

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



“IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE QUIESCENCIA EN UN MODELO *IN VITRO* EN *LEISHMANIA MEXICANA*”

AUTORES

Bach. Maria de los Angeles Sernaqué Palomino

Bach. Marco Alexander Tapia Zúniga

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biología

ASESOR

Dr. Jorge Arévalo Zelada

Lima – Perú

2021

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	6
LEISHMANIASIS	6
PERSISTENCIA DE <i>LEISHMANIA</i> COMO UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA	7
QUIESCENCIA EN <i>LEISHMANIA</i>	8
MODELOS DE ESTUDIO DEL AMASTIGOTE	9
MARCADORES DE QUIESCENCIA EN <i>LEISHMANIA</i>	11
<i>Marcadores de quiescencia a nivel de RNA mensajero</i>	11
<i>Marcadores a nivel de proteínas</i>	13
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE PROMASTIGOTES Y AMASTIGOTES AXÉNICOS DE <i>LEISHMANIA</i>	16
INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES	16
CONDICIONES DE CULTIVO DE AMASTIGOTES PARA EL DESARROLLO DE UN MODELO DE QUIESCENCIA	18
REVERSIBILIDAD DEL MODELO DE QUIESCENCIA	19
MONITOREO DE GFP POR CITOMETRÍA DE FLUJO	19
GRUPOS EVALUADOS	19
EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL	20
SÍNTESIS DE DNAC	20
DISEÑO DE PRIMERS Y PCR EN TIEMPO REAL	20
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	21
PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN RIBOSOMAL	22
CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL GELES BIDIMENSIONALES	22
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	23
ASIGNACIÓN DE IDENTIDAD DE MANCHAS DE GELES BIDIMENSIONALES	23
ANÁLISIS DE DATOS	24
RESULTADOS	25
1. DESARROLLO DE UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE QUIESCENCIA	25
1.1. Elección de medio de cultivo y porcentaje de SFB	25
1.1.1 Porcentaje de células GFP-.....	25
1.1.2 Viabilidad.....	26
1.1.3 Mediana de GFP.....	26
1.2 Determinación del inóculo inicial óptimo	28
1.3 Verificación del modelo de quiescencia	30
1.4 Adaptación de modelo a cultivos de mayor volumen	31
1.5 Reversibilidad del modelo de quiescencia	33
2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE QUIESCENCIA	35
2.1 Identificación de marcadores a nivel de mRNA	35
2.1.1 Cuantificación e integridad del RNA	35
2.1.2 Cuantificación relativa de mRNA.....	37
2.2 Identificación de marcadores a nivel de proteínas	40
2.2.1 Purificación de la fracción ribosomal	40
2.2.2 Cuantificación de proteínas totales y ribosomales	43

2.2.3 Análisis de la expresión diferencial de proteínas totales y de la fracción ribosomal mediante geles bidimensionales	44
2.2.4 Identificación de proteínas	48
DISCUSIÓN.....	53
1. DESARROLLO DE UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE QUIESCENCIA.....	53
2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES A NIVEL DE MRNA.....	54
3. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES A NIVEL DE PROTEÍNAS.....	57
3.1 <i>Proteínas totales</i>	57
3.2 <i>Proteínas ribosomales</i>	59
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS.....	73

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical causada por el parásito de *Leishmania*, este presenta dos estadios: promastigote y amastigote, siendo este último el causante de la enfermedad en el hospedero mamífero. En estudios previos se ha descrito en *Leishmania* un estado de quiescencia en el estadio de amastigote. La quiescencia es clínicamente relevante porque permite a los patógenos persistir en el hospedero y reactivar la enfermedad años después de la cura clínica. Por ello, es importante entender este estado en *Leishmania*. La identificación de marcadores genéticos permitirá entender el estado de quiescencia del parásito y a largo plazo plantear estrategias para el control de la enfermedad. Sin embargo, se reportó que existen poblaciones heterogéneas, compuestas por células quiescentes con nula replicación y otras semi-quiescentes con baja proliferación, lo cual representa un problema para estudiar quiescencia en *Leishmania*.

En este estudio se desarrolló un modelo *in vitro* en condiciones de hipoxia y con baja disponibilidad de nutrientes en el estadio amastigote de la especie *Leishmania mexicana* el cual permite obtener una población predominantemente quiescente. Este nuevo modelo permitió identificar marcadores de quiescencia en dos niveles: a nivel de transcritos mediante RT-qPCR donde se identificó a Ama8A, Ama34D y DRBD3 y a nivel de proteínas, mediante ensayos de electroforesis bidimensional se propone a las proteínas ribosomales RPL7/L12, RPL2 y RPS4.

Palabras clave: *Leishmania*, quiescencia, RT-qPCR, geles bidimensionales

ABSTRACT

Leishmaniasis is a tropical disease caused by the *Leishmania* parasite, it has two stages: promastigote and amastigote, the latter being the cause of the disease in the mammalian host. In *Leishmania*, a state of quiescence was recently described in the amastigote stage. Quiescence is clinically relevant because it allows pathogens to persist in the host and reactivate disease years after clinical cure. Therefore, it is important to understand this state in *Leishmania*. The identification of markers will allow a better understanding of the quiescence and, in the long term, propose strategies for the control of the disease. However, it was reported that there are heterogeneous populations, composed of quiescent cells with no replication and other semi-quiescent cells with low proliferation, which represents a problem to study quiescence in *Leishmania*.

In this study, an *in vitro* model was developed under hypoxic conditions and with low nutrient availability in the *Leishmania mexicana* species, which allows obtaining a predominantly quiescent population. This new model allowed the identification of quiescence markers at two levels: at the level of transcripts by means of RT-qPCR, Ama8A, Ama34D,, DRBD3 were identified and at the protein level, by means of two-dimensional electrophoresis assays, were proposed RPL12/L7, RPL2 and RPS4.

Keywords: *Leishmania*, quiescence, RT-qPCR, two-dimensional gels

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad tropical presente en 97 países, asociada con la desnutrición, poblaciones que viven en áreas tropicales, viviendas deficientes, sistema inmunológico débil y falta de recursos. A nivel mundial se estima que cada año se producen aproximadamente 1.5 a 2 millones de casos nuevos y 70 000 muertes (1). En el Perú, la leishmaniasis es la segunda enfermedad endémica más frecuente de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de malaria y tuberculosis (2). En el Perú, cada año se han reportado en promedio 6000 casos en los últimos cinco años de los cuales el 92% fueron casos de Leishmaniasis cutánea y el 8% de leishmaniasis mucocutánea (3).

La leishmaniasis es causada por el parásito intracelular de la familia *Trypanosomatidae* del género *Leishmania*. Esta enfermedad se transmite a los humanos por la picadura de un mosquito del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, el cual alberga en la probóscide una forma flagelada del parásito llamado promastigote. Una vez que los promastigotes se depositan por regurgitación en el tegumento del huésped ingresan a las células fagocíticas locales donde se transforman en una forma no flagelada redondeada llamada amastigote, que se reproduce por fisión binaria e invaden nuevas células (4).

En el humano, la infección por el amastigote de *Leishmania* causa diferentes formas clínicas según la especie y la relación parásito-hospedero, que incluyen leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. La leishmaniasis cutánea es la forma más común de leishmaniasis y se caracteriza principalmente por la presencia de úlceras redondeadas con bordes nodulares (lesiones cutáneas) en áreas del cuerpo expuestas a picaduras de mosquitos y puede curarse espontáneamente. La Leishmaniasis mucocutánea causa invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea. Las lesiones comienzan

generalmente en la mucosa nasal y se extienden a la mucosa oral y faríngea, la laringe, la piel de la nariz y los labios y en casos extremos puede causar la muerte. La leishmaniasis visceral se caracteriza por el agrandamiento del hígado y bazo, anemia, fiebre y pérdida de peso y en ausencia de tratamiento puede causar la muerte (1).

La *Leishmania mexicana*, perteneciente al subgénero *Leishmania*, es responsable de la forma clínica de leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Las lesiones LCL ocurren en áreas expuestas a la picadura del mosquito, cuando la oreja es afectada, la lesión resulta en mutilaciones en forma de hendidura. Este tipo de lesiones presentan úlceras que pueden sanar espontáneamente de 2 a 6 meses o incluso durar por 15 o 20 años (5). Los pacientes pueden recaer con formas más leves o agresivas, que conllevan a la reapertura de la lesión. La LCD se caracteriza por la ausencia de respuesta inmune frente a los antígenos del parásito, lo cual permite la diseminación de las lesiones por toda la piel, pudiendo afectar las membranas mucosas. Si se afectan las mucosas orofaríngeas y/o nasofaríngea, los nódulos pueden ocasionar un bloqueo de las vías respiratorias. Esta forma clínica no presenta resolución espontánea y es difícil de tratar (6).

Persistencia de *Leishmania* como un problema de salud pública

La persistencia es una característica exhibida por una subpoblación de organismos de permanecer viables por un largo tiempo en células específicas del hospedero y es caracterizado por un crecimiento lento junto con la capacidad de sobrevivir a algún tratamiento (7). Se ha demostrado la persistencia del parásito *Leishmania* después de la cura clínica (8). Por ejemplo, en individuos que tuvieron lesiones cutáneas, se detectó mediante técnicas sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) DNA específico de *Leishmania* en las cicatrices de las lesiones y en algunos casos los parásitos persistentes pueden producir la reactivación de la enfermedad e incluso desarrollar formas agravadas de la enfermedad (9). Por ejemplo, en *Leishmania braziliensis*, la infección primaria que causa leishmaniasis cutánea puede reactivarse y

desarrollarse como leishmaniasis mucocutánea, la cual presenta lesiones mutilantes a nivel de las mucosas (10).

La persistencia de *Leishmania* se ha convertido en un problema de salud global importante ya que pueden servir como reservorio de transmisión (11). Se calcula que existen alrededor de 120 millones de infecciones asintomáticas y se ha estimado que alrededor del 33% de los pacientes con leishmaniasis cutánea pueden recaer, o la lesión cicatricial puede reabrirse, presentando características similares o más graves a las del episodio original. (1)

Quiescencia en *Leishmania*

La quiescencia es un estado reversible de baja o nula proliferación y actividad metabólica reducida (12). Algunos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (13) y *Plasmodium vivax* (14), utilizan la quiescencia como un mecanismo de persistencia en el huésped. *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de reducir su estado metabólico, niveles de ATP y replicación entrando a un estado de quiescencia que es resistente a la defensa del hospedero, y diversos tipos de estrés (13). Por otro lado, *Plasmodium vivax*, parásito causante de la malaria presenta estadios quiescentes en su ciclo de vida, llamados hipnozoitos, que son conocidos por su asociación con recaídas en infecciones de malaria en humanos (14).

En tres estudios recientes se ha propuesto que los amastigotes de *Leishmania* entran en un estado quiescente, que podría en parte explicar la persistencia del parásito y reactivación de la Leishmaniasis. En el primer estudio, utilizando marcaje con agua pesada, se demostró que la tasa de replicación de amastigotes en lesiones murinas de la especie *L. mexicana* es lenta, y que la síntesis de RNA, lípidos de membrana y recambio proteico son bajas (15). En el segundo estudio, utilizando incorporación con bromodeoxiuridina, se demostró que un porcentaje de la población de amastigotes (39%) de la especie de *L. major* posee una tasa de replicación baja o nula (11). El tercer estudio demostró que, en los amastigotes de la especie de *L. braziliensis* existe una reducción de la replicación, ATP intracelular, proteínas ribosomales, RNA ribosomal y

una disminución en la síntesis aminoácidos (16). Por lo tanto, de las tres líneas de investigación queda claro que los amastigotes de *Leishmania* pueden mostrar bajas tasas de proliferación, un nivel bioenergético y metabolismo reducido.

La disminución del RNA ribosomal 18S es una característica de quiescencia encontrada en otros organismos (17, 18, 19) y reportado en el 2017 en *Leishmania* (16). Esta disminución está asociada con una baja en la tasa biosintética de la célula al ser un componente esencial para el funcionamiento del ribosoma. Por ello, para monitorear el estado de quiescencia en amastigotes, fue desarrollado un biosensor basado en la expresión de rRNA 18S. Este biosensor consiste en la inserción de un gen reportero, la proteína verde fluorescente (GFP), que se expresa por un promotor del RNA ribosomal GFP_r (GFP ribosomal). De esta forma la expresión de rRNA puede ser cuantificado, a nivel de individuo por citometría de flujo en la transición de promastigote a amastigote (20). Este biosensor fue validado en un estudio previo en diferentes estadios de *L. braziliensis* y *L. mexicana* para monitorear la capacidad de los parásitos de entrar a quiescencia al asociar la disminución de rRNA 18s con una baja en la tasa de replicación medida por la incorporación de BrdU (20).

En *Leishmania* se reportó la existencia una población heterogénea, donde coexisten amastigotes que se encuentran en un estado de semi-quiescentes, con baja tasa de replicación y otros quiescentes con replicación no detectable o nula (11,20). Esta heterogeneidad representa un problema para la caracterización molecular del estado quiescente, por lo que para estudiar este estado es necesario desarrollar un modelo en el cual toda la población o la mayoría sean quiescentes.

Modelos de estudio del amastigote

Para estudiar el amastigote es posible recuperar amastigotes intracelulares de macrófagos intraperitoneales de las células del hospedero. Sin embargo, para la búsqueda de marcadores moleculares este procedimiento es un reto debido a la relativa poca cantidad de amastigotes intracelulares que se pueden recuperar (21). Por

ello, se utilizan cultivos *in vitro* de amastigotes axénicos. Estos son cultivos en donde se induce la diferenciación de promastigote a amastigote al incrementar la temperatura y disminuir el pH en un medio imitando las condiciones dentro del macrófago del hospedero mamífero (22). Aunque actualmente es el modelo de diferenciación aceptado para el estudio del amastigote de *Leishmania*, se ha reportado comportamientos diferentes al amastigote intracelular. En el contexto de quiescencia, mediante citometría de flujo observaron que en *L. braziliensis* si bien los amastigotes axénicos presentan una disminución de la expresión de GFP ribosomal (GFPr) de ~6 veces menos respecto al promastigote estacionario, la expresión de GFPr en amastigotes intracelulares resulta en una disminución drástica de ~58 veces menos (20).

Aunque el amastigote axénico es una herramienta útil para estudiar el proceso de diferenciación de promastigote a amastigotes, existen muchos otros factores que influyen en el comportamiento del parásito dentro del macrófago, tales como la respuesta inmune del hospedero, cambios en la disponibilidad de nutrientes y en la disponibilidad de oxígeno, etc. La disponibilidad de nutrientes y oxígeno resultan de especial interés debido a su correlación con el estado de quiescencia. Por ejemplo, las levaduras entran en un estado quiescente por la limitación de nutrientes esenciales (12). Además, se ha establecido un modelo *in vitro* de quiescencia en fibroblastos dérmicos humanos neonatales mediante la privación de una fuente de nutrientes en el cultivo como el suero fetal bovino (23). Por otro lado, se ha descrito que existen factores inducibles por hipoxia que promueven un estado de quiescencia, por ejemplo, en *Mycobacterium tuberculosis* se ha descrito que el factor de transcripción DosR, promueve el arresto de crecimiento y sobrevivencia en un ambiente con bajo niveles de oxígeno (24). Por ello, en este estudio se plantea por primera vez, en nuestro conocimiento, el cultivo en condiciones de limitación de nutrientes e hipoxia el cual consideramos debe ser un modelo más aproximado para el estudio del amastigote

Marcadores de quiescencia en *Leishmania*

Un marcador molecular es un gen, transcrito o proteína, o un conjunto de estas moléculas que indica la presencia de una característica en una muestra. El único marcador de quiescencia que existe en *Leishmania* es el biosensor de GFP-18S rRNA, pero este es un marcador negativo debido a que está subexpresado en células quiescentes (20). Para una mejor caracterización del estado de quiescencia es importante identificar marcadores positivos, es decir, aquellos que se expresen preferentemente en células quiescentes y posteriormente desarrollar nuevos sistemas de biosensores.

La identificación de marcadores de quiescencia es un paso importante para entender esa condición en *Leishmania* y a largo plazo plantear estrategias para el control de la enfermedad. Estos estudios se deben realizar a nivel transcripcional y traduccional, debido a que *Leishmania* posee ciertas peculiaridades en la regulación de la expresión genética (25). Los genes que codifican proteínas se transcriben en policistrones de 10 a 100 genes, que luego son procesados por trans-splicing y poliadenilación para generar transcritos de mRNA maduros para la traducción (26). A diferencia de la mayoría de los organismos, donde algunos RNA mensajeros están sujetos a un control transcripcional mediado por factores de transcripción que controlan la expresión genética por su unión a promotores, en *Leishmania* el control de expresión es mínimo. Solo el 0.2% a 5% de los transcritos se expresan diferencialmente entre estadios dependiendo de la especie (27). Por ello, se postula que la regulación de la expresión genética debe ocurrir principalmente a nivel postranscripcional y traduccional.

