACCATACACTGCAACTTTCAGAGACTCAACGCCTCTCTTATCTGTTCCCTGCCACTG
TCTTCCCGTTGTGACACCCCTGCCTCCTCCCTCCTCCTCGATTGACTGTCACGTGC
GTTGTTGCTCTATTTGCTTCTCCACCTCCGGAGTTGCGTGGACCAGTACGGGAG
CAGAAGCCACATCACCTTTTCTCTCGTCCTCACGCACGTACCGCCATTTTAACCC
ACGCGAGCAAGGGGCACGGC

D. Anexo D

Predicción sitios aceptores de *splicing*

Sitios de posibles aceptores de *splicing* de la región intergénica 5'. Se señala en rojo los sitios más probables aceptores de *splicing* con su respectiva posición.

Programa	Posición sitio aceptor de <i>splicing</i>	Puntaje	Región de <i>splicing</i>
NetGene2 - 2.42	431	0,82	AGACACT
	441	0,34	AGATAGC
	801	0,32	AGGCCAG
	727	0,26	AGACCAA
	806	0,25	AGTGTGT
	445	0,20	AGCTGAA
	107	0,19	AGCCCGT
	128	0,19	AGGGCGA
	454	0,18	AGCCGCC
	772	0,18	AGTCGCT
	96	0,17	AGTATTT
	766	0,07	AGTTGTA
BDGP	431	0,860	AGACACT
	728	0,620	AGACCAA
SpliceRover	431	0,980	AGACACT
	697	0,268	AGGCGCA
	552	0,086	AGGCTGC
	727	0,082	AGACCAA
	625	0,054	AGGGAAG
	497	0,041	AGACGAG
	621	0,035	AGACAGG
	703	0,034	AGACTGC
	513	0,033	AGACCCG
680	0,032	AGCGAAC	

586	0,032	AGGAGAG
495	0,030	AGAGACG
502	0,030	AGGCCCG
477	0,027	AGGAAGT
635	0,027	AGGAGCG
616	0,026	AGCCAAG
492	0,026	AGCAGAG
441	0,025	AGATAGC
481	0,024	AGTGGTG
591	0,022	AGACAAA
656	0,020	AGGCGCA
638	0,019	AGCGTTG
589	0,018	AGAGACA
348	0,018	AGATGGT
651	0,017	AGAAGAG
318	0,017	AGGAGTT
207	0,017	AGACGTT
630	0,016	AGAAAAG
654	0,016	AGAGGCG
321	0,015	AGTTGCC
454	0,015	AGCCGCC
445	0,015	AGCTGAA
739	0,008	AGGAAGT
243	0,008	AGATGAC
737	0,007	AGAGGAA
743	0,006	AGTGCTT

Sitios de posibles aceptores de *splicing* de la región intergénica 3'. Se señala en rojo los sitios más probables aceptores de *splicing* con su respectiva posición.

Programa	Posición sitio aceptor de <i>splicing</i>	Puntaje	Región de <i>splicing</i>
NetGene2 - 2.42	182	0,770	AGAACAT
	305	0,380	AGGAACA
BDGP	182	0,97	AGAACAT
	136	0,76	AGAGTGC
	305	0,63	AGGAACA
SpliceRover	305	0,684	AGGAACA
	393	0,024	AGTGAAC
	316	0,017	AGTTACA

	383	0,007	AGTCTCT
	273	0,006	AGCACTG
	417	0,005	AGAGACT
	259	0,003	AGTGCGC
	333	0,003	AGACAGG
	238	0,003	AGTCACG
	419	0,002	AGACTCA
	337	0,001	AGGACTC
	226	0,001	AGTGATG
	250	0,001	AGCGAAT

E. Anexo E

Regiones UTR 5' y 3' posibles mediante el análisis de aceptores de *splicing*

>5UTR_LbNMNAT_splicing

```
ACACTCCAAGATAGCTGAACCAGCCGCCACGCTGTGCCTGCGCGAGGAAGTGGTG  
GACAAGCAGAGACGAGGCCCGGATTAGACCCGCCGCTGCAACCTCGTTCAATCTCG  
TACAACCCAGGCTGCCACTGCGCCTCCCCCCCCCCCCCTCGAGGAGAGACAAAAT  
CAAACAACTAACACGAGCCAAGACAGGGAAGAAAAGGAGCGTTGACTACAAGAAG  
AGGCGCACGCTCTGCACCTTACGCAGCGAACGATCATTCTCAGGCGCAGACTGCCT  
CTCGCCGTCTCCGCTAGACCAAACGAGAGGAAGTGCTTCCCTGCGTATGTCGTGAG  
TTGTAGTCGCTGTGCGTGTGCGTCTGTTTGGCAAGGCCAGTGTGTCTGCTGCTCTC  
GATGTGGTCTGCTCCATCGGCCAGCTGGTGGGAGAGAAGAAAGCGAGAGTGTGC  
GGGGCGACGTCCCCGTCACTGACGCCAACGACTGAGAAGAAAAGCCAAAGCAAAG  
ACGTGGTGGGGAGCCAAAA
```

>3UTR_LbNMNAT_splicing

```
CAGGGCACGCAGTAGGCAGATGAAGGCGAGGCCGCGAGCAGTAGAGTGAGGAGG  
CAGCCGTGCTGCAGTCGTCACGAGAGCACAGTGCGGCTCCCGTGGGCGTACCCCC  
CTTTCATCCTCCGTTCACTTTTGATCTAGAGTGCTGAACATGGGTGTGCCTAGTTCTT  
GTATTGCTTCTTGCAGAACATATCATGTGACACGGGTGACACGGTACAATGCACAA  
TGAGTGATGCACACAGTCACGCTGCCAGCGAATCAAGTGCGCCCTCTCCAGCACTG  
TTTCCTGTTTCTCTCTTTAATTTCA
```