Marcadores de quiescencia a nivel de RNA mensajero

Si bien la mayor parte de la regulación de la expresión genética ocurre principalmente a nivel postranscripcional, la identificación de RNA correspondiente a genes específicos de estadio es una primera aproximación para identificar marcadores de quiescencia. Esto se puede lograr utilizando técnicas como RT-qPCR, la cual permite la detección,

cuantificación rápida y de alto rendimiento de varios genes de interés en diferentes condiciones.

En la RT-qPCR es crucial considerar variaciones experimentales como la cantidad y calidad de material de partida, la forma de extracción de RNA y las eficiencias de transcripción reversa y PCR. Por ello, es esencial normalizar los resultados de expresión obtenidos con un control interno denominado gen de referencia (28, 29). Estos genes son aquellos que se requieren para el mantenimiento de las funciones celulares basales y se expresan de manera casi constante a lo largo del ciclo de vida del organismo (30, 31). En la base de datos de los Kinetoplástidos Tri TrypDB (32), el gen DRBD3, una proteína de unión a RNA, se expresa constitutivamente entre las etapas del ciclo de vida de *L. major* y tiene una variación de secuencia mínima entre las especies. Los experimentos de RNA-seq tanto en *L. major* como en *L. amazonensis* han demostrado poco o ningún cambio en la expresión de este gen entre los estadios (33). Otro gen expresado constitutivamente en todos los estadios en *L. major* es N-miristoiltransferasa (NMT), una proteína esencial que cataliza la unión del ácido graso miristato al residuo glicina amino terminal de un subconjunto de proteínas (34, 35). El mRNA que codifica una proteína hipotética conservada LmjF34.0770 (HP), también se identificó como expresada de forma constitutiva en *L. major* (36). En un estudio en *L. braziliensis* utilizando cepas susceptibles y resistentes al antimonio se identificaron 3 genes que se expresaron constitutivamente durante todo el ciclo de vida: As/Sb Reductasa (ACR2), Glutación sintetasa (GSH2) y Polinucleotido adeniltransferasa 14 (PAP14) (37).

Con el objetivo de identificar marcadores de quiescencia se realizó una búsqueda de genes candidatos. La disminución de mRNA y proteínas totales es una característica de quiescencia por lo que se buscaron genes involucrados en el control transcripcional y traduccional: Subunidad de RNA polimerasa I (trRPA31) (38), Factor de la iniciación de la transcripción de rRNA (trCITFA2) (39), factor de la iniciación de la traducción (eIF2Alpha) (40) y quinasa de eIF2Alpha (PERK) (41). Además, se exploraron genes que se expresan preferentemente en amastigotes y utilizados en el diagnóstico de

Leishmania porque esto podría sugerir que son genes importantes para el amastigote y por ende desempeñar un rol en el amastigote quiescente: Cisteína proteasa B (CPB2.8) (42), Quinesina RK39-1 y RK39-2 (43), Amastina AMA 34D (44) y AMA 8A (44).

Además, se buscaron genes relacionados con el transporte de hierro porque este es esencial para la síntesis de ATP y por ende para la producción de energía. Por ello, se espera que exista una disminución con los genes relacionados con hierro. Se encontraron 6 transportadores de hierro: Proteína reductasa férrica (LFR1) (45), transportador de hierro Fe⁺² (LIT1-4) (43-45), Transportador de Heme (LHR1) (45), transportador de porfirina (FLV) (46), Regulador de hierro Fe⁺² (LIR1) (47) y Mitoferrina (LMIT1) (47).

Debido a la disminución del RNA ribosomal observada en amastigotes quiescentes, se buscaron genes que poseen el mismo promotor que el RNA ribosomal, por lo que se espera que estos disminuyan en su expresión en amastigotes quiescentes. Se encontraron 2 *Open Reading Frame* (ORF): ORF F y ORF G, de las cuáles el último es un transportador de biopterina.

La pirazinamidasas/nicotinamidasas es la enzima responsable de la activación de la prodroga pirazinamida en ácido pirazinoico, que causa la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* quiescente (48). Debido a esta asociación con la quiescencia, la nicotinamidasas (PNC) (49) se eligió como gen candidato. En *Leishmania* la nicotinamidasas está asociada con la generación de NAD⁺ y se ha observado que la ausencia de precursores de NAD⁺ está asociado a la interrupción de la proliferación del parásito (49). Por ello se eligieron genes asociados al transporte de NAD⁺: transportador de NAD⁺ (NDT) y transportador ácido nicotínico (NAT) (50).

Marcadores a nivel de proteínas

Para la búsqueda de marcadores a nivel traducción, se utilizó la tecnología de geles bidimensionales. Este método permite comparar una gran cantidad de proteínas en un solo ensayo. Los geles bidimensionales, consisten en dos procesos de electroforesis. El primero se denomina isoelectroenfoque y permite separar las proteínas por su punto

isoelectrico al correr las proteínas en una gradiente de pH y ser sometidos a un potencial eléctrico, las proteínas migran y se acumulan en la región de pH donde la carga neta de la proteína es igual a cero. El segundo proceso consiste en la separación de proteínas por el peso molecular, este se realiza mediante un proceso denominado SDS-PAGE, el cual separa a las proteínas por su peso en condiciones desnaturalizantes, siendo las proteínas de bajo peso molecular las que migran más lejanas al punto de corrida. La combinación de estos procesos permite obtener un patrón de manchas separadas, las cuales se pueden analizar para determinar la presencia y abundancia relativa de un gran grupo de proteínas (51).

En el presente trabajo se realizaron geles bidimensionales de proteínas totales y de la fracción de proteínas ribosomales. El análisis de una fracción de proteínas permite analizar una mezcla menos compleja, lo cual permite evaluar cambios en proteínas de menor abundancia, que podrían estar enmascaradas por la presencia de proteínas abundantes (52).

Se eligió estudiar la fracción de proteínas ribosomales debido a que se hipotetiza que los ribosomas podrían desempeñar un rol importante en la regulación de la expresión genética en el ingreso al estado de quiescencia. Estudios recientes plantean que la heterogeneidad en los componentes ribosomales, RNA y proteínas ribosomales, podrían desempeñar un paso adicional en la regulación de la expresión genética al asociarse específicamente con subgrupos distintos de mRNA y/o desempeñar funciones extra-ribosomales (53).

En el presente estudio se desarrolló un modelo de cultivo *in vitro* en la especie de *Leishmania mexicana* con el objetivo de obtener una población predominantemente de células quiescentes. Posteriormente se analizaron diferentes marcadores candidatos de quiescencia en dos niveles: a nivel de RNA mensajero, se analizó la expresión genética de 27 genes mediante RT-qPCR y a nivel de proteínas, se realizó un

perfil de expresión de proteínas totales y ribosomales, mediante geles bidimensionales.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los marcadores moleculares de quiescencia en el cambio del estadio de promastigotes a amastigote quiescente en *Leishmania mexicana*?

Objetivo general

- Identificar marcadores expresados diferencialmente en amastigotes quiescentes de *Leishmania mexicana*

Objetivos específicos

- Desarrollar un modelo *in vitro* de amastigotes axénicos con una población predominantemente quiescente en *Leishmania mexicana*.
- Identificar marcadores de quiescencia a nivel transcripcional y traduccional

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Parásitos: Los parásitos de la especie *Leishmania mexicana*, cepa MHOM/BZ/82/BEL21 con proteína verde fluorescente verde (GFP) integrado dentro del locus del DNA ribosomal 18S se obtuvieron del laboratorio de Pathoantígenos - LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Citómetro de flujo BD FACS CANTO II
- Incubadora de hipoxia Xvivo system X3 BioSpherix
- Incubadora de CO₂
- Fluorómetro Qubit
- Sistema Lightcycler 480 Roche
- Cámara de electroforesis
- Cámara de isoelectroenfoque
- Ultracentrífuga
- Microscopio confocal Zeiss LSM 880
- Microscopio óptico Zeiss Primotech

Metodología

Cultivos *in vitro* de promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania*

La cepa transgénica de *L. mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21-GFP, se cultivó en medio M199 #M0393 pH 7.2 suplementado con hemina 5 mg/ml, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomycin y 20% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron a 26°C, hasta el cuarto día para obtener promastigotes estacionarios.

Para obtener amastigotes axénicos, los promastigotes estacionarios a una concentración de 5×10^6 parásitos/ml se transfirieron al medio MAA (medio M199 #M0393 suplementado con glucosa 2.5 g/L, tripticasa de soya 5 g/L a un pH final de 5.5) suplementado con 20% de SFB y se incubaron a 33°C con 5% de CO₂. Al cuarto día se obtuvieron amastigotes axénicos.

Infección de macrófagos peritoneales

Se ha reportado que los cultivos de *Leishmania* que son mantenidos por largo tiempo en cultivos *in vitro* pierden su capacidad infectiva y de transformarse en amastigotes (54). Para mantener estas características durante nuestros ensayos la cepa *L. mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21-GFP fue sometida exitosamente a un pasaje por macrófagos

peritoneales de ratones BALB/c y se recuperaron aquellos amastigotes con capacidad de infección. Este fue un paso previo a todos los ensayos, para garantizar que la adaptación del parásito a cultivos *in vitro* prolongados no interfiera con los resultados. Para asegurarnos que durante el trabajo experimental el tiempo de cultivo *in vitro* no fuera una variable, las cepas recuperadas de los macrófagos fueron preservadas en el criobanco del laboratorio de Patho-antígenos, hasta 2 semanas antes de su uso.

Los macrófagos peritoneales se extrajeron de ratones macho de la especie *Mus musculus*, cepa BALB/C y de 6 a 8 semanas. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia a una temperatura de 20 a 25°C, 50 a 70 % de humedad y alimentados con comida formulada para ratones.

Para la extracción de macrófagos peritoneales se realizó la eutanasia de ratones con una cámara de CO₂ y se extrajeron los macrófagos mediante una punción de la cavidad peritoneal. Para ello, con una jeringa 26G se inyectó 6 ml de medio M199 pH 7.2 suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina dentro del peritoneo, se masajeó suavemente la cavidad peritoneal y se aspiró el medio con una jeringa 21G. Las células recuperadas se centrifugaron y se resuspendieron en la mitad del volumen aspirado en medio M199 pH 7.2 suplementado con 20% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se contó el número de macrófagos, se incubaron en un flask de 25cm² con tapón ventilado a 37° C y 5% CO₂.

Después de 24 horas, los macrófagos se infectaron con amastigotes en una proporción de 4:1 (amastigotes: macrófagos). Los cultivos se lavaron cada 24 horas con medio M199 pH 7.2. Al cuarto día, los amastigotes intracelulares se recuperaron mediante la lisis mecánica de los macrófagos. Los amastigotes recuperados se cultivaron en un medio bifásico de sangre de conejo y M199 pH 7.2 suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los parásitos resultantes se criopreservaron en un tanque de nitrógeno para ser utilizados en ensayos posteriores.

Condiciones de cultivo de amastigotes para el desarrollo de un modelo de quiescencia

Con el objetivo de obtener una población predominantemente compuesta por amastigotes quiescentes se planteó que el cultivo en condiciones de limitación de nutrientes e hipoxia podrían inducir quiescencia. Por ello se probó 1) un medio de cultivo menos enriquecido y 2) menor porcentaje de oxígeno utilizado para incubar los cultivos (Hipoxia).

Se utilizaron dos medios de cultivo. Como control se utilizó el medio MAA (medio M199 #M0393 suplementado con glucosa 2.5 g/L, tripticasa de soya 5 g/L a un pH final de 5.5) suplementado con 20% de Suero Fetal Bovino (SFB). Este medio ha sido utilizado previamente para evaluar quiescencia (20). Como medio menos enriquecido se utilizó el M199 pH 5.5 (medio M199 #M0393 a un pH final de 5.5), suplementado con 0%, 1% y 20% de SFB. La concentración de $1,5 \times 10^6$ promastigotes estacionarios/ml se transfirieron al medio control y de interés. Se incubaron a 33°C bajo dos condiciones: 1) normoxia: en una incubadora de CO₂ con aproximadamente 21% de O₂ y 5% de CO₂ y 2) hipoxia: en una incubadora de hipoxia a 1% de O₂ y 5% de CO₂. Los cultivos se realizaron en una placa de 24 pocillos en un volumen final de 600 ul.

Un alto inóculo inicial de parásitos podría inducir quiescencia al limitar la disponibilidad de nutrientes por competición. Además, sería beneficioso en los posteriores estudios de proteínas, porque estos necesitan un alto número de parásitos. Por ello, se probaron cuatro concentraciones de promastigote estacionario: 1.5, 5, 10 y 20 x 10⁶ parásitos/ml. Los parásitos se transfirieron al medio M199 pH 5.5 suplementado con el porcentaje de SFB elegido y se incubaron bajo las condiciones de normoxia e hipoxia. Los cultivos se realizaron en una placa de 24 pocillos en un volumen final de 600 ul.

Finalmente, se realizaron cultivos con las mejores condiciones elegidas en flask de 75cm², con un volumen final de 25 ml, con el propósito de obtener un mayor número de células para los ensayos posteriores. Se realizaron tres réplicas biológicas, cultivos independientes, realizados en distintas semanas para cada condición evaluada.

Reversibilidad del modelo de quiescencia

La reversibilidad de un estado quiescente a uno proliferativo es esencial para confirmar que las células se mantienen viables. Para evaluar la reversibilidad, los amastigotes en el cuarto día, se contaron mediante microscopía. 0.5×10^6 amastigotes/ml, se centrifugaron a 1 800 G por 10 minutos y se transfirió el pellet de parásitos a un medio M199 pH 7.2 a 26°C para inducir la transformación a promastigotes, al cuarto día se realizó el conteo de parásitos para confirmar la proliferación.

Monitoreo de GFPr por citometría de flujo

Los promastigotes y amastigotes se tiñeron para evaluar su viabilidad celular mediante el uso de NucRed Dead 647 (Thermo fisher scientific) el cual marca a las células muertas. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo BD FACS CANTO II y se incluyó una línea Wild type (no GFPr), no teñida con NucRed como control negativo. Los archivos FCS se analizaron en el software FCS 7 Express Plus. Con un primer gate se seleccionaron las células individuales en un plot SSC-W vs SSC-H y posteriormente se creó un segundo gate con FCS-H vs FCS-A. Entre las células individuales se creó un tercer gate en un plot de expresión de GFPr vs Tinción NucRed Dead y se evaluaron los niveles de expresión de GFPr en células negativas para la tinción NucRed Dead.

Grupos evaluados

Los ensayos de RT-qPCR y electroforesis bidimensional se realizaron en 3 grupos, promastigotes estacionarios (Proesta), amastigotes axénicos cultivados en medio MAA 20%SFB 5×10^6 p/ml de inóculo inicial (Ama C) y amastigotes axénicos cultivados en medio M199 1%SFB 5×10^6 p/ml de inóculo inicial y en condiciones de hipoxia (Ama H). Para los ensayos de qRT-PCR se incluyó además un grupo de amastigotes cultivados en medio M199 1%SFB 5×10^6 p/ml de inóculo inicial y en condiciones de normoxia (Ama N).

Extracción, cuantificación y evaluación de la integridad del RNA total

A partir de los cuatro grupos (Proesta, Ama C, Ama H y Ama N) 50×10^6 parásitos se cosecharon conjuntamente. El RNA total se aisló para la posterior cuantificación relativa mediante qPCR. La extracción se realizó con el reactivo Trizol LS (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante: primero, el pellet se resuspendió en trizol, y se separó la fase acuosa – que contiene el RNA – mediante diferencia de densidades usando cloroformo. El RNA se precipitó usando isopropanol. Posteriormente, el RNA aislado se cuantificó por fluorimetría usando el kit de ensayo de RNA Quant-iT™ BR y el fluorómetro Qubit (Invitrogen). Todas las muestras se trataron con DNasa usando el kit DNase I, RNase-free (Invitrogen) para eliminar el posible DNA genómico contaminante y se volvió a cuantificar mediante Qubit. Las muestras de RNA se almacenaron a -70°C hasta la posterior síntesis de cDNA.

La integridad del RNA se evaluó mediante un gel de agarosa TBE al 1%, el cual contenía 1% de Clorox® y bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (55). Cada gel se cargó con muestras que constaban de *Loading Buffer 1X*, preparado a partir de un stock de tampón de carga de DNA 6X y 1 μg de RNA total. Los geles se procesaron durante 45 minutos con voltaje constante (100 V) antes de analizar las imágenes con transiluminación UV.

Síntesis de DNAc

El DNAc se sintetizó a partir de 150 ng de RNA total, utilizando random primer y transcriptasa reversa del kit de síntesis de cDNA Transcriptor First Strand (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se diluyó 10 veces con agua tratada con DEPC y se guardó a -20°C para su posterior uso.

Diseño de primers y PCR en tiempo real

Se diseñaron primers específicos para los genes de referencia candidatos: DRBD3, NMT y HP, genes relacionados con el transporte de hierro (LFR1, LIT1-4, LHR1, FLV, LIR1, LMIT1) involucrados en el control transcripcional y traduccional (RPA31, CITFA2,

EIF2ALPHA, PERK), altamente expresados en amastigotes y utilizados en el diagnóstico de *Leishmania* (CPB2.8, RK39-1, RK39-1, AMAS 34A, AMAS 34B), genes que poseen el mismo promotor que el RNA ribosomal (ORF F, ORF G) y asociados al transporte y generación de NAD (PNC, NDT, NAT) utilizando los programas primer3 Input (versión 0.4.0). Estos tenían las siguientes características: longitud de 18-24 pb, entre 50-60% de GC, Tm de 57-60°C y con una diferencia no mayor a 5°C entre sí. Se seleccionó el mejor par de primers al analizarlos con IDT-Oligoanalyzer.

A partir de las muestras diluidas de cDNA, se usaron 2 µL en 25 µL de volumen de reacción basada en SYBR Green Supermix (Bio-rad) en el LightCycler 480 (Roche). Se utilizó el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 95 ° C durante 3 min seguido de 40 ciclos con desnaturalización a 95 ° C durante 15 s, *annealing* a 60 ° C durante 20 s, y extensión a 72 ° C durante 20s. La PCR fue seguida inmediatamente por un análisis de la curva de fusión utilizando incrementos de temperatura de 0.03 ° C/S para determinar si el producto esperado amplifica y para asegurar que no se formaron productos inespecíficos o dímeros de cebador. Cada corrida incluyó un control negativo (DNA humano), control NRT (mix de transcripción reversa sin transcriptasa reversa) y un blanco (sin cDNA). Cada muestra se corrió por triplicado.

Para evaluar la eficiencia de qPCR se realizaron curvas estándar para los 27 genes evaluados. Se realizaron 5 diluciones seriadas: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. La eficiencia del qPCR se calculó utilizando el software Lightcycler 480 SW 1.5, con la siguiente ecuación $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. El rango de eficiencia aceptado fue de 90% a 110%. (56)

Extracción de proteínas totales

Los extractos de proteína se prepararon a partir de 100×10^6 parásitos que colectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en el buffer de lisis, que contiene 20 mM Tris base pH 7.6, 1%v/v Triton X-100, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y cOmplete (cóctel Inhibidor de proteasas-Roche), se utilizaron 20 ciclos de frío-calor de 1 minuto en hielo seco con etanol y 2 minutos en baño maría a 37°C para lisar las células. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 13 000 rpm para remover el

debris celular. Las proteínas en el sobrenadante se recuperaron y se midió la concentración total de proteínas con el kit-Non Interfering Assay.

Purificación de la fracción ribosomal

Para purificar la fracción ribosomal se utilizó la técnica de *tight couple ribosome* utilizando un colchón de sucrosa. (57). Se centrifugó 7 ml de sucrosa al 32%, en un buffer con 20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y c0mplete. con 6 ml de muestra en el rotor SW41 a 260 000 g a 4°C por 4 horas. El pellet se solubilizó en una solución rehidratante compatible con las técnicas de isoelectroenfoque 7 M urea, 2 M thiourea ,4% w/v CHAPS, 40 mM Tris base y c0mplete, las muestras se guardaron a -70°C hasta ser utilizadas para la preparación de geles bidimensionales.

Cálculo del tamaño muestral geles bidimensionales

El cálculo del tamaño muestral se realizó de acuerdo con lo planteado por Horgan, G. (58) en donde se precisan consideraciones para estudios de expresión de proteínas en geles bidimensionales donde se espera tener un número limitado de réplicas por lo costoso de la técnica. El cálculo del n muestral se realizó con la siguiente fórmula:

$$n = 2(Z + T)^2 \frac{S^2}{D^2}$$

Donde D representa el factor de expresión diferencial de proteína, Z representa el poder de la muestra, T el nivel de significancia y S la variación aleatoria entre distintas réplicas biológicas. Es importante destacar que mientras mayor sea el factor de expresión diferencial (la cantidad de veces que se expresa la proteína respecto a otra) es más probable encontrar una diferencia en la expresión diferencial. Para un poder estadístico del 80 % y un nivel de significancia del 5% se necesita un n muestral de 3 con un valor D

de 100%. Por lo tanto, el número de réplicas biológicas para cada muestra analizada será de 3 y se considerará que existe una expresión diferencial cuando el factor de expresión sea mayor o igual al 100%, es decir exista un cambio de 2 veces la expresión de una proteína.

Electroforesis bidimensional

La separación en la primera dimensión se realizó por isoelectroenfoque, utilizando ReadyStrip IPG Strips de 7 cm (tiras con gradientes de pH inmovilizados), en un gradiente de pH 3-10, cada tira se rehidrató pasivamente durante 15 horas antes de agregar las proteínas. El isoelectroenfoque se realizó en el sistema PROTEAN® i12™ IEF. Se equilibró la tira con DTT y iodoacetamida por 10 minutos en cada uno. La tira se trasladó a un gel SDS-PAGE 15% acrilamida para la corrida de la segunda dimensión. La tinción del gel se realizó con azul de coomassie para las proteínas totales (InstantBlue) y con tinción de plata (Silver Stain Plus Kit) para las proteínas ribosomales.

Asignación de identidad de manchas de geles bidimensionales

Para la identificación de las manchas de los geles bidimensionales se utilizaron los puntos isoeléctricos y pesos moleculares de cada proteína y fueron contrastados contra una base de datos del proteoma total de *Leishmania mexicana* registrado en Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), esta base de datos fue generada con ayuda de la herramienta Expasy (https://web.expasy.org/compute_pi/), la cual permite el cálculo teórico de estos parámetros. Adicionalmente, para la identificación de proteínas totales, se utilizaron publicaciones previas de geles bidimensionales del proteoma total de *Leishmania* para contrastar los resultados experimentales, con anotaciones previas obtenidas mediante espectrometría de masas. Para el caso de proteínas ribosomales, debido a que es la primera vez que se reporta un patrón de esta fracción únicamente fue comparado contra una base de datos teórica del proteoma de *Leishmania*.

Análisis de datos

El análisis se realizó de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. El análisis de qRT-PCR se realizó mediante qbase plus (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium), un software basado en el método geNorm (59) y la tecnología qBase(60) que permite determinar la estabilidad de la expresión de genes de referencia candidatos y el número óptimo de genes de referencia para la normalización y cuantificación relativa. Después del ensayo de qRT-PCR, los valores de Ct (threshold cycle) se importaron al software qbase plus. Se eligieron los mejores genes de referencia expresados de manera estable entre los grupos evaluados y utilizaron como genes normalizadores para evaluar la expresión de los genes candidatos. Posteriormente los valores NRQ (Normalized relative quantities) se exportaron y se transformaron a log₁₀ para aplicación de pruebas estadísticas no paramétricas Kruskal Wallis y el test de Dunn.

El análisis de los geles bidimensionales se realizó mediante el software Melanie 9 (<https://2d-gel-analysis.com>), se incluyó tres réplicas biológicas por cada estadio, el software permite la alineación e identificación de las manchas en distintos geles de acuerdo al peso molecular y punto isoeléctrico. De cada mancha se registra un valor correspondiente a el volumen de la mancha, que refleja la abundancia de la proteína, este es calculado como la suma de todos los valores en escala de grises correspondientes a los pixeles que delimitan una mancha menos el valor de la señal de fondo. Posteriormente, se utilizó el método de normalización radiométrica para comparar la densidad de las bandas entre los grupos experimentales. Se consideró que una proteína está diferencialmente expresada cuando la diferencia de densidades es mayor a 2 veces en al menos uno de los tres grupos experimentales y tiene valor de ($p < 0.05$) para la prueba estadística de ANOVA de una vía.

RESULTADOS

1. Desarrollo de un modelo *in vitro* de quiescencia

1.1. Elección de medio de cultivo y porcentaje de SFB

Se consideraron tres parámetros para decidir cuáles son las mejores condiciones para obtener un cultivo homogéneo de amastigotes quiescentes. El primero es el porcentaje de los parásitos viables con GFP ribosomal negativo (GFPr -), donde se espera que una población quiescente y homogénea tenga valores cercanos al 100%. El segundo es la mediana de la expresión de GFPr (en unidades arbitrarias u.a). Como característica de quiescencia, la expresión de RNA ribosomal 18S disminuye por lo tanto se espera una disminución en la expresión del biosensor GFP-rRNA 18s. En tercer lugar, se evaluó la viabilidad. Es necesario que las células sean en su mayoría viables debido a que el comportamiento de disminución de la expresión de GFPr podría deberse a un artefacto causado por células en proceso de muerte. Además, la muerte celular actuaría como una variable confusora al momento de estudiar la expresión de marcadores.

Primero se puso a prueba la composición del medio, se decidió evaluar el medio de cultivo M199, un medio con menos nutrientes que el medio estándar (MAA), en diferentes concentraciones de suero fetal bovino (SFB) bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Se utilizó como grupo control a los amastigotes cultivados en condiciones estándares (medio MAA 20%SFB 1.5×10^6 parásitos/ml de inóculo inicial y en normoxia). Estos experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos, con tres réplicas por condición evaluada.

1.1.1 Porcentaje de células GFP-

En normoxia el cambio del medio MAA al medio menos enriquecido M199 incrementa el porcentaje de células GFP-. El incremento en el porcentaje de células GFP- es de 75.27 ± 9.14 % en MAA a 93.68 ± 5.21 % en M199 cuando ambos están suplementados con 20% de SFB ($p < 0.0001$). Este incremento se mantiene independientemente del porcentaje

de SFB, aumenta a $98.93 \pm 1.05\%$ cuando el medio M199 no tiene SFB y a $97.48 \pm 2.17\%$ cuando está suplementado con 1% (Figura 1A).

El porcentaje de células GFP- también se incrementa en condiciones de hipoxia al utilizar el medio MAA. El medio de referencia MAA incubado en condiciones de hipoxia incrementa a 95.18 ± 2.99 ($p < 0.0001$) respecto a la condición de normoxia MAA con $75.27 \pm 9.14 \%$. No existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de células GFP- entre normoxia e hipoxia cuando se comparan los grupos cultivados en medio M199 con distintas concentraciones de SFB. Con 0% de SFB se muestra un porcentaje de 97.48 ± 3.23 , con 1% 98.88 ± 0.62 y con 20% 97.97 ± 1.07 . Es notable que las condiciones de M199 en hipoxia mantiene un mayor porcentaje de células GFP- respecto a MAA normoxia ($p < 0.0001$) (Figura 1A).

1.1.2 Viabilidad

La viabilidad incrementa cuando se utiliza el medio M199 1% SFB en condiciones de normoxia e hipoxia. En condiciones de normoxia, es notable el mayor porcentaje de parásitos viables del grupo M199 1% SFB ($92.37 \pm 6.26 \%$) con respecto al grupo MAA ($57.07 \pm 10.47 \%$) ($p < 0.0001$); sin embargo, si el SFB se retira por completo o se aumenta a 20%, la cantidad de parásitos viables disminuye a $77.45 \pm 17.05 \%$ y $63.40 \pm 14.22 \%$ respectivamente (Figura 1B).

La hipoxia incrementa la viabilidad de amastigotes en cultivos *in vitro*. Todos los grupos cultivados en hipoxia presentan altos niveles de viabilidad, en el medio de referencia MAA, se observa un incremento a $90.40 \pm 6.81\%$ ($p < 0.0001$), para M199 0% 97.98 ± 1.09 , M199 1% 99.38 ± 0.59 y M199 20% 92.25 ± 4.31 ($p < 0.0001$) (Figura 1B).

1.1.3 Mediana de GFP_r

La mediana de la expresión de GFP_r de los parásitos GFP+ disminuye en el grupo de M199 1% SFB. En normoxia, la mediana de GFP_r disminuye en el grupo M199 1% SFB (34.33 ± 11.81 u.a.) con respecto al grupo control MAA (75.17 ± 39.43) ($p < 0.001$). En hipoxia el grupo M199 1% SFB también disminuye la mediana de GFP_r (44.33 ± 2.73 u. a)

con respecto al control MAA ($p < 0.05$). Al cultivar el medio MAA en condiciones de hipoxia no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) 47.83 ± 9.75 u. a (Figura 1C).

Por lo tanto, el análisis de citometría de flujo muestra que el grupo M199 suplementado con 1% de SFB con 1.5×10^6 parásitos/ml de inóculo inicial e incubado en condiciones de hipoxia es la mejor condición para estudiar quiescencia, debido a que presenta un alto porcentaje de parásitos GFP-, baja expresión de GFP α y mantiene una alta viabilidad.

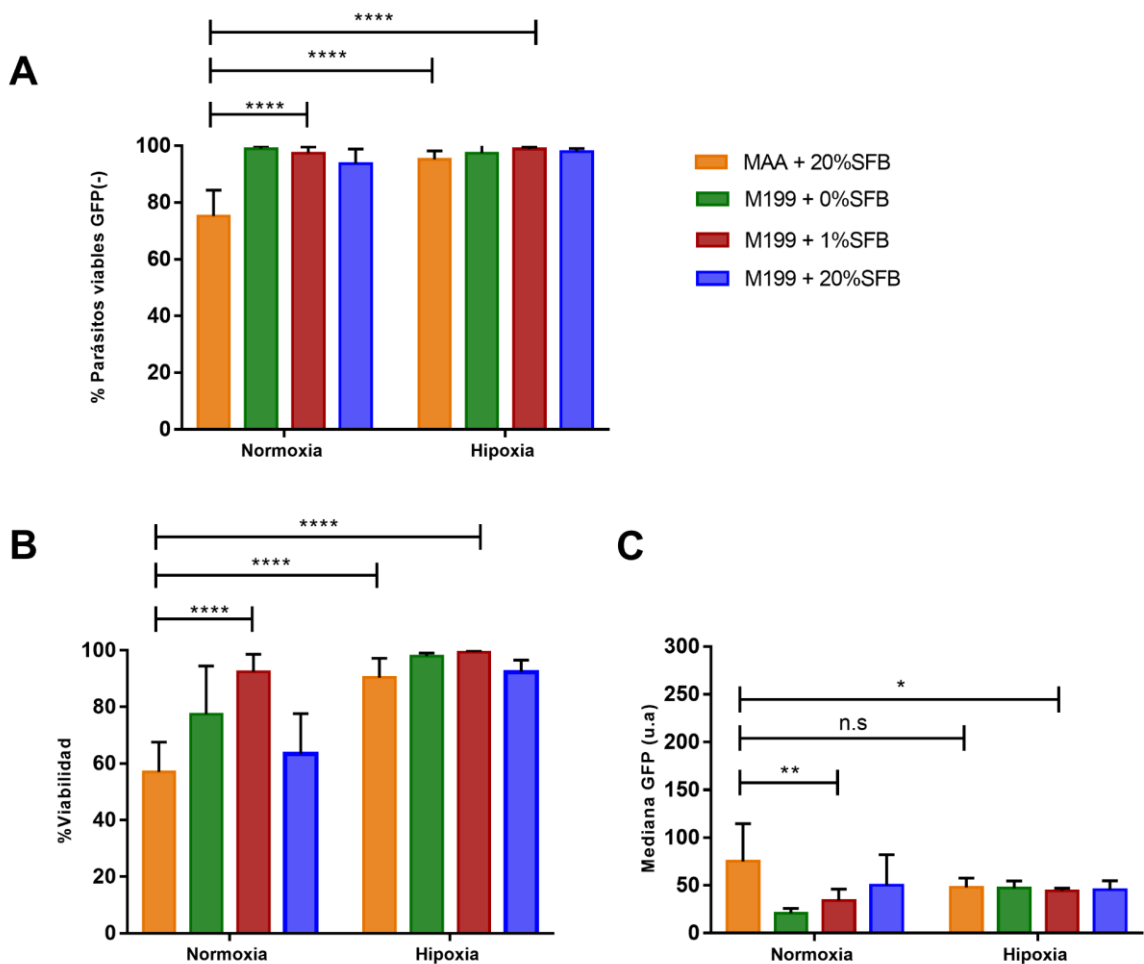


Figura 1. Elección de medio de cultivo y porcentaje de SFB. Evaluación del porcentaje de a) parásitos viables con GFP (-), b) porcentaje de viabilidad y c) mediana de rGFP medidas en unidades arbitrarias mediante citometría de flujo del grupo control MAA+20%SFB y tres grupos de interés M199 con distintas concentraciones de SFB

incubadas en normoxia e hipoxia. Los asteriscos representan diferencia estadísticamente significativa por prueba de comparación múltiple Tukey.

1.2 Determinación del inóculo inicial óptimo

Se hipotetizó que un alto inóculo inicial de parásitos podría inducir quiescencia al limitar la disponibilidad de nutrientes por competición. Además, incrementar la cantidad de parásitos en los cultivos *in vitro* sería beneficioso para la identificación de marcadores. Esto debido a que el estudio de proteínas requiere un alto número de parásitos, por lo que se necesitarían cultivos de grandes volúmenes, lo que representa una limitación técnica y económica. Por ello se probaron otras concentraciones de inóculo inicial para el grupo M199 1%SFB: 5, 10 y 20 x 10⁶ parásitos/ml. Para el grupo MAA 20%SFB se probó otro inóculo inicial: 5 x 10⁶ parásitos/ml, con el propósito de obtener una mayor cantidad de parásitos finales para los experimentos de RNA y proteínas.