F. Anexo F

Lista de posibles proteínas de unión a las UTRs

Lista de proteínas identificadas por RBPmap que posiblemente se unen a la UTR 5'. El indicador Dm es para *D. melanogaster* y el Hs/Mm para *H. sapiens/M. musculus*:

Proteína	Organismo
ARET	Dm
B52	Dm
BRU-3	Dm
CG11360	Dm
CG17838	Dm
CG2931	Dm
CG2950	Dm
CG33714	Dm
CG7804	Dm
CNOT4	Dm
CPO	Dm
EIF-2ALPHA	Dm
FMR1	Dm
HOW	Dm
LARK	Dm
MOD	Dm
MSI	Dm
ORB2	Dm
PABP	Dm
PAPI	Dm
QKR58E-1	Dm
RBP1	Dm
REF2	Dm
RNP4F	Dm
RSF1	Dm
SF1	Dm
SF2	Dm
SM	Dm
SRP54	Dm
TRA2	Dm
ANKHD1	Hs/Mm

BOLL	Hs/Mm
BRUNOL4	Hs/Mm
BRUNOL5	Hs/Mm
BRUNOL6	Hs/Mm
CELF1	Hs/Mm
CNOT4	Hs/Mm
DAZ3	Hs/Mm
EIF4G2	Hs/Mm
ENOX1	Hs/Mm
ESRP2	Hs/Mm
EWSR1	Hs/Mm
FMR1	Hs/Mm
FUBP1	Hs/Mm
FUS	Hs/Mm
FXR1	Hs/Mm
FXR2	Hs/Mm
HNRNPA1	Hs/Mm
HNRNPA2B1	Hs/Mm
HNRNPDL	Hs/Mm
HNRNPF	Hs/Mm
HNRNPH2	Hs/Mm
HNRNPK	Hs/Mm
HNRNPL	Hs/Mm
HNRNPU	Hs/Mm
HNRPLL	Hs/Mm
IGF2BP1	Hs/Mm
IGF2BP2	Hs/Mm
IGF2BP3	Hs/Mm
ILF2	Hs/Mm
KHDRBS1	Hs/Mm
KHDRBS2	Hs/Mm
KHDRBS3	Hs/Mm

KHSRP	Hs/Mm
LIN28A	Hs/Mm
MBNL1	Hs/Mm
MSI1	Hs/Mm
NUPL2	Hs/Mm
PABPC1	Hs/Mm
PABPC3	Hs/Mm
PABPC4	Hs/Mm
PABPC5	Hs/Mm
PABPN1	Hs/Mm
PABPN1L	Hs/Mm
PCBP1	Hs/Mm
PCBP2	Hs/Mm
PCBP4	Hs/Mm
PPRC1	Hs/Mm
PRR3	Hs/Mm
PTB3	Hs/Mm
PTBP3	Hs/Mm
PUF60	Hs/Mm
PUM1	Hs/Mm
QKI	Hs/Mm
RBFOX1	Hs/Mm
RBFOX2	Hs/Mm
RBFOX3	Hs/Mm
RBM23	Hs/Mm
RBM24	Hs/Mm
RBM25	Hs/Mm
RBM28	Hs/Mm
RBM3	Hs/Mm
RBM38	Hs/Mm
RBM4	Hs/Mm
RBM42	Hs/Mm

RBM45	Hs/Mm
RBM46	Hs/Mm
RBM47	Hs/Mm
RBM4B	Hs/Mm
RBM5	Hs/Mm
RBM6	Hs/Mm
RBM8A	Hs/Mm
SAMD4A	Hs/Mm
SART3	Hs/Mm
SFPQ	Hs/Mm
SNRNP70	Hs/Mm
SNRPA	Hs/Mm
SRSF1	Hs/Mm
SRSF10	Hs/Mm
SRSF11	Hs/Mm
SRSF2	Hs/Mm
SRSF5	Hs/Mm
SRSF7	Hs/Mm
SRSF8	Hs/Mm
SRSF9	Hs/Mm
TAF15	Hs/Mm
TARDBP	Hs/Mm
TRA2A	Hs/Mm
TUT1	Hs/Mm
YBX2	Hs/Mm
ZC3H10	Hs/Mm
ZNF638	Hs/Mm

Lista de proteínas identificadas por RBPmap que posiblemente se unen a la UTR del extremo 3'. El indicador Dm es para *D. melanogaster* y el Hs/Mm para *H. sapiens/M. musculus*

Proteína	Organismo
A2BP1	Dm
ARET	Dm
B52	Dm
BRU-3	Dm
CG11360	Dm
CG33714	Dm
CG5213	Dm
CG7804	Dm
CG7903	Dm
CNOT4	Dm
CPO	Dm
ELAV	Dm
FMR1	Dm
FNE	Dm
HRB87F	Dm
HRB98DE	Dm
LARK	Dm
MSI	Dm
PAPI	Dm
PUM	Dm
RBP9	Dm
RIN	Dm
RNP4F	Dm
ROX8	Dm
RSF1	Dm
SF2	Dm
SM	Dm
SNF	Dm
SNRNP70K	Dm
SRP54	Dm
SXL	Dm
U2AF50	Dm
BOLL	Hs/Mm
BRUNOL4	Hs/Mm
BRUNOL5	Hs/Mm
BRUNOL6	Hs/Mm
CELF1	Hs/Mm
CNOT4	Hs/Mm
CPEB1	Hs/Mm
CPEB2	Hs/Mm
CPEB4	Hs/Mm
DAZ3	Hs/Mm