En la condición MAA 20%SFB normoxia, un aumento de inóculo inicial de 1.5x10⁶ a 5x10⁶ parásitos/ml produce una disminución en el porcentaje de parásitos GFP- de 78.05 ± 12.79% a 50.02 ± 4.72% (p<0.0001), un aumento en la expresión de rGFP de 98 ± 36.12 a 205.5 ± 84.29 u.a. (p<0.0005) y no hay cambios significativos en el porcentaje de viabilidad de 74.75 ± 18.34% a 61.2 ± 12.76% (p>0.05) (Figura 2). Estos resultados muestran que el aumento de inóculo inicial en la condición MAA 20%SFB normoxia mantiene la heterogeneidad del cultivo de amastigotes sin afectar la viabilidad por lo que para lograr un mayor rendimiento en la cantidad de parásitos se eligió la condición de MAA 20%SFB 5x10⁶ parásitos/ml normoxia como nuevo grupo control (Ama C).

Además se observa que las condiciones M199 1%SFB hipoxia con 20, 10, 5 y 1.5 de inóculo inicial tienen un mayor porcentaje de parásitos GFP- (91.98 ± 1.10%, 90.57 ± 2.95%, 91.07 ± 3.62% y 99.2 ± 0.392% (p<0.0001) respectivamente) y menor expresión de rGFP (41.17 ± 8.45 u. a, 61.33 ± 9.25 u.a, 63.67 ± 6.74 u.a y 46.17 ± 4.26 u.a (p<0.0001) respectivamente) comparados con el control Ama C (Figura 2). Únicamente los grupos M199 1%SFB 5x10⁶ p/ml y M199 1%SFB 1.5x10⁶ p/ml poseen mayor porcentaje de viabilidad (87.23 ± 8.32% (p<0.05) y 98.67 ± 0.4% (p<0.001)

respectivamente) respecto a Ama C. Por lo tanto, el grupo M199 1%SFB 1.5×10^6 parásitos/ml hipoxia, seguido del grupo M199 1%SFB 5×10^6 parásitos/ml hipoxia poseen condiciones favorables para estudiar quiescencia debido a que presentan un alto porcentaje de parásitos GFP-, baja expresión de rGFP y mantienen una alta viabilidad.

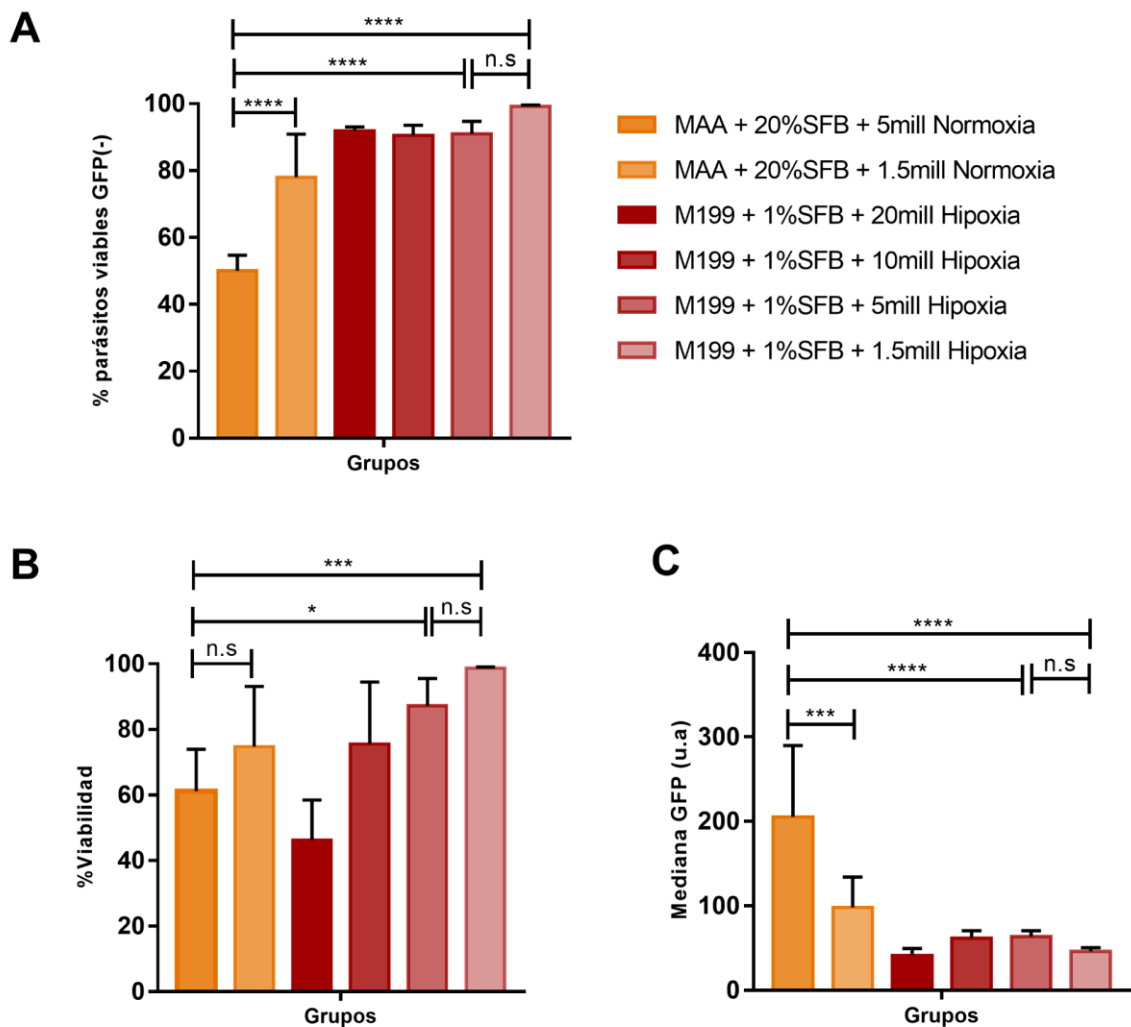


Figura 2. Determinación del inóculo inicial óptimo. Evaluación del porcentaje de a) parásitos viables con GFP (-), b) porcentaje de viabilidad y c) mediana de rGFP medidas en unidades arbitrarias mediante citometría de flujo del dos grupos control cultivados en condiciones estándar (MAA+20%SFB normoxia) pero con diferente inóculo inicial y cuatro grupos cultivados en el medio de interés M199 + 1%SFB hipoxia con distintos

inóculos iniciales. Los asteriscos representan diferencia estadísticamente significativa por prueba de comparación múltiple Tukey.

1.3 Verificación del modelo de quiescencia

Para corroborar que no existe proliferación en las nuevas condiciones de cultivo de amastigote se realizaron conteos mediante microscopía y se calculó la tasa de crecimiento. Se observa que en el día 4 Proesta tiene una tasa de crecimiento de $5083.3 \pm 662.4\%$. El grupo MAA 20% SFB normoxia con un inóculo inicial de 5×10^6 parásitos/ml tiene una tasa negativa de crecimiento de $-59.18 \pm 17.892\%$ con $2.041 \pm 0.895 \times 10^6$ parásitos/ml finales, la misma condición con un menor inóculo inicial 1.5×10^6 parásitos/ml tiene una tasa de crecimiento similar $81.792 \pm 7.77\%$ con $0.273 \pm 0.117 \times 10^6$ parásitos/ml (Figura 3). Por lo tanto, el inóculo inicial de 5 millones permite obtener mayor cantidad de células y previamente se observó que no existen diferencias en la viabilidad ni en la expresión de GFP-rRNA 18S.

También se observa que el grupo M199 1%SFB 1.5×10^6 parásitos/ml hipoxia tiene una tasa de crecimiento del $89,7 \pm 59.923\%$ con un conteo final de $2.847 \pm 0.899 \times 10^6$ parásitos/ml (Figura 3). Aunque estos resultados muestran una tasa positiva en el crecimiento esta no es comparable con el crecimiento que ocurre en promastigotes que es mayor en una proporción mayor a 50 veces. Cuando se aumenta el inóculo inicial a 5×10^6 parásitos la tasa es negativa $-22.44 \pm 23.75\%$. Aunque la definición de quiescencia contempla una población con baja replicación, se decidió elegir a la condición M199 1%SFB 5×10^6 parásitos/ml hipoxia como la mejor condición para el estudio de amastigotes quiescentes.

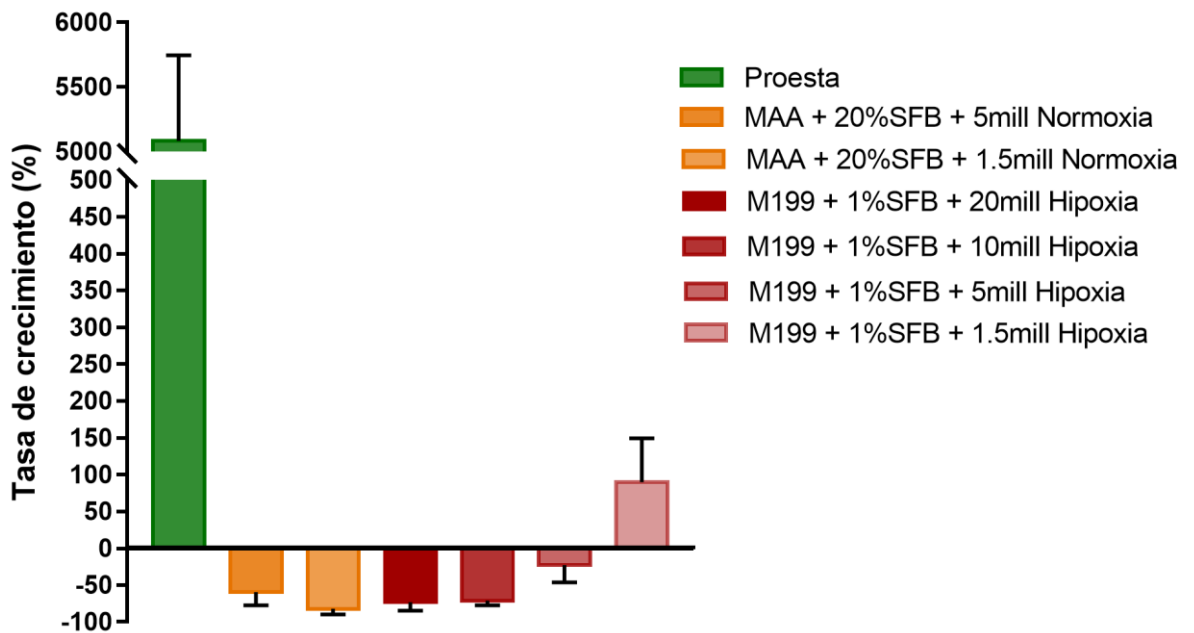


Figura 3. Tasa de crecimiento al cuarto día de cultivo. Se muestra el porcentaje de tasa de crecimiento de los grupos evaluados calculado en base al inóculo inicial de cada grupo y el conteo a los 4 días mediante microscopía. Tasa de crecimiento = $(\text{Conteo parásitos al cuarto día} - \text{Inóculo inicial}) / \text{Inóculo inicial}$. Las barras corresponden al promedio de tres réplicas biológicas \pm la desviación estándar de dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

1.4 Adaptación de modelo a cultivos de mayor volumen

El cultivo en placas de 24 pocillos permitió probar una gran cantidad de condiciones utilizando poco material. Pero, para los posteriores ensayos de identificación de marcadores celulares se necesita trabajar con mayores volúmenes para obtener mayor cantidad de parásitos. Por ello para comprobar que el modelo es reproducible en cultivos de mayor volumen se realizaron cultivos en flask de 75cm² del grupo control de estadio Promastigote estacionario (Proesta), del grupo amastigote control MAA N 20% SFB (Ama C), de M199 N 1%SFB (Ama N) y de M199 H 1% SFB (Ama H) .

Se observa que el grupo Ama H presenta la tasa más alta de porcentaje de GFP - ($90.13 \pm 7.39 \%$), menor mediana de GFP (56.67 ± 6.60 u.a.) y alta viabilidad ($83.45 \pm 10.3 \%$), corroborando que este grupo es la mejor condición para estudiar quiescencia (Figura 4). El grupo Proesta, presenta un bajo porcentaje de GFP - ($5.50 \pm 2.78 \%$), mayor expresión de GFP (782.70 ± 125.20 u.a.) y alta viabilidad ($92.47 \pm 2.25 \%$). Los grupos Ama C y Ama N, como se esperaba, presentan condiciones intermedias en términos de porcentaje de GFP- ($47.15 \pm 16.32 \%$ y $66.08 \pm 7.24 \%$), mediana de GFP (113.3 ± 63.06 u.a. y 56.67 ± 6.602 u.a.) y menor viabilidad ($63.75 \pm 15.3 \%$ y 75.4 ± 4.124).

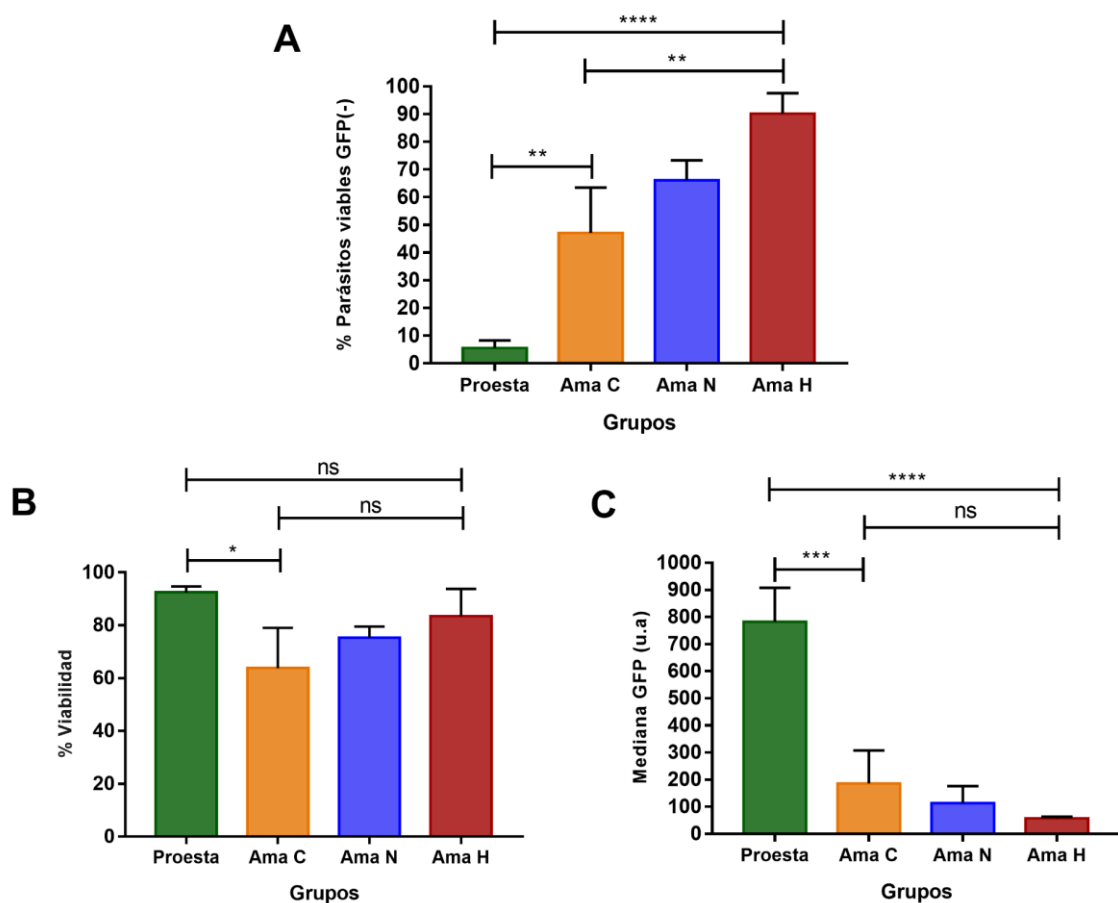


Figura 4. Adaptación del modelo de inducción de quiescencia en cultivos de mayor volumen. Los resultados obtenidos en placas de 24 pocillos se confirmaron en cultivos de mayor volumen en flask. a) parásitos viables con GFP (-), b) porcentaje de viabilidad y c) mediana de rGFP medidas en unidades arbitrarias mediante citometría de flujo.

Cada barra representa la media de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticas relevantes entre los grupos evaluados por prueba de comparación múltiple Tukey.

1.5 Reversibilidad del modelo de quiescencia

Una característica importante de la quiescencia es la reversibilidad, es decir que las células que entran en quiescencia son capaces de reanudar su actividad metabólica y replicarse. Esta capacidad de reversibilidad permite diferenciar células quiescentes de células senescentes, las cuales entran a un estado de no replicación irreversible (61). Se evaluó la reversibilidad del modelo de quiescencia mediante el análisis de la expresión de GFP y conteos de los parásitos en el cuarto día, finalizada la diferenciación de amastigotes a promastigote en el nuevo modelo *in vitro* (Ama H). Los resultados muestran un aumento en la expresión de GFP (Mediana de 43 ± 3.46 a 622 ± 12.12) y un aumento del número de parásitos de 0,5 a 55×10^6 parásitos/ml (Figura 5). Además, se comprobó mediante microscopía que los parásitos diferenciados tenían la morfología característica de promastigotes. Estos resultados confirman que los amastigotes cultivados en la condición Ama H son capaces de diferenciarse en promastigotes, reanudar la replicación e incrementar la expresión de 18s rRNA.

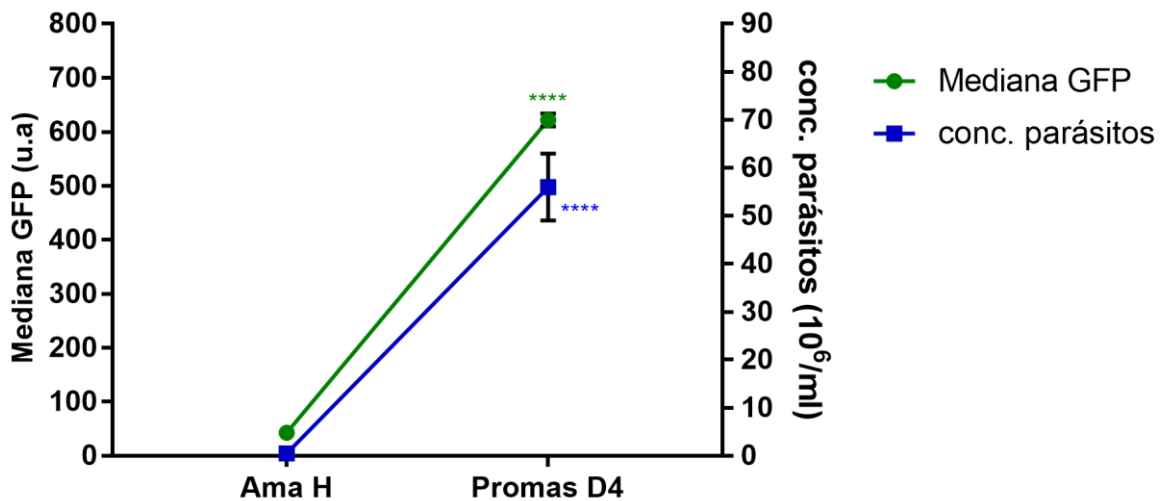


Figura 5. Reversibilidad del modelo de quiescencia. Se muestra en el eje y izquierdo la mediana de la expresión de GFP ribosomal (unidades arbitrarias) medida por citometría de flujo y en el derecho la concentración de parásitos (10⁶/ml) obtenido por conteos bajo el microscopio óptico en el cambio de amastigotes del modelo quiescente (Ama H) al promastigote en el día 4. Los asteriscos representan diferencia estadísticamente significativa con respecto a Ama H por prueba de comparación múltiple de Tukey.

Para verificar que las nuevas condiciones de cultivo no afectan morfológicamente a los parásitos se muestran imágenes de microscopía de los parásitos. La condición de Proesta, muestra promastigotes que se caracterizan por ser alargados (~ 13 μ M) y tener un flagelo. Tanto la condición Ama C como el nuevo método de cultivo Ama H tienen la forma típica de un amastigote, redondeada y de menor tamaño que un promastigote (~5 μ M) (Figura 6). Entre Ama C y Ama H no existen diferencias evidentes en la morfología de los parásitos, sin embargo, Ama C tiene una mayor tendencia a formar rosetas (cúmulos de parásitos) que en la condición Ama H.

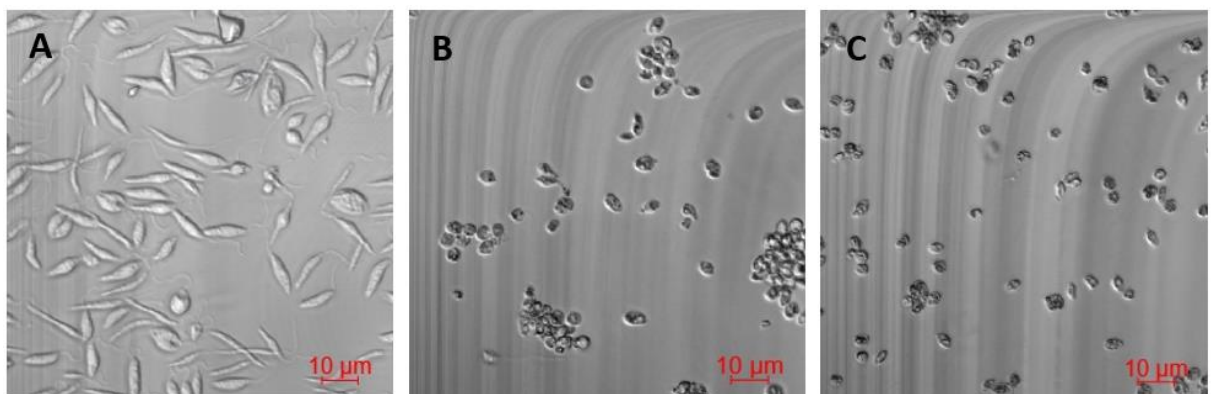


Figura 6. Imágenes de microscopía a 40X. A) Promastigote estacionario (Proesta) B) Amastigote cultivado en medio MAA20%SFB 5x10⁶ p/ml normoxia (Ama C) C) Amastigote cultivado en medio M199 1%SFB 5x10⁶ p/ml hipoxia (Ama H). 20 μ m barra de referencia.

2. Identificación de marcadores de quiescencia

2.1 Identificación de marcadores a nivel de mRNA

2.1.1 Cuantificación e integridad del RNA

Se extrajo RNA de los cuatro grupos evaluados por citometría de flujo (Proesta, Ama C, Ama N, Ama H) y posteriormente fueron cuantificados mediante fluorimetría. La cuantificación de RNA de Proesta y Ama C concuerdan con resultados anteriormente reportados (14-16). Se observa que Ama H tiene una cantidad significativamente menor de RNA total ($0.05 \pm 0.02 \mu\text{g}/10^6$ parásitos) que Proesta ($0.24 \pm 0.1 \mu\text{g}/10^6$ parásitos) $p < 0.05$. Mientras que Ama C con $0,142 \pm 0,059 \mu\text{g}/10^6$ parásitos y Ama N $0,112 \pm 0,053 \mu\text{g}/10^6$ parásitos tenían un promedio menor pero no significativo de RNA con respecto a Proesta y un promedio mayor no significativo respecto a Ama H (Figura 7). Además, se evaluó la calidad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 8), la presencia de bandas que corresponden al RNA ribosomal sugiere que el RNA no está degradado y es de alta calidad.

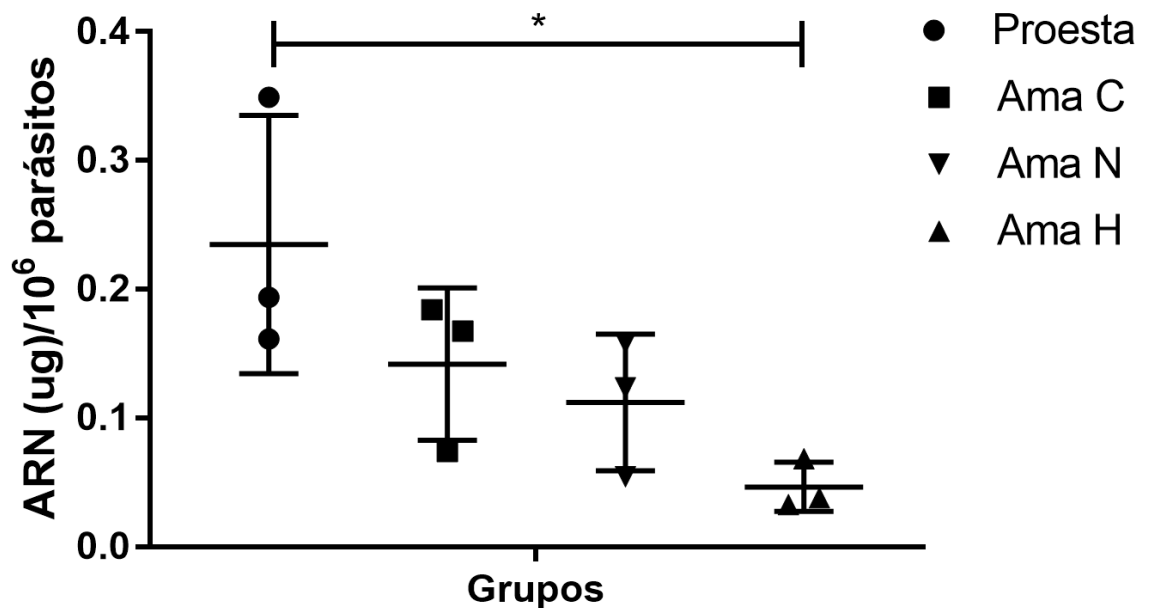


Figura 7. Cuantificación de RNA total (ug/106 parásitos) de Proesta, Ama C, Ama N y Ama H mediante fluorimetría. Los puntos indican los valores de cantidad de RNA de cada una de las tres réplicas biológicas. El Amas H muestra una disminución del contenido total de RNA en comparación con Proesta. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0.05$) usando one-way ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey.

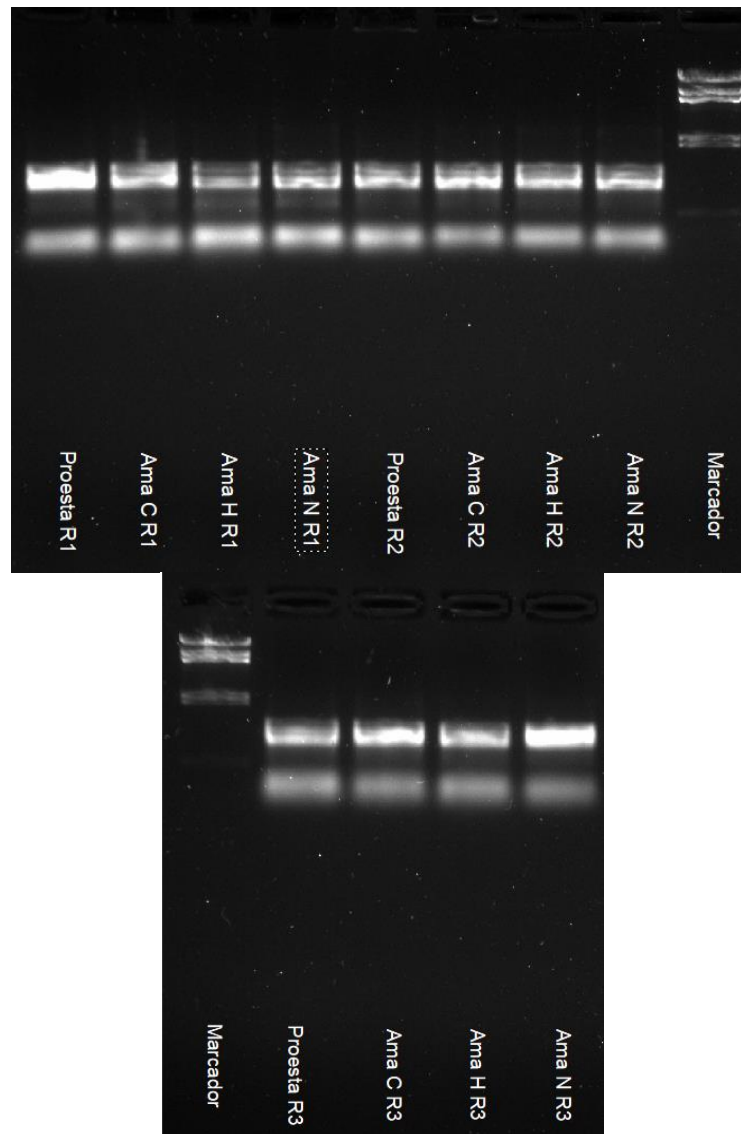


Figura 8. Evaluación de la integridad del RNA total del parásito de las tres réplicas biológicas de los cuatro grupos evaluados (Proesta, Ama C, Ama N, Ama H). Se muestra un gel de agarosa TBE al 1%, clorox al 0.5% y teñido con bromuro de etidio. En

cada carril se cargó 1 μ g de RNA total tratado con DNAsas en un volumen de 12 μ l. Las bandas muestran RNA no degradado de alta calidad y corresponden al RNA ribosomal.

2.1.2 Cuantificación relativa de mRNA

Se realizó la cuantificación relativa de transcritos de 27 genes mediante ensayos de qPCR de los cuatro grupos analizados por citometría de flujo (Tabla 1). El primer paso para la cuantificación relativa mediante qPCR es la identificación de genes de referencia para la posterior normalización que permita la comparación entre experimentos (59,60). Se utilizó el software qbase para elegir los mejores genes de referencia para el experimento, para ello se utilizaron dos parámetros. Por un lado, GeNorm M muestra una clasificación de genes candidatos según su estabilidad (expresada en valores M). Los genes menos estables se ubican a la izquierda (con un valor M alto) y los genes más estables se ubican a la derecha (con un valor M bajo). Se observa que los primeros tres genes más estables son: PNC, LIT1-4 y GSH2 (Figura 9A). Por otro lado, GeNorm V muestra el número óptimo de genes de referencia que se deberán utilizar en la normalización (Figura 10B). En el gráfico de barras se comparan dos números consecutivos de genes de referencia. Cuando el valor V de la barra cae por debajo de 0,15, se afirma que no hay beneficio al utilizar un gen de referencia extra. Por lo tanto, el número óptimo de genes de referencia en el experimento es 2 y no existe beneficio al utilizar más genes de referencia. Por ello, se escogieron los 2 genes de referencia más estables: PNC (nicotinamidasa) y LIT1-4 (transportador de Fe⁺²).

evaluados, 5 genes se expresaron diferente entre los cuatro grupos evaluados: AMA8A y AMA34D se sobre expresaron significativamente en Ama H respecto a Proesta, DRBD 3 se sub expresó significativamente en Ama H en comparación a Proesta y NAT y PERK se expresaron significativamente menos en Ama C respecto a Proesta.

Ama 8A se expresó 5 veces más en Ama H comparado con el Proesta ($p < 0.02$). En Ama C y Ama N, aunque también existe un aumento de expresión de 3.3 y 3 veces respectivamente, este aumento no es significativo.

Por otro lado, AMA34D también se sobreexpresó significativamente en Ama H (3.3 veces con respecto a Proesta) ($p < 0.02$) y al igual que en Ama 8A, también existe un aumento no significativo en Ama C y Ama N (2 y 2.1 veces respectivamente). Debido a su sobreexpresión en Ama H (grupo con una población predominantemente quiescente), estos dos genes de amastina son candidatos de marcadores positivos de quiescencia.

DRBD 3 se expresó significativamente 3.2 veces menos en Ama H comparado con Proesta ($p < 0.03$). En Ama C, aunque también se observa una menor expresión de 2.3 veces menos respecto a Proesta, esta disminución no es significativa. Debido a su menor expresión en Ama H, este gen es un candidato de marcador negativo de quiescencia.

NAT se expresó 3.7 veces significativamente menos en Ama C ($p < 0.02$). En Ama H se observó también un aumento de expresión de 3 veces, sin embargo, no es significativo. PERK también se expresó significativamente menos en Ama C (2.2 veces).

Cabe destacar que CPB2.8 es el gen con mayor sobreexpresión en amastigotes respecto al promastigote: se sobreexpresa 12 veces en el grupo Ama C, 10 veces en Ama N y 9.4 veces en Ama H respecto a Proesta. Sin embargo, este aumento no es significativo. Anteriormente se ha reportado a CPB2.8 como un gen altamente expresado en el amastigote, por lo que este resultado inesperado puede deberse a la alta desviación estándar que existe entre las tres réplicas biológicas de los tres grupos de amastigotes evaluados.

Para confirmar los análisis por citometría de flujo se realizó la cuantificación relativa del gen 18S mediante RT-qPCR. Los resultados muestran que no existen cambios significativos en la expresión del gen entre los 4 grupos analizados. Sin embargo, en Ama C y Ama N hay una ligera disminución comparado con Proesta de 0.7 y 0.5 veces respectivamente.