DAZAP1	Hs/Mm
EIF4G2	Hs/Mm
ELAVL4	Hs/Mm
ENOX1	Hs/Mm
EWSR1	Hs/Mm
FMR1	Hs/Mm
FUBP1	Hs/Mm
FUBP3	Hs/Mm
FUS	Hs/Mm
FXR1	Hs/Mm
FXR2	Hs/Mm
HNRNPA0	Hs/Mm
HNRNPA1	Hs/Mm
HNRNPA2B1	Hs/Mm
HNRNPC	Hs/Mm
HNRNPCL1	Hs/Mm
HNRNPF	Hs/Mm
HNRNPH1	Hs/Mm
HNRNPH2	Hs/Mm
HNRNPK	Hs/Mm
HNRNPL	Hs/Mm
HNRNPU	Hs/Mm
HNRPLL	Hs/Mm
HuR	Hs/Mm
IGF2BP1	Hs/Mm
IGF2BP2	Hs/Mm
IGF2BP3	Hs/Mm
ILF2	Hs/Mm
KHSRP	Hs/Mm
LIN28A	Hs/Mm
MATR3	Hs/Mm
MBNL1	Hs/Mm
MSI1	Hs/Mm
NOVA1	Hs/Mm
PCBP1	Hs/Mm
PCBP2	Hs/Mm
PCBP3	Hs/Mm
PCBP4	Hs/Mm
PRR3	Hs/Mm
PTB3	Hs/Mm
PTBP3	Hs/Mm
PUF60	Hs/Mm
PUM1	Hs/Mm

PUM2	Hs/Mm
RALY	Hs/Mm
RBM23	Hs/Mm
RBM24	Hs/Mm
RBM28	Hs/Mm
RBM3	Hs/Mm
RBM38	Hs/Mm
RBM4	Hs/Mm
RBM41	Hs/Mm
RBM45	Hs/Mm
RBM4B	Hs/Mm
RBM6	Hs/Mm
RBM8A	Hs/Mm
RBMS2	Hs/Mm
RBMS3	Hs/Mm
SFPQ	Hs/Mm
SNRNP70	Hs/Mm
SNRPA	Hs/Mm
SRSF1	Hs/Mm
SRSF10	Hs/Mm
SRSF11	Hs/Mm
SRSF2	Hs/Mm
SRSF4	Hs/Mm
SRSF5	Hs/Mm
SRSF8	Hs/Mm
SRSF9	Hs/Mm
TARDBP	Hs/Mm
TIA1	Hs/Mm
TRNAU1AP	Hs/Mm
U2AF2	Hs/Mm
UNK	Hs/Mm
YBX1	Hs/Mm
ZC3H10	Hs/Mm
ZC3H14	Hs/Mm
ZFP36	Hs/Mm
ZNF326	Hs/Mm
ZNF638	Hs/Mm

G. Anexo G

Secuencia codificante de α -Tubulina para *L. braziliensis*.

Se resalta en verde y amarillo el primer directo e inverso de la secuencia. Se espera un amplicón de 197 pares de bases:

>XM_001563114.3 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 alpha tubulin partial mRNA

ATGCGTGAGGCTATCTGCATTACATCGGCCAGGCCGGCTGCCAGGTCGGTAACGC
GTGCTGGGAGCTCTTCTGCCTTGAGCACGGCATCCAGCCCGACGGCTCCATGCCCT
CTGACAAGTGCATTGGTGTGAGGATGACGCGTTCAACACCTTCTTCTCGGAGACCG
GAGCTGGCAAGCACGTTCCCTCGCTCCCTCTTCTGGACCTCGAGCCCACGGTCGTG
GACGAGGTGCGCACTGGGACGTACCGCCAGCTGTTCAACCCCGAGCAGCTGGTGT
CTGGCAAGGAGGATGCGGCGAACAACACTACGCTCGTGGTCACTACACGATCGGCAAG
GAGATCGTGGACCTTGCGCTGGACCGCATTGCAAGCTGGCGGACAACACTGCACTGG
CCTTCAGGGCTTTATGGTGTTCACGCTGTCGGCGGCGGCACGGGCTCTGGCCTTG
GCGCGCTGCTGCTGGAGCGCCTGTCTGTGGACTACGGCAAGAAGTCCAAGCTTGG
CTACACCGTGTACCCGAGCCCGCAGGTGTCGACTGCTGTCGTGGAGCCGTACAAC
GCGTGCTGTCGACGCACTCGCTGCTCGAGCACACCGATGTTGCGACGATGCTGGAC
AACGAGGCCATTTACGATCTCACTCGTCGTTCCCTCGACATCGAGCGCCCGTCGTAC
ACGAACGTGAACCGCCTGATTGGCCAGGTGGTGTGTCGTCCTGACGGCGTCTCTGCG
CTTCGATGGTGCCTGACGTTGACCTGACGGAGTTCCAGACGAACCTTGTGCCGT
ACCCGCGCATCCACTTCGTGCTGACGAGCTACGCACCGGTGGTGTCTGCGGAGAAG
GCGTACCACGAGCAGCTGTCCGTTGCTGACATCACGAACCTCGGTCTTTGAGCCGGC
TGGCATGCTGACCAAGTGCATCCTCGCCACGGCAAGTACATGTCGTGCTGCCTCA
TGTACCGCGGCGATGTCGTGCCGAAGGATGTCAACGCC**GCGATTGCGACGATCAAG**
ACCAAGCGACCATCCAGTTTGTGGACTGGTGCCCGACTGGCTTCAAGTGCGGCAT
CAACTACCAGCCGCCGACCGTTGTGCCCGGCGGCGACCTGGCGAAGGTGCAGCGT
GCCGTGTGCATGATTGCGAACCTCGACCGCGATCGCTGAGGTGTTT**GCGCGGATCGA**
CCACAAGTTCGACCTGATGTACAGCAAGCGCGCGTTCGTGCACTGGTACGTTGGCG

AGGGCATGGAGGAGGGCGAGTTCTCCGAGGCGCGCGAGGATCTTGCTGCGCTGGA
GAAGGACTACGAGGAGGTTGGCGCCGAGTCCGCCGACGACGCGGGCGAGGAGGA
CGTCGAGGAGTACTAG

Bibliografía

- [1] World Health Organization, "leishmaniasis," *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed Oct. 10, 2022).
- [2] *Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis*. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud, 2019.
- [3] R. Tandon *et al.*, "Parasitology International Identification of protein biomarkers of attenuation and immunogenicity of centrin or p27 gene deleted live vaccine candidates of *Leishmania* against visceral leishmaniasis," *Parasitol. Int.*, vol. 92, no. December 2021, p. 102661, 2023, doi: 10.1016/j.parint.2022.102661.
- [4] A. Ponte-Sucre and M. Padrón-Nieves, *Drug resistance in Leishmania parasites: Consequences, molecular mechanisms and possible treatments*. 2018.
- [5] J. Medina, L. C. Saavedra, L. H. Patiño, M. Muñoz, and J. D. Ramírez, "Comparative analysis of the transcriptional responses of five *Leishmania* species to trivalent antimony," *Parasit. Vectors*, 2021, doi: 10.1186/s13071-021-04915-y.
- [6] *Directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas.*, Segunda ed. Organización Panamericana de la Salud, 2022.
- [7] D. Álvarez, P. Zambrano, M. Ayala, E. Parra, J. Padilla, and J. Escobar, "guía para la atención clínica integral del paciente con leishmaniasis," *Inst. Nac. salud. Bogotá*, 2010.
- [8] J. S. de Toledo, E. J. R. Vasconcelos, T. R. Ferreira, and A. K. Cruz, "Using genomic information to understand *Leishmania* biology," *Open Parasitol. J.*, vol. 4, no. SPEC. ISS.1, pp. 156–166, 2010, doi: 10.2174/1874421401004010156.
- [9] R. Lin and J. Yu, "The role of NAD + metabolism in macrophages in age-related macular degeneration," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 209, no. November 2022, p. 111755, 2023, doi: 10.1016/j.mad.2022.111755.
- [10] E. Katsyuba, M. Romani, D. Hofer, and J. Auwerx, "NAD+ homeostasis in health and disease," *Nat. Metab.*, vol. 2, no. 1, pp. 9–31, 2020, doi: 10.1038/s42255-019-0161-5.

- [11] C. Fortunato, "The key role of the NAD biosynthetic enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in regulating cell functions," no. October 2021, pp. 562–572, 2022, doi: 10.1002/iub.2584.
- [12] L. Sorci *et al.*, "Targeting NAD Biosynthesis in Bacterial Pathogens: Structure-Based Development of Inhibitors of Nicotinate Mononucleotide Adenylyltransferase NadD," *Chem. Biol.*, vol. 16, no. 8, pp. 849–861, 2009, doi: 10.1016/j.chembiol.2009.07.006.
- [13] H. Zhang, T. Zhou, O. Kurnasov, S. Cheek, N. V. Grishin, and A. Osterman, "Crystal structures of *E. coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD," *Structure*, vol. 10, no. 1, pp. 69–79, 2002, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00693-1.
- [14] X. Zhang, O. V. Kurnasov, S. Karthikeyan, N. V. Grishin, A. L. Osterman, and H. Zhang, "Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 15, pp. 13503–13511, 2003, doi: 10.1074/jbc.M300073200.
- [15] WHO, "Leishmaniasis: status of endemicity of cutaneous leishmaniasis," 2021. https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html (accessed Jan. 05, 2023).
- [16] Organización Panamericana de la Salud, "Informe epidemiológico de las Américas. Núm. 11," 2022.
- [17] Instituto Nacional de Salud, "Boletín epidemiológico semana 51," 2022. [Online]. Available: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Boletin_epidemiologico_semana_51.pdf.
- [18] Ministerio de Salud y Protección social Colombia, "Ejecución presupuestal," *Ejecución mensual*, 2022. <https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/RCuentas/Paginas/presupuesto.aspx> (accessed Jan. 05, 2023).
- [19] J. M. Bezemer, B. P. Freire-Paspuel, H. D. F. H. Schallig, H. J. C. de Vries, and M. Calvopiña, "Leishmania species and clinical characteristics of Pacific and Amazon cutaneous leishmaniasis in Ecuador and determinants of health-seeking delay: a cross-sectional study," *BMC Infect. Dis.*, vol. 23, no. 1, p. 395, 2023, doi: 10.1186/s12879-023-08377-8.
- [20] L. A. Delgado-Noguera *et al.*, "Diversity and geographical distribution of