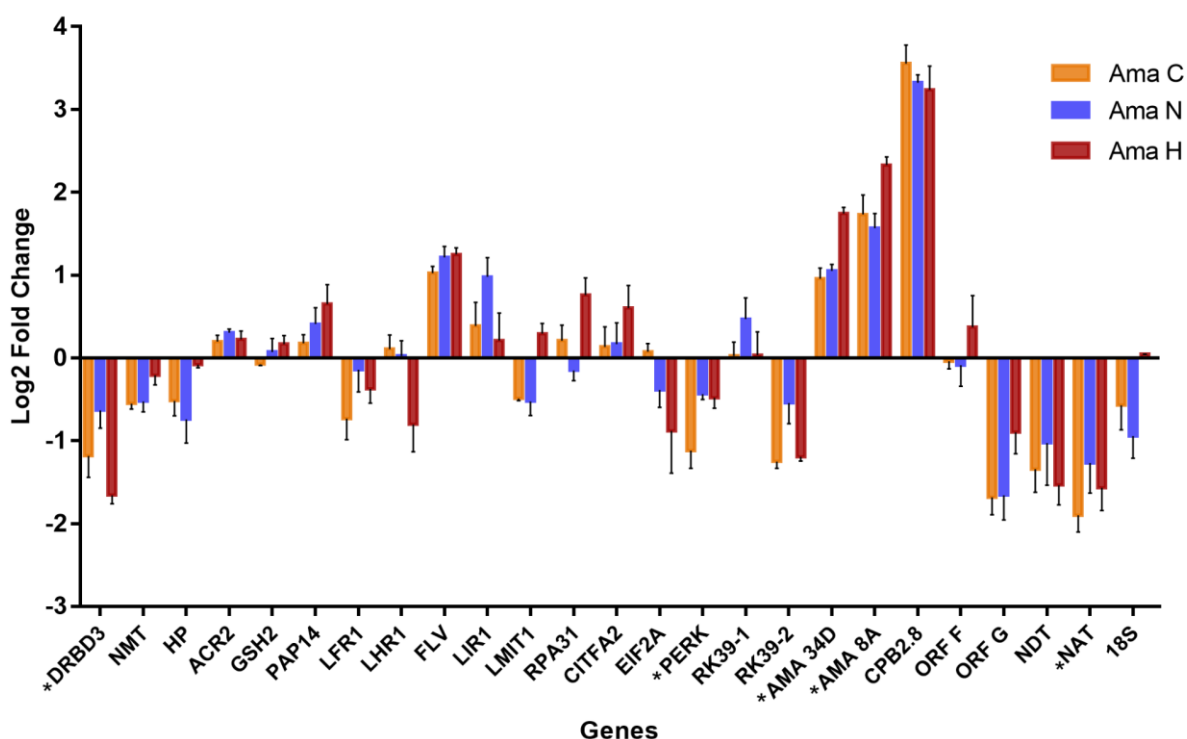


Figura 10. Cuantificación relativa de los transcritos de 25 genes mediante qPCR. El gráfico muestra el promedio del Log2 del Fold change de tres réplicas biológicas \pm DE del grupo Ama C, Ama N y Ama H teniendo como referencia el grupo Proesta. Los asteriscos señalan a los genes que se expresaron significativamente en al menos un grupo evaluado.

2.2 Identificación de marcadores a nivel de proteínas

2.2.1 Purificación de la fracción ribosomal

Para la identificación de marcadores de quiescencia a nivel de proteínas se priorizaron los grupos más relevantes para estudiar quiescencia (Proesta, Ama C y Ama H) debido al

alto número de células necesarias para este tipo de ensayos. Se muestra un SDS-PAGE de la purificación de la fracción ribosomas, un carril correspondiente a proteínas ribosomales y otro a proteínas totales para cada grupo (Figura 11). Se observa que el número de bandas se reduce en la fracción ribosomal respecto a las proteínas totales y que la región de 13 kDa y 52 KDa presenta mayor densidad de bandas tanto para Proesta, Ama C y Ama H. En la literatura no se encontró un patrón de SDS-PAGE publicado de la fracción ribosomal en *Leishmania*, por lo que para verificar el proceso de purificación se realizó un gráfico de la distribución teórica de las proteínas ribosomales anotadas en la base de datos UniProt para *Leishmania mexicana*, se utilizó la secuencia de aminoácidos para calcular el peso molecular y determinar su índice de migración, se observa que la distribución teórica coincide con la fracción ribosomal, con una gran densidad de proteínas en la región de 10 kDa y 40 kDa, y algunas proteínas cercanas a la región de 50 kDa (Figura 12). Sin embargo, se observan que existen bandas muy alejadas de la región teórica de proteínas ribosomales lo cual indica que otras proteínas también precipitaron junto a los ribosomas, este es un resultado esperado, ya que la técnica utilizada para la purificación de ribosomas recupera además proteínas asociadas al ribosoma como proteínas relacionadas al proceso de traducción, biogénesis y degradación de las proteínas ribosomales (62).

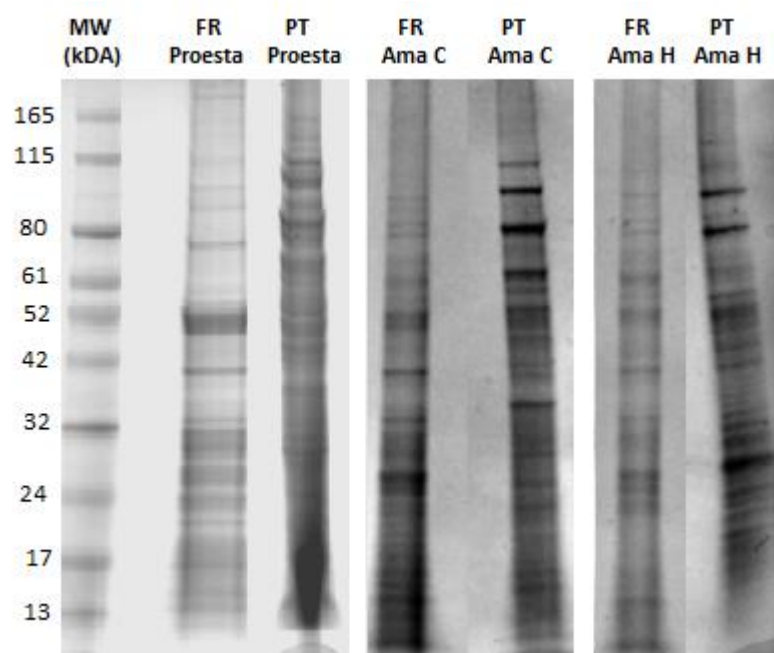


Figura 11. SDS-PAGE Purificación de fracción ribosomal. MW, peso molecular en kilodaltons. Primer carril marcador molecular, segundo y tercer carril fracción ribosomal promastigote estacionario de distintos grupos de extracción de proteína ribosomal, cuarto y quinto carril extracto total de proteínas de promastigotes estacionarios.

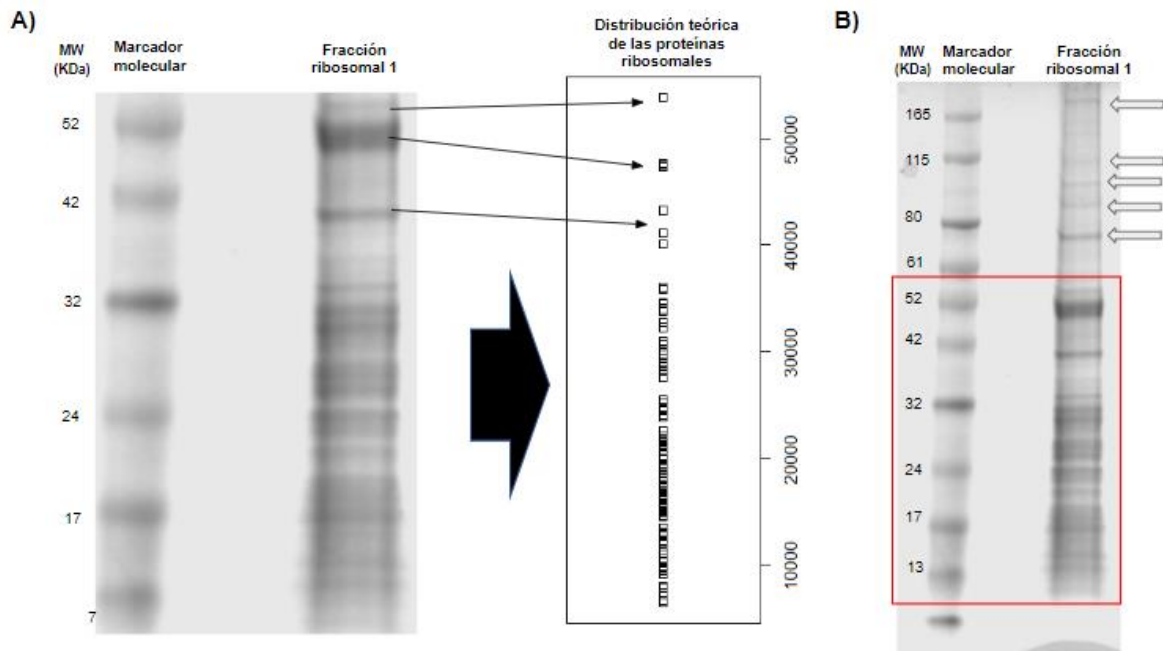


Figura 12. Distribución teórica de proteínas ribosomales. A) Comparación del patrón de distribución de la fracción ribosomal frente a la distribución teórica en un gel SDS-PAGE de las proteínas ribosomales canónicas. En el eje horizontal se muestra el peso molecular en Kilodaltons, los pesos moleculares fueron calculados por las secuencias de aminoácidos anotadas en UniProt. El cálculo de los pesos moleculares se realizó utilizando ExPASy Compute pI/Mw tool. B) En el cuadro rojo se muestra la sección que corresponde al rango de distribución teórico de proteínas ribosomales, las flechas indican bandas que se encuentran lejos de la región que corresponde a las proteínas ribosomales.

2.2.2 Cuantificación de proteínas totales y ribosomales

No existen diferencias significativas en la cantidad de proteínas totales extraídas entre los grupos mediante el test de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$); Ama C ($3.555 \pm 0.496 \mu\text{g}/10^6$ células), Ama H ($3.039 \pm 0.767 \mu\text{g}/10^6$ células) y Proesta ($4.149 \pm 0.445 \mu\text{g}/10^6$ células) (Figura 13A). Estos resultados discrepan de reportes anteriores donde la cantidad de proteínas totales disminuye en el grupo de amastigotes axénicos respecto al promastigote estacionario (16).

Respecto a la cuantificación de proteínas ribosomales no existen diferencias entre grupos mediante el test de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$); Proesta ($0.062 \pm 0.041 \mu\text{g}/10^6$ células), Ama C ($0.062 \pm 0.026 \mu\text{g}/10^6$ células) y Ama H ($0.067 \pm 0.008 \mu\text{g}/10^6$ células) (Figura 13B). La proporción de fracción ribosomal respecto a las proteínas totales de Proesta es 1.4%, de Ama C es 2.6% y de Ama H 1.4%.

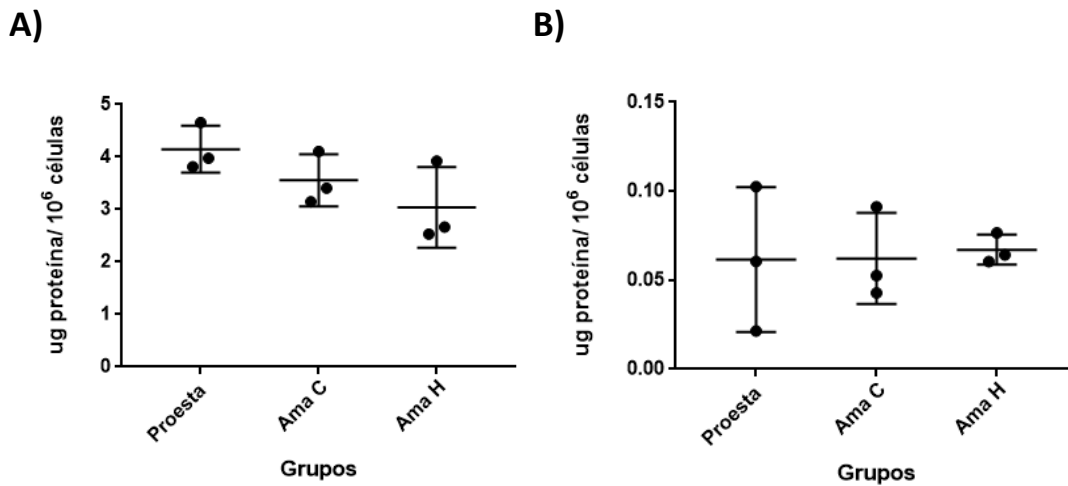


Figura 13. Cuantificación de proteínas totales y ribosomales. A) Cuantificación de proteínas totales. B) Cuantificación de proteínas ribosomales. Cada punto corresponde a una réplica biológica. No existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Prueba de Kruskal-Wallis $p > 0.05$).

2.2.3 Análisis de la expresión diferencial de proteínas totales y de la fracción ribosomal mediante geles bidimensionales

Las proteínas totales y ribosomales de los grupos promastigote estacionario, M199 H 1 % SFB y MAA N 20% SFB, fueron separados en geles bidimensionales con un rango de pH de 3-10. Se utilizó el software Melanie para el análisis comparativo de los geles, se utilizó 3 réplicas independientes, provenientes de cultivos preparadas en distintas semanas, para cada condición evaluada. En cada réplica fue cargada la misma cantidad de proteínas, 100 ug de proteínas para el caso de proteínas totales y 20 ug para las proteínas ribosomales. Las imágenes de los geles muestran que los perfiles obtenidos son reproducibles en intensidad y posición relativa de las manchas (Figura 14 Y Figura 15).

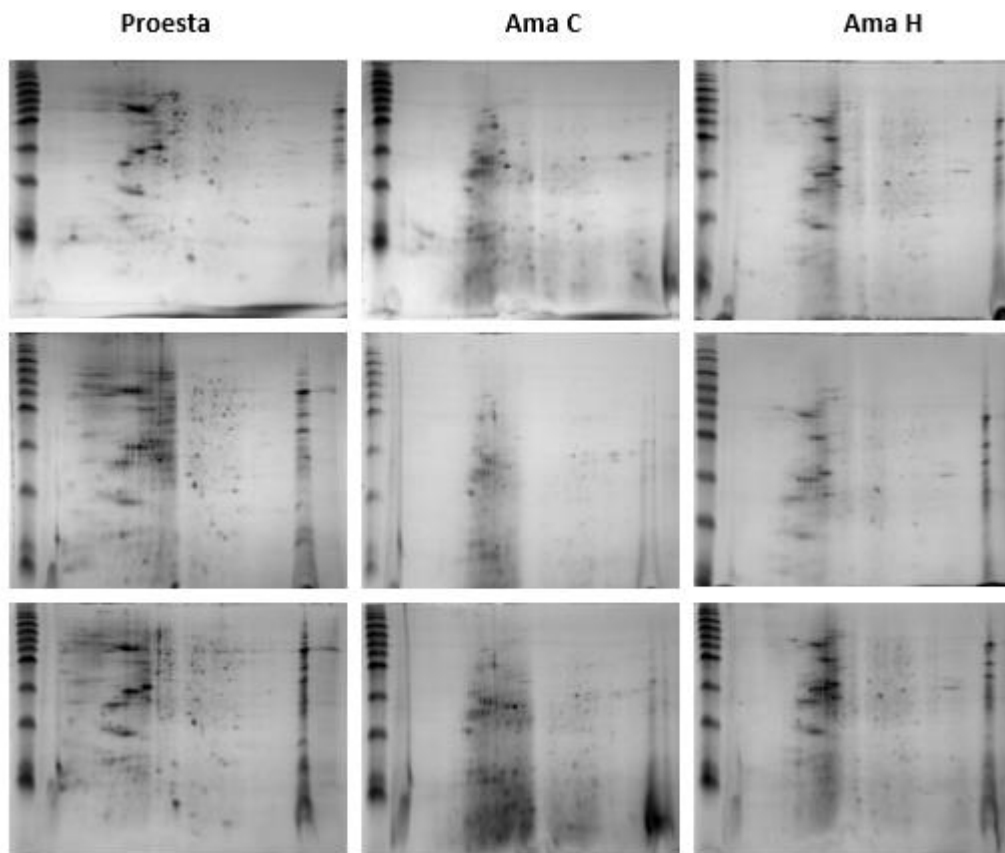


Figura 14. Geles bidimensionales de proteínas totales de Leishmania mexicana. Promastigote estacionario (Proesta), Amastigote MAA 20% normoxia (Ama C), Amastigote M199 15 hipoxia (Ama H). En cada fila se muestra los geles obtenidos de

una réplica biológica en cada gel se cargó un lisado de proteínas de 100 ug , y fueron sometidos en la primera dimensiona una gradiente inmovilizada de pH 3-10, segunda dimensión SDS-PAGE 15%, la tinción se realizó con Instant blue Coomassie Stain.