- Leishmania species and the emergence of Leishmania (Leishmania) infantum and L. (Viannia) panamensis in Central-Western Venezuela,” *Acta Trop.*, vol. 242, p. 106901, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106901>.
- [21] A. Sandoval-Juárez, G. Minaya-Gómez, N. Rojas-Palomino, and O. Cáceres, “Identificación de especies de Leishmania en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú,” *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, vol. 37, no. 1, pp. 87–92, 2020, doi: [10.17843/rpmesp.2020.371.4514](https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4514).
- [22] R. Oddone *et al.*, “Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of Leishmania (Viannia) species,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 9, pp. 2818–2825, 2009, doi: [10.1128/JCM.00645-09](https://doi.org/10.1128/JCM.00645-09).
- [23] S. Jagadesh *et al.*, “Spatial variations in Leishmaniasis: A biogeographic approach to mapping the distribution of Leishmania species,” *One Heal.*, vol. 13, 2021, doi: [10.1016/j.onehlt.2021.100307](https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100307).
- [24] J. D. Marco *et al.*, “Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of Leishmania genus: Describing parasite diversity in Argentina,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 30, pp. 308–317, 2015, doi: [10.1016/j.meegid.2014.12.031](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.031).
- [25] J. Salgado-Almario, C. A. Hernández, and C. Ovalle-Bracho, “Geographical distribution of Leishmania species in Colombia, 1985-2017,” *Biomedica*, vol. 39, no. 2, pp. 278–290, 2019, doi: [10.7705/biomedica.v39i3.4312](https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312).
- [26] C. A. Correa-Cárdenas *et al.*, “Distribution, treatment outcome and genetic diversity of Leishmania species in military personnel from Colombia with cutaneous leishmaniasis,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: [10.1186/s12879-020-05529-y](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05529-y).
- [27] H. J. Venial *et al.*, “Investigation of Leishmania (Viannia) braziliensis Infection in Wild Mammals in Brazil,” *Acta Parasitol.*, vol. 67, no. 2, pp. 648–657, 2022, doi: [10.1007/s11686-021-00498-x](https://doi.org/10.1007/s11686-021-00498-x).
- [28] J. F. Marinho-Júnior *et al.*, “High levels of infectiousness of asymptomatic Leishmania (Viannia) braziliensis infections in wild rodents highlights their importance in the epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Brazil,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–23, 2023, doi: [10.1371/journal.pntd.0010996](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010996).
- [29] J. Lago *et al.*, “Efficacy of intralesional meglumine antimoniate in the treatment of canine tegumentary leishmaniasis: A Randomized controlled trial,” *PLoS Negl.*

- Trop. Dis.*, vol. 17, no. 2, pp. 1–10, 2023, doi: 10.1371/journal.pntd.0011064.
- [30] M. J. McConville and T. Naderer, “Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 65, pp. 543–561, 2011, doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102913.
- [31] J. M. Andrade and S. M. F. Murta, “Functional analysis of cytosolic trypanothione peroxidase in antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines,” *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1186/1756-3305-7-406.
- [32] L. Rivas and C. Gil, Eds., *Drug Discovery for Leishmaniasis*. The Royal Society of Chemistry, 2018.
- [33] M. F. Laranjeira-Silva, I. Hamza, and J. M. Pérez-Victoria, “Iron and Heme Metabolism at the *Leishmania*–Host Interface,” *Trends Parasitol.*, vol. 36, no. 3, pp. 279–289, 2020, doi: 10.1016/j.pt.2019.12.010.
- [34] “DNDi,” *Visceral leishmaniasis DNDI-0690*, 2021. <https://dndi.org/research-development/portfolio/dndi-0690/> (accessed Dec. 27, 2021).
- [35] L. Sellés Vidal, C. L. Kelly, P. M. Mordaka, and J. T. Heap, “Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1866, no. 2, pp. 327–347, 2018, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.11.005.
- [36] F. J. Martínez-Morcillo *et al.*, “Non-canonical roles of NAMPT and PARP in inflammation,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 115, no. October 2020, 2021, doi: 10.1016/j.dci.2020.103881.
- [37] C. Nelson, *Lehninger’s principles of biochemistry*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [38] S. Amjad *et al.*, “Role of NAD⁺ in regulating cellular and metabolic signaling pathways,” *Mol. Metab.*, vol. 49, no. February, p. 101195, 2021, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101195.
- [39] L. E. Contreras, “Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT),” Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Ciencias Departamento de Química, 2016.
- [40] R. Petrelli, K. Felczak, and L. Cappellacci, “NMN / NaMN Adenylyltransferase (NMNAT) and NAD Kinase (NADK) Inhibitors : Chemistry and Potential Therapeutic Applications,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 13, pp. 1973–1992,