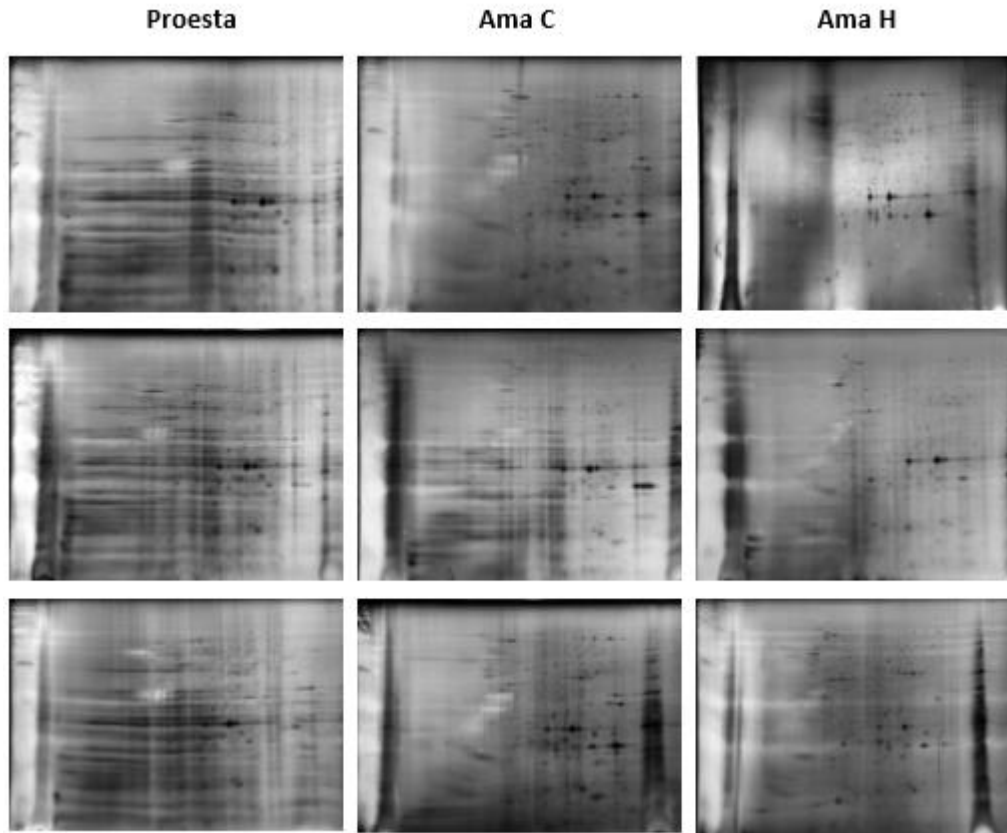


Figura 15. Geles bidimensionales de proteínas ribosomales de Leishmania mexicana. Promastigote estacionario (Proesta), Amastigote MAA 20% normoxia (Ama C), Amastigote M199 15 hipoxia (Ama H). En cada fila se muestra los geles obtenidos de una réplica biológica en cada gel se cargó un lisado de proteínas de 100 ug , y fueron sometidos en la primera dimensiona una gradiente inmovilizada de pH 3-10, segunda dimensión SDS-PAGE 15%, la tinción se realizó con tinción de plata.

Los geles bidimensionales de proteínas totales muestran en promedio 177 manchas en las tres condiciones evaluadas. El análisis comparativo muestra que 37 de estas proteínas son diferencialmente expresadas en los tres grupos (ANOVA $p < 0.05$, expresión relativa entre los grupos (Fold > 2). El grupo de Ama C 23 proteínas están

subexpresadas (Fold <0.5) y 7 están sobreexpresadas (Fold >2), en el grupo de Ama H 8 proteínas están subexpresadas y ninguna sobreexpresada respecto a Proesta. Entre Ama C y Ama H, 15 proteínas están subexpresadas y 2 sobreexpresadas en Ama C (Figura 16).

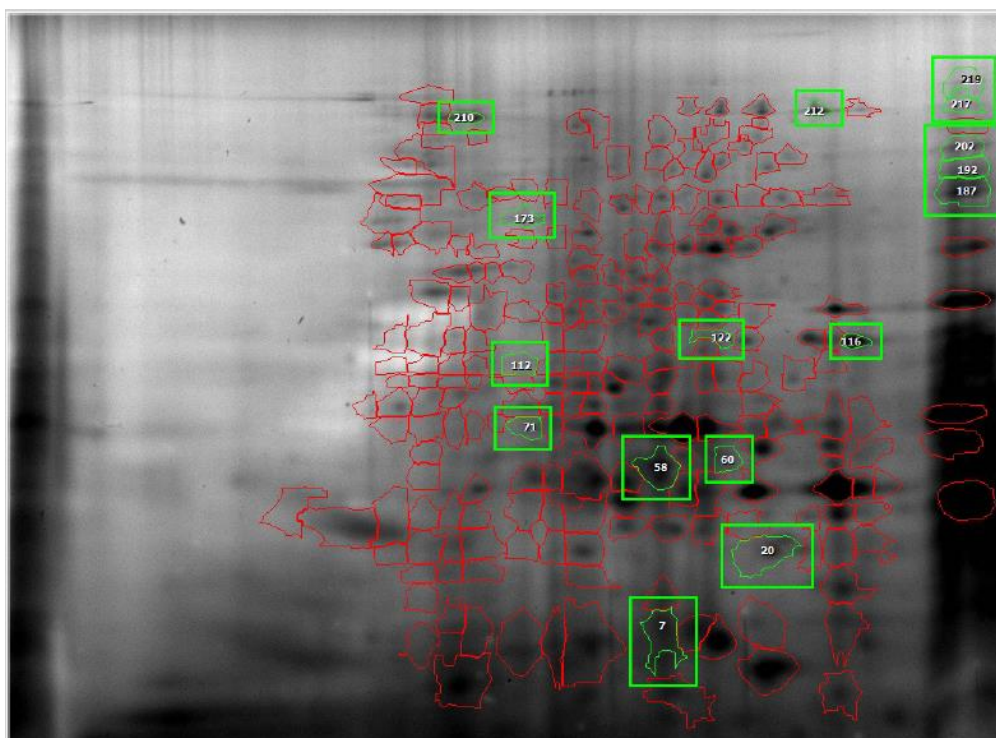


Figura 16. Electroforesis bidimensional de proteínas ribosomales de Leishmania mexicana. La imagen corresponde a el gel de referencia para la comparación de los tres grupos evaluados. Delimitados por áreas rojas se encuentran las manchas incluidas en el análisis de expresión, delimitados por áreas verdes se encuentran las manchas con expresión diferencial (Manchas cuya proporción es más de 2 veces el volumen entre los tres grupos en al menos uno de los estadios y manchas con un valor de $p < 0.05$ para el test de ANOVA), dentro del área verde se indica el número asignado a cada mancha.

En cuanto a los gels bidimensionales de proteínas ribosomales muestran en promedio 220 manchas en las tres condiciones evaluadas. El análisis comparativo muestra que 16 de estas proteínas son diferencialmente expresadas, En el grupo de Ama C 6 proteínas están subexpresadas y 4 sobreexpresadas respecto a Proesta, en el grupo de Ama H 6 de estas proteínas están subexpresadas y 6 están sobreexpresadas respecto a Proesta,

Entre Ama C y Ama H no hay diferencias en la expresión excepto por la mancha 116 la cual esta sobreexpresada en Ama C (Figura 17). El porcentaje de proteínas expresadas diferencialmente en la fracción de proteínas ribosomales es de 7.3% lo cual indica que tiene menor variación respecto a las proteínas totales cuya fracción de proteínas expresadas diferencialmente es de 20.9 %.

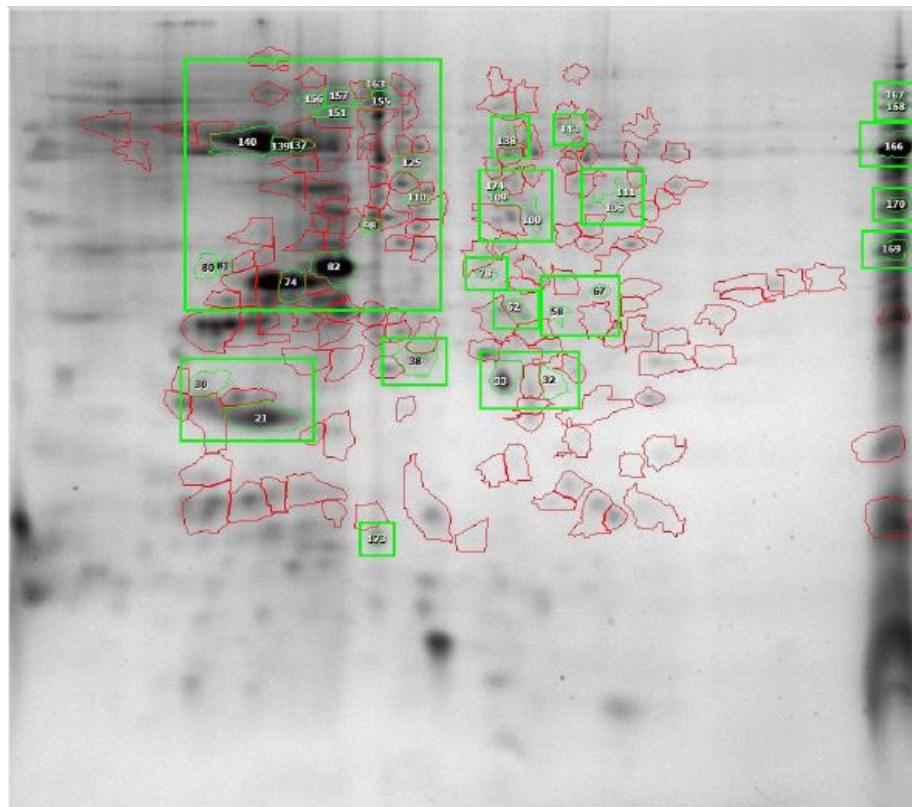


Figura 17. Electroforesis bidimensional de proteínas totales de Leishmania mexicana.

La imagen corresponde a el gel de referencia para la comparación de los tres grupos evaluados. Delimitados por áreas rojas se encuentran las manchas incluidas en el análisis de expresión, delimitados por áreas verdes se encuentran las manchas con expresión diferencial (Manchas cuya proporción es más de 2 veces el volumen entre los tres grupos en al menos uno de los estadios y manchas con un valor de $p < 0.05$ para el test de ANOVA), dentro del área verde se indica el número correspondiente para futuras referencias.

2.2.4 Identificación de proteínas

La identificación de proteínas totales se realizó utilizando geles bidimensionales previamente reportados de referencia, en los cuales se asignaron identidades a las manchas mediante espectrometría de masas. De las proteínas expresadas diferencialmente, se pudieron identificar 14 proteínas (Tabla 2). De estas solamente 30 y 38 son más abundantes en Ama C y el resto está subexpresada respecto a Proesta. En Ama H ninguna de las proteínas identificadas está diferencialmente expresada. De las proteínas de menor abundancia, previamente se describió a beta tubulina como un gen regulado durante el desarrollo de *Leishmania mexicana*, los resultados concuerdan con los previamente publicados donde hay una reducción en la expresión de beta tubulina en ambos grupos Ama C (0.188) y Ama H (0.591). Resulta de interés la disminución de proteínas relacionadas a la traducción como eIF-6 i eIF-3 cuya disminución se ve tanto en Ama C (0.402 Y 0.460) como Ama H (0.552 y 0.520) aunque esta última no supera el punto de corte de $\text{fold} > 2$. Debido a que no se encontraron ninguna diferencia significativa en Ama H no fue posible identificar marcadores de quiescencia utilizando esta aproximación.

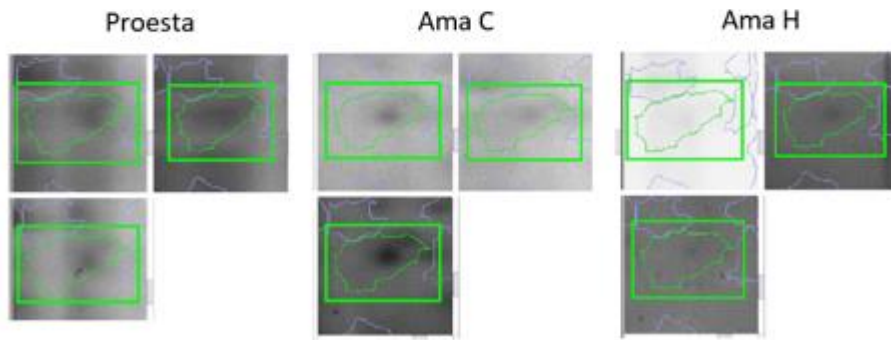
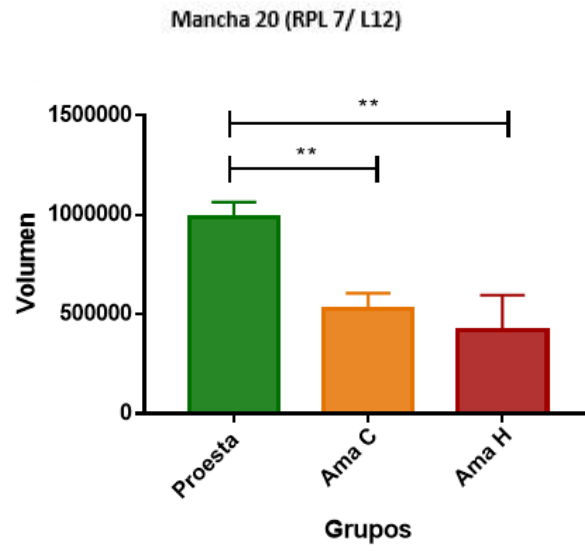
Para la identificación de proteínas ribosomales se comparó contra una base de datos teórica generada a partir de todas las secuencias anotadas de proteínas ribosomales en la base de datos Uniprot en la especie de *Leishmania mexicana*. Esto debido a que es la primera vez que se analiza esta fracción en *Leishmania* y no se cuenta con publicaciones de referencia. Utilizando esta estrategia se pudo identificar 6 proteínas expresadas diferencialmente (Tabla 3). Adicionalmente se incluyó la mancha 187 que tienen un $\text{Fold} > 2$; sin embargo, está ligeramente debajo del nivel de significancia ($p=0.063$).

De las 7 proteínas ribosomales identificadas, en Ama H la mancha 20, 116, y 122 se encuentran expresadas en menor proporción y las manchas 187 y 192 se encuentran sobreexpresadas respecto a Proesta. En Ama N 58, 60 y 122 están subexpresadas y 192 sobreexpresadas. Es notable que a excepción de la mancha 122, las proteínas identificadas siguen la misma tendencia de expresión en amastigotes respecto a Proesta

independientemente de la condición de cultivo. El análisis mediante geles bidimensionales muestra como posibles marcadores de quiescencia a las manchas asignadas a RPL7/L12, RPL2 Y RPS4, ya que estas se encuentran diferencialmente expresadas en el estadio de quiescencia (Ama H) y en una población mixta (Ama C) muestran una tendencia intermedia.

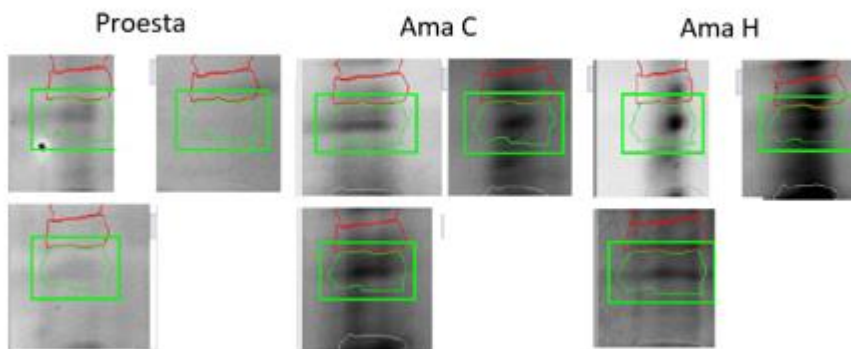
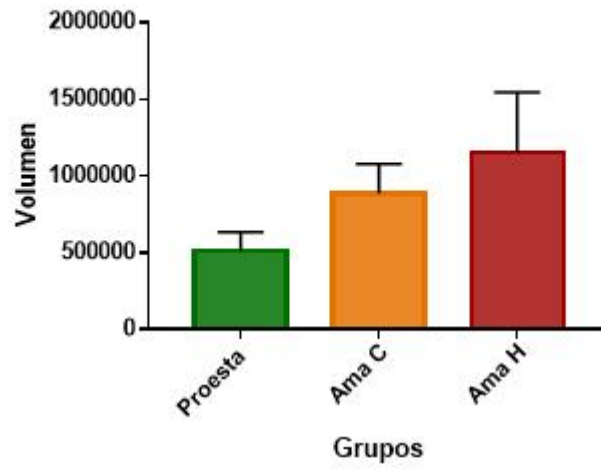
Se muestra la abundancia de los posibles marcadores de quiescencia, expresados en volumen (vol) de las manchas correspondientes (Figura 18). Se muestra que la mancha 20 esta subexpresada (ANOVA $p < 0.05$) en Ama C ($52 \pm 8 \text{ vol} \times 10^4$) y Ama H ($42 \pm 17 \text{ vol} \times 10^4$) respecto a Proesta ($98 \pm 7 \text{ vol} \times 10^4$). En la mancha 187 como se esperaba no hay diferencias estadísticamente significativas; sin embargo parece estar expresada en mayor proporción en Ama H ($115 \pm 39 \text{ vol} \times 10^4$) y Ama C ($89 \pm 19 \text{ vol} \times 10^4$) respecto a Proesta ($51 \pm 12 \text{ vol} \times 10^4$). La mancha 192 sobreexpresada ($p < 0.05$) en Ama H ($79 \pm 25 \text{ vol} \times 10^4$) respecto a Proesta ($28 \pm 10 \text{ vol} \times 10^4$) y no hay diferencias significativas con Ama C ($57 \pm 10 \text{ vol} \times 10^4$).