- 2011.
- [41] C. Dölle, R. Skoge, M. VanLinden, and M. Ziegler, "NAD Biosynthesis in Humans - Enzymes, Metabolites and Therapeutic Aspects," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 13, no. 23, pp. 2907–2917, 2015, doi: 10.2174/15680266113136660206.
- [42] C. Lau, M. Niere, and M. Ziegler, "The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family," *Front. Biosci.*, vol. 14, no. 2, pp. 410–431, 2009, doi: 10.2741/3252.
- [43] I. D'Angelo, N. Raffaelli, V. Dabusti, T. Lorenzi, G. Magni, and M. Rizzi, "Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD(+) biosynthesis," *Structure*, vol. 8, no. 9, pp. 993–1004, Sep. 2000, doi: 10.1016/s0969-2126(00)00190-8.
- [44] M. Di Stefano, L. Galassi, and G. Magni, "Unique expression pattern of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isozymes in red blood cells," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 45, no. 1, pp. 33–39, 2010, doi: 10.1016/j.bcmd.2010.04.003.
- [45] L. E. Contreras, M. Ziegler, and M. H. Ramírez Hernández, "Kinetic and oligomeric study of *Leishmania braziliensis* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase," *Heliyon*, vol. 6, no. 4, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03733.
- [46] L. Sorci *et al.*, "Initial-rate kinetics of human NMN-adenylyltransferases: Substrate and metal ion specificity, inhibition by products and multisubstrate analogues, and isozyme contributions to NAD⁺ biosynthesis," *Biochemistry*, vol. 46, no. 16, pp. 4912–4922, 2007, doi: 10.1021/bi6023379.
- [47] L. E. Contreras, R. Neme, and M. H. Ramírez, "Identification and functional evaluation of *Leishmania braziliensis* Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase," *Protein Expr. Purif.*, vol. 115, pp. 26–33, 2015, doi: 10.1016/j.pep.2015.08.022.
- [48] W. Dahmen, B. Webb, and J. Preiss, "The deamido-diphosphopyridine nucleotide and diphosphopyridine nucleotide pyrophosphorylases of *Escherichia coli* and yeast," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 120, no. 2, pp. 440–450, 1967, doi: 10.1016/0003-9861(67)90262-7.
- [49] G. Magni, N. Raffaelli, M. Emanuelli, A. Amici, P. Natalini, and S. Ruggieri, "Nicotinamide-monomonucleotide adenylyltransferases from yeast and other microorganisms," *Methods Enzymol.*, vol. 280, no. 1995, pp. 248–255, 1997, doi:

- 10.1016/S0076-6879(97)80116-4.
- [50] L. J. Ortiz Joya, "Caracterización de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT) mediante análisis estructural y de interacción proteína-proteína," *Repos. Inst. Bibl. Digit.*, vol. 1, pp. 1–101, 2018, [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/64043>.
- [51] R. G. Zhai, M. Rizzi, and S. Garavaglia, "Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 17, pp. 2805–2818, 2009, doi: 10.1007/s00018-009-0047-x.
- [52] F. Berger, C. Lau, M. Dahlmann, and M. Ziegler, "Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 36334–36341, 2005, doi: 10.1074/jbc.M508660200.
- [53] F. J. Olivas-aguirre, A. Wall-medrano, G. A. González-aguilar, J. A. López-díaz, E. Álvarez-parrilla, and L. A. De, "Taninos hidrolizables ; bioquímica , aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud," vol. 31, no. 1, pp. 55–66, 2015, doi: 10.3305/nh.2015.31.1.7699.
- [54] E. Werner, M. Ziegler, F. Lerner, M. Schweiger, and U. Heinemann, "Crystal structure of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in complex with NMN," *FEBS Letters*, vol. 516, no. 1–3, pp. 239–244, 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02556-5.
- [55] D. S. Goodsell and A. J. Olson, "Structural symmetry and protein function," vol. 29, no. 1, pp. 105–153, 2000.
- [56] R. H. Garrett and C. M. Grisham, *Biochemistry*, 4th ed. Belmont: Cengage Learning, 2010.
- [57] B. Zarzycka, M. A. Kuenemann, M. A. Miteva, G. A. F. Nicolaes, G. Vriend, and O. Sperandio, "Stabilization of protein-protein interaction complexes through small molecules," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 1, pp. 48–57, 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2015.09.011.
- [58] A. D. Cirilo, C. M. Llombart, and J. J. Tamargo, *Introducción a la química terapéutica*, Segunda ed. Ediciones Díaz de Santos, 2003.
- [59] V. C. Sershon, B. D. Santarsiero, and A. D. Mesecar, "Kinetic and X-Ray Structural Evidence for Negative Cooperativity in Substrate Binding to Nicotinate

- Mononucleotide Adenylyltransferase (NMAT) from *Bacillus anthracis*,” *J. Mol. Biol.*, vol. 385, no. 3, pp. 867–888, 2009, doi: 10.1016/j.jmb.2008.10.037.
- [60] B. Alberts *et al.*, *Molecular biology of the cell*, Sixth Edit. New York: Garland Science, 2015.
- [61] S. Martínez-Calvillo, J. C. Vizuet-De-Rueda, L. E. Florencio-Martínez, R. G. Manning-Cela, and E. E. Figueroa-Angulo, “Gene expression in trypanosomatid parasites,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/525241.
- [62] E. R. Marvez, C. A. Ramírez, J. C. Casas, M. I. Ospina, J. M. Requena, and C. J. Puerta, “Characterization of the mRNA untranslated regions [UTR] of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 isoforms derived by alternative trans-splicing,” *Univ. Sci.*, vol. 23, no. 2, pp. 267–290, 2018, doi: 10.11144/Javeriana.SC23-2.cotm.
- [63] K. Benabdellah, E. González-Rey, and A. González, “Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein,” *Mol. Microbiol.*, vol. 65, no. 6, pp. 1559–1567, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05892.x.
- [64] J. N. Agudelo Chivatá, “Leishmaniasis Cutánea, Mucosa Y Visceral, Colombia 2019,” Colombia, 2019. [Online]. Available: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS_2019.pdf.
- [65] N. Bodhale *et al.*, “Cytokines and metabolic regulation: A framework of bidirectional influences affecting *Leishmania* infection,” *Cytokine*, no. August, p. 155267, 2020, doi: 10.1016/j.cyto.2020.155267.
- [66] C. Villalobos-González, “El NAD⁺ en parásitos extracelulares: Procesos biosintéticos y de transporte.”, 2021.
- [67] Y. Tomioka *et al.*, “Ladder observation of bovine serum albumin by high resolution agarose native gel electrophoresis,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 215, no. March, pp. 512–520, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.118.
- [68] M. Aslett *et al.*, “TriTrypDB : a functional genomic resource for the Trypanosomatidae,” vol. 38, no. October 2009, pp. 457–462, 2010, doi: 10.1093/nar/gkp851.
- [69] J. Zuallaert, F. Godin, M. Kim, A. Soete, Y. Saeys, and W. De Neve, “SpliceRover: interpretable convolutional neural networks for improved splice site prediction,” *Bioinformatics*, vol. 34, no. 24, pp. 4180–4188, 2018.
- [70] M. G. Reese, F. H. Eeckman, D. Kulp, and D. Haussler, “Improved splice site

- detection in Genie,” *J. Comput. Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 311–323, 1997.
- [71] S. Brunak, J. Engelbrecht, and S. Knudsen, “Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence,” *J. Mol. Biol.*, vol. 220, no. 1, pp. 49–65, 1991.
- [72] I. Paz, I. Kosti, M. Ares, M. Cline, and Y. Mandel-Gutfreund, “RBPmap: A web server for mapping binding sites of RNA-binding proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. W1, pp. 361–367, 2014, doi: 10.1093/nar/gku406.
- [73] B. Amos *et al.*, “VEuPathDB : the eukaryotic pathogen , vector and host bioinformatics resource center,” vol. 50, no. October 2021, pp. 898–911, 2022.
- [74] Thermo Scientific, “DyNAmo cDNA Synthesis Kit #F-470L,” *DyNAmo cDNA Synthesis Kit #F-470L*, 2014. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0013405_DyNAmo_cDNA_Syn_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogRHIOQW1vIGNETkEgU3ludGhlc2lzIEtpdA==.
- [75] Promega, “RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101),” pp. 9–10, 2018, [Online]. Available: https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-biology-enzymes-and-reagents/rq1-rnase_free-dnase/?catNum=M6101.
- [76] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch, “Protein identification and analysis tools on the ExpASy server,” *proteomics Protoc. Handb.*, pp. 571–607, 2005.
- [77] amersham pharmacia biotech, *Gel filtration principle and methods*, 8th ed. .
- [78] P. D. C. Ruy *et al.*, “Comparative transcriptomics in *Leishmania braziliensis* : disclosing differential gene expression of coding and putative noncoding RNAs across developmental stages,” *RNA Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 639–660, 2019, doi: 10.1080/15476286.2019.1574161.
- [79] B. Alberts *et al.*, *Molecular biology of the cell*, 8th editio. New York: Garland Science, 2015.
- [80] C. Clayton, “Regulation of gene expression in trypanosomatids : living with polycistronic transcription,” 2019.
- [81] Q. Liu *et al.*, “DeepGenGrep: a general deep learning-based predictor for multiple genomic signals and regions,” *Bioinformatics*, vol. 38, no. July, pp. 4053–4061,

- 2022, doi: 10.1093/bioinformatics/btac454.
- [82] A. Waithaka, O. Maiakovska, D. Grimm, L. Melo, and C. C. Id, *Sequences and proteins that influence mRNA processing in Trypanosoma brucei: Evolutionary conservation of SR-domain and PTB protein functions*. 2022.
- [83] G. Elena, G. Claudia, G. Ceballos-p, S. M. Fern, and A. M. Est, "The RNA-binding protein RBP33 dampens non-productive transcription in trypanosomes," vol. 50, no. 21, pp. 12251–12265, 2022.
- [84] M. H. Licon, F. Goodstein, D. Ortiz, S. M. Landfear, and P. A. Yates, "Distinct cis - acting elements govern purine-responsive regulation of the Leishmania donovani nucleoside transporters , LdNT1 and LdNT2," 2020.
- [85] A. Rastrojo, L. Corvo, R. Lombraña, J. C. Solana, B. Aguado, and J. M. Requena, "Analysis by RNA-seq of transcriptomic changes elicited by heat shock in Leishmania major," no. July 2018, pp. 1–18, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43354-9.
- [86] T. U. Consortium, "UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023," *Nucleic Acids Res.*, vol. 51, no. D1, pp. D523–D531, 2023, doi: 10.1093/nar/gkac1052.
- [87] D. Of, N. Acids, and U. Absorption, "Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy," no. 1994, pp. 1–8, 2000.
- [88] J. M. Kelly, "Isolation of DNA and RNA from Leishmania BT - Protocols in Molecular Parasitology," J. E. Hyde, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1993, pp. 123–131.
- [89] C. A. Ramírez, J. M. Requena, and C. J. Puerta, "Alpha tubulin genes from Leishmania braziliensis: genomic organization, gene structure and insights on their expression," *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 454, 2013, doi: 10.1186/1471-2164-14-454.
- [90] M. Mohebbi *et al.*, "Gene expression analysis of antimony resistance in Leishmania tropica using quantitative real-time PCR focused on genes involved in trypanothione metabolism and drug transport," *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 311, no. 1, pp. 9–17, 2019, doi: 10.1007/s00403-018-1872-2.
- [91] L. Pérez-díaz, T. Caroline, and S. M. R. Teixeira, "Molecular & Biochemical Parasitology Involvement of an RNA binding protein containing Alba domain in the stage-specific regulation of beta-amastin expression in Trypanosoma cruzi," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 211, pp. 1–8, 2017, doi:

- 10.1016/j.molbiopara.2016.12.005.
- [92] Y. Wei, H. Xiang, and W. Zhang, "Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer," *Front. Pharmacol.*, vol. 13, no. September, pp. 1–23, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.970553.
- [93] A. Poniewierska-Baran, P. Warias, and K. Zgutka, "Sirtuins (SIRT6) As a Novel Target in Gastric Cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 23, 2022, doi: 10.3390/ijms232315119.
- [94] S. Chubanava and J. T. Treebak, "Regular exercise effectively protects against the aging-associated decline in skeletal muscle NAD content," *Exp. Gerontol.*, p. 112109, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112109>.
- [95] M. Abdellatif *et al.*, "Nicotinamide for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction," *Sci. Transl. Med.*, vol. 13, no. 580, p. eabd7064, Feb. 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abd7064.
- [96] T. Helman and N. Braidy, "Importance of NAD⁺ Anabolism in Metabolic, Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders," *Drugs and Aging*, vol. 40, no. 1, pp. 33–48, 2022, doi: 10.1007/s40266-022-00989-0.
- [97] T. G. A. Mack *et al.*, "Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene," *Nat. Neurosci.*, vol. 4, no. 12, pp. 1199–1206, 2001, doi: 10.1038/nn770.
- [98] H. N. Jayaram, P. Kusumanchi, and J. A. Yalowitz, "Nmnat expression and its relation to nad metabolism," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 13, pp. 1962–1972, May 2011, doi: 10.2174/0929867111795590138.
- [99] C. Fortunato, F. Mazzola, and N. Raffaelli, "The key role of the NAD biosynthetic enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in regulating cell functions," *IUBMB Life*, vol. 74, no. 7, pp. 562–572, 2022, doi: 10.1002/iub.2584.
- [100] D. A. Korasick, T. A. White, S. Chakravarthy, and J. J. Tanner, "NAD⁺ promotes assembly of the active tetramer of aldehyde dehydrogenase 7A1," *FEBS Lett.*, vol. 592, no. 19, pp. 3229–3238, 2018, doi: 10.1002/1873-3468.13238.
- [101] S. Fekete, A. Beck, J. L. Veuthey, and D. Guillaume, "Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 101, pp. 161–173, 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.011.
- [102] A. Goyon, S. Fekete, A. Beck, J. L. Veuthey, and D. Guillaume, "Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident

- characterization of therapeutic proteins,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1092, no. June, pp. 368–378, 2018, doi: 10.1016/j.jchromb.2018.06.029.
- [103] H. J. Yoon, L. K. Hye, B. Mikami, and W. S. Se, “Crystal structure of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa* in its apo and substrate-complexed forms reveals a fully open conformation,” *J. Mol. Biol.*, vol. 351, no. 2, pp. 258–265, 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.001.
- [104] A. Waterhouse *et al.*, “SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, Jul. 2018, doi: 10.1093/NAR/GKY427.
- [105] P. Natalini, I. Biochimica, F. Medicinae, B. Mca, U. Ancona, and C. Mc, “NAD Biosynthesis in Human Placenta : Purification and Characterization of Homogeneous NMN Adenylyltransferase ’,” vol. 298, no. 1, pp. 29–34, 1992.
- [106] M. Haley Licon and P. A. Yates, “Purine-responsive expression of the leishmania donovani nt3 purine nucleobase transporter is mediated by a conserved RNA stem-loop,” *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 25, pp. 8449–8459, 2020, doi: 10.1074/jbc.ra120.012696.
- [107] H. H. Wippel *et al.*, “Unveiling the partners of the DRBD2-mRNP complex , an RBP in *Trypanosoma cruzi* and ortholog to the yeast SR-protein Gbp2,” pp. 1–12, 2019.
- [108] S. M. Ferna and A. M. Este, “Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*,” vol. 7, no. 11, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0048870.
- [109] S. Go, T. T. Kramer, A. J. Verhoeven, R. P. J. O. Elferink, and J. C. Chang, “The extracellular lactate - to - pyruvate ratio modulates the sensitivity to oxidative stress - induced apoptosis via the cytosolic NADH / NAD + redox state,” *Apoptosis*, vol. 26, no. 1, pp. 38–51, 2021, doi: 10.1007/s10495-020-01648-8.
- [110] C. J. Jeffery, “An introduction to protein moonlighting.,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 6, pp. 1679–1683, Dec. 2014, doi: 10.1042/BST20140226.
- [111] B. Sharmistha, N. A. Kumar, R. Podili, A. Niyaz, and H. S. E., “Iron-Dependent RNA-Binding Activity of *Mycobacterium tuberculosis* Aconitase,” *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 11, pp. 4046–4052, Jun. 2007, doi: 10.1128/JB.00026-07.
- [112] J. Ziveri *et al.*, “The metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase acts as

- a transcriptional regulator in pathogenic *Francisella*,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 853, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00889-7.
- [113] P. Das, A. Mukherjee, and S. Adak, “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase present in extracellular vesicles from *Leishmania major* suppresses host TNF-alpha expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 297, no. 4, p. 101198, 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101198.
- [114] C. Griffoni *et al.*, “The Rossmann fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a nuclear docking site for antisense oligonucleotides containing a TAAAT motif,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1530, no. 1, pp. 32–46, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00166-9](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00166-9).
- [115] E. Sei and N. K. Conrad, “Chapter Four - UV Cross-Linking of Interacting RNA and Protein in Cultured Cells,” in *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part B*, vol. 539, J. B. T.-M. in E. Lorsch, Ed. Academic Press, 2014, pp. 53–66.
- [116] C. A. Ramírez, J. M. Requena, and C. J. Puerta, “Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus : genomic organization and UTRs characterization,” pp. 1–11, 2011.
- [117] D. Clark, N. Pazdernik, and M. McGehee, *Molecular biology*, 3th ed. Elsevier, 2019.