A



Mancha 187 (RPL 2)

B



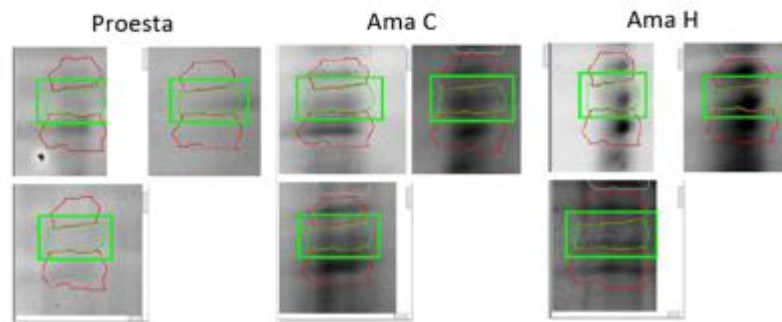
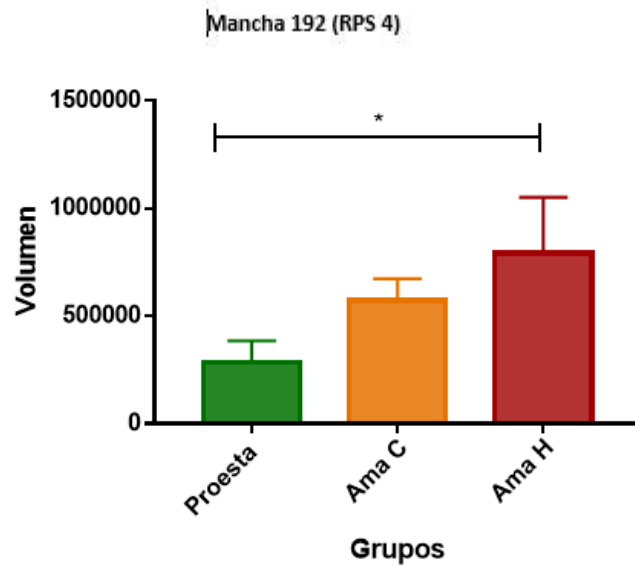
C

Figura 18. Expresión de las proteínas candidatas a marcadores de quiescencia. En las barras se muestra el promedio de la cuantificación normalizada de las manchas candidatas de tres réplicas biológicas y la desviación estándar. Volumen corresponde a la suma de los valores de grises de los píxeles dentro del área delimitada por el contorno verde menos el *background*, los valores de volumen están normalizados por el método radiométrico. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre los grupos evaluados por prueba de comparación múltiple Tukey *($p < 0.05$), **($p < 0.01$). Debajo se muestran las imágenes correspondientes a los valores cuantificados, la proteína interés está delimitada por un contorno verde.

DISCUSIÓN

1. Desarrollo de un modelo *in vitro* de quiescencia

En este trabajo se desarrolló un modelo de quiescencia que permite obtener una población mayoritariamente quiescente. Las condiciones de cultivo con medio M199 al 1% de SFB en hipoxia y con un inóculo inicial de 1.5 millones de parásitos/ ml fueron las mejores condiciones para obtener una población quiescente en base al marcador GFP-RNA 18S, con un 98.88% de células que son GFP negativas. Estos valores superan ampliamente el modelo previo de amastigotes axénicos, MAA 20% SFB en normoxia, el cual presenta 75.27 % de células GFP-. Además, los valores de expresión de GFP-RNA 18S en las condiciones de cultivo M199 al 1% de SFB en hipoxia son similares a los valores reportados en una publicación previa en amastigotes intracelulares de *L. mexicana* 99.49% GFP - (20).

La alta viabilidad 99.385 % de los parásitos en condiciones de bajos nutrientes e hipoxia (M199 1% SFB en hipoxia) indica que el amastigote está adaptado a condiciones de estrés. En cambio, bajo condiciones más nutritivas (MAA 20% SFB) y en normoxia solo un 57.07% de las células son viables. Este es un resultado esperado debido a que, en el hospedero mamífero, el amastigote es sometido a altos niveles de estrés dentro del fagolisosoma del macrófago (63) lo que se sugiere que esta nueva condición de cultivo es más aproximada a lo que ocurre con los amastigotes intracelulares.

La respuesta de quiescencia frente a una limitación de nutrientes ha sido ampliamente descrita en otros organismos modelos de quiescencia como levaduras y parece ser un factor importante en la inducción de quiescencia en *Leishmania*. Debido a que en un medio enriquecido como MAA 20% SFB hay un 75.27 % GFP -, y este porcentaje incrementa en un medio con menos nutrientes como M199 20% SFB y hasta un 97.48% GFP- en M199 1 % SFB. Por lo que evaluar en *Leishmania*, los cambios de algunas de las principales vías de señalización afectadas en levaduras durante la limitación de

nutrientes, como PKA y TOR podrían permitir entender mejor el proceso de quiescencia y establecer similitudes (12).

La condición de hipoxia incrementa el número de células quiescentes y viables en amastigotes de *Leishmania*. En la condición MAA 20% SFB el porcentaje de células GFP- incrementa de 75.27% GFP- a 95.18 % GFP- cuando se cultiva en hipoxia. Y la viabilidad aumenta de 57.07% a 90.40%. En distintos tipos celulares humanos como fibroblastos, células embrionarias, linfocitos, queratinocitos y algunas líneas celulares de cáncer, la hipoxia disminuye la proliferación, mediante factores inducibles por hipoxia (HIF), los cuales son factores de transcripción que modifican la expresión de diversos genes cambiando el metabolismo y reduciendo la tasa de duplicación de las células (64). En *Leishmania* al no existir factores de transcripción identificados, se desconoce cuál es el mecanismo por el cual los amastigotes responden a un evento de hipoxia; sin embargo, los mecanismos de adaptación podrían ser similares. Por lo tanto, se recomienda estudiar la expresión de genes regulados por HIF como supresores de la vía mTOR, y proteínas quinasas de respuesta al estrés (PKR).

Para la identificación de marcadores celulares es necesario obtener una gran cantidad de células por lo que el modelo se llevó a cultivos de mayor volumen. Bajo estas nuevas condiciones, el porcentaje de células GFP- disminuyó ligeramente; sin embargo, la condición de Ama H sigue siendo mejor para producir formas quiescentes (90.13% GFP-) respecto a Ama C (47.15% GFP-). Estos resultados demuestran que el modelo de inducción de quiescencia es robusto y es capaz de inducir quiescencia independientemente del volumen de cultivo que se utilice.

2. Identificación de marcadores a nivel de mRNA

En este trabajo se identificó a PNC y LIT 1-4 como genes de referencia. Estos dos genes permitieron normalizar la expresión de los genes candidatos de quiescencia y pueden ser utilizados en futuros estudios con el nuevo modelo de amastigote quiescente. Resulta interesante que nicotinamidasas (PNC), una enzima esencial para la vía de salvataje de síntesis de NAD⁺ (49), sea un gen de expresión estable porque esto sugiere

que la producción de NAD⁺ es constante a lo largo de la vida del parásito, por lo que estrategias que tengan como diana esta ruta, podrían ser eficaces para el tratamiento de leishmaniasis. Por otro lado, la estabilidad de LIT1-4, un transportador de hierro (Fe⁺²) ubicado en la membrana celular (45), sugiere que el hierro es esencial para ambos estadíos.

Los genes de amastina (Ama 34D y Ama 8A), se sobreexpresaron significativamente en Ama H (p<0.02) en comparación con Proesta, por lo que son genes de interés como marcadores de quiescencia. Las amastinas son glicoproteínas transmembrana ubicadas en la superficie celular de parásitos Tripanosomátidos. Ama 34 D y 8A corresponde a la subfamilia δ amastinas, un grupo diverso de genes presentes únicamente en el género de *Leishmania*. Evolutivamente la diversificación de este subgrupo aparece con la adaptación del parásito a un hospedero vertebrado, lo cual sugiere que este grupo de proteínas desempeñan un rol en la vida intracelular del parásito (65).

El *knockdown* de Ama34D produce una disminución del número de amastigotes intracelulares a las 48 h post-infección, lo que sugiere un papel en la supervivencia a largo plazo del parásito. Esto es importante en quiescencia porque las δ amastinas podrían mantener una infección prolongada (44). Sin embargo, se requiere una mayor cantidad de estudios para saber el rol exacto de las amastinas. Debido a su semejanza estructural con las claudinas y la disminución de puntos de unión entre amastigote y vacuola parasitófora del macrófago cuando se realizó un *knockdown*, se ha especulado que las amastinas pueden actuar como un transductor de señal unido a membrana que se une a ligandos en la interfase huésped-parásito (44). Hipotetizamos que las amastinas podrían sensor su entorno y participar en una red de señales que llevan a una respuesta de quiescencia.

DRBD 3, proteína de unión a RNA, está significativamente menos expresada en Ama H (p<0.03) respecto a Proesta por lo que es un gen candidato como marcador negativo de quiescencia. Este gen codifica para una proteína que se une a un subgrupo específicos de RNA mensajeros y promueve su estabilización. En *Trypanosoma brucei*, algunos

genes de este subgrupo son mayoritariamente expresados en la forma procíclica del parásito (en el insecto); sin embargo, no hay cambios en los niveles de DRBD3 entre estadíos (66). Además, se describió que en condiciones de estrés por inanición DRBD3 es acumulado en gránulos de estrés junto con el mRNA al que se une, para protegerlo de la degradación hasta que las condiciones del ambiente sean propicias, lo cual impediría que cumpla su función de estabilizar mRNA (67). Esto coincide con nuestro modelo, donde también se produce un estrés nutricional. Por lo tanto, es posible que en *Leishmania* la disminución de DRBD3 en el grupo Ama H corresponda a un mecanismo de regulación de la expresión génica, donde la menor cantidad de DRBD3 disminuye la estabilidad de los mRNA y en consecuencia disminuye su expresión.

NAT, se expresa significativamente menos en Ama C ($p < 0.04$) en comparación con Proesta. NAT es un transportador de ácido nicotínico, que es un precursor para la formación de NAD⁺ en el parásito. Este metabolito desempeña un rol central en el metabolismo participando de reacciones oxido- reducción. Debido al gran número de vías en la que participa NAD⁺, no existe una asociación clara con quiescencia; sin embargo, la disminución del transportador NAT, indica que existen alteraciones en el metabolismo del amastigote (68).

PERK, se expresa significativamente menos en Ama C ($p < 0.02$) en comparación con Proesta. Esta proteína es la quinasa de eIF2. La fosforilación de eIF2 alpha inhibe su función, la cual es permitir la unión de las subunidades ribosomales y esto a su vez causa un descenso global en la síntesis de proteínas. En *Leishmania* se reportó que eIF2 alpha está preferentemente fosforilada en el amastigote (69). Por lo tanto, se esperaba que en amastigotes PERK aumentará su expresión, sin embargo, en Ama C está subexpresado. Es posible que PERK desempeñe funciones adicionales no ligadas a la fosforilación de eIF2 alpha.

Los datos de expresión de rRNA 18S mediante el análisis de citometría de flujo, no son congruentes cuando se compara con los resultados obtenidos por RT-qPCR. Aunque en citometría se reportó diferencias entre Proesta y los grupos de amastigotes, mediante

qPCR no se observan diferencias significativas. Estos resultados son consistentes con lo previamente reportado en *L. braziliensis*, donde mediante RT-qPCR no se encuentran diferencias significativas entre promastigotes estacionarios y amastigotes axénicos (16), pero si se observa una disminución significativa mediante citometría de flujo (20).

La incongruencia entre los datos de RT-qPCR y citometría de flujo podría tener dos explicaciones: La primera es que la herramienta de GFP-rRNA 18S no sea la más adecuada para cuantificar la expresión de rRNA 18s debido a que el GFP está unido únicamente al promotor de 2 copias del gen rRNA 18S, y es posible que otras copias del gen estén sometidas a distintos procesos de regulación. La segunda explicación, es que esta diferencia se deba a un proceso de conservación/estabilización de rRNA 18S. Esto debido a que la citometría de flujo permite medir la tasa de transcripción del gen rRNA 18S por la expresión de GFP, mientras que RT-qPCR mide la cantidad de transcritos existentes en el momento del análisis. Por lo tanto, es posible que a pesar de que en Ama H la transcripción de rRNA 18s disminuya, la cantidad total de transcritos se mantenga (o incremente) debido a que existe una acumulación de este transcrito causada por algún mecanismo que prolongue la vida media del transcrito. Esta última estrategia ha sido utilizada en el contexto de quiescencia para preservar componentes del ribosoma en otros organismos, esta estrategia permite generar una reserva de materiales necesarios para sintetizar proteínas en el reingreso a un estado de proliferación (70, 71).

3. Identificación de marcadores a nivel de proteínas

3.1 Proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales muestra que no hay variaciones estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas; sin embargo, previamente se reportó una disminución de la cantidad de proteínas totales en amastigotes axénicos. Además mediante el marcaje de ³⁵S metionina se comprobó que la síntesis *de novo* de proteínas disminuye al inducir la diferenciación a amastigote axénico (69). Esta disminución es consecuente con la inducción de una respuesta

metabólica estricta en *Leishmania mexicana* en donde hay una disminución global de ingreso de aminoácidos y glucosa en el parásito (72).

Por lo que creemos que la ausencia de diferencias en los niveles de proteínas se debe más a una limitación técnica que un evento biológicamente relevante. Las cuantificaciones muestran una gran desviación estándar, esto debido a que los buffers de extracción de proteína para la realización de geles bidimensionales poseen sustancias que interfieren con el proceso de cuantificación. Aunque se utilizó un procedimiento de precipitación para remover los agentes interferentes previo a la cuantificación, la presencia de estos compuestos y el mismo proceso de precipitación disminuye la precisión de los ensayos.

La cuantificación de proteínas de la fracción ribosomal no muestra ninguna diferencia entre los grupos experimentales. Este resultado es inesperado, debido a que se esperaba una disminución en la cantidad de ribosomas como resultado de una baja en la tasa biosintética en los grupos de amastigotes. En *Leishmania* se reportó que el rRNA ribosomal 18S disminuye, así como las proteínas ribosomales RPS15 Y RPL 19 (16). Por lo tanto, se recomienda utilizar métodos más precisos para evaluar la cantidad de ribosomas por célula. Por ejemplo, en *E.coli* se utilizaron imágenes tomográficas utilizando microscopía crioelectrónica, lo cual permite tener una reconstrucción en 3 dimensiones y se pudo realizar un conteo directo de los complejos ribosomales(73). Esta tecnología podría ser utilizada para cuantificar con precisión las estructuras ribosomales formadas, así como identificar posibles variaciones en la estructura del ribosoma.

Los geles bidimensionales de proteínas totales no muestran una tendencia clara de marcadores de quiescencia debido a que no existen proteínas diferencialmente expresadas en Ama H. Sin embargo, se reprodujeron resultados previamente reportados, que muestran la expresión diferencial de proteínas asociadas al cambio de estadio Proesta a Ama C. Este es el caso de la disminución de Beta-tubulina, el aumento en la expresión de Tryparedoxin peroxidasa (42, 74). Además, se encontró que la mancha asignada a HSP 70 disminuye, lo cual es contradictorio con los

resultados previamente reportados donde HSP 70 es una proteína única del estadio de amastigote, es probable que esta discrepancia se deba a una falsa asignación.

Resultan de interés la disminución de eIF-3 y eIF-6 tanto en Ama C como en Ama H, ya que estas proteínas son necesarias para el inicio de la traducción. Aunque aparentemente no existe diferencias en la expresión entre Ama H y Proesta, el punto de corte (fold <0.5) se encuentra justo por encima, con eIF-3 con 0.520 y eIF6 0.552 respecto a Proesta. Es posible que estas proteínas desempeñen un rol en el ingreso al estado de quiescencia, ya que la disminución de la expresión de estos factores de iniciación de traducción es coherente con una disminución en la tasa de biosíntesis de proteínas en el amastigote.

3.2 Proteínas ribosomales

Históricamente se concibió el ribosoma como un ente pasivo que solo se encargaba de la síntesis de proteínas; sin embargo, diversas evidencias sugieren, que los componentes tienen un rol más activo en el control de la expresión genética. Esta capacidad de regulación es evidente en organismos modelo como: *Arabidopsis thaliana* (75), *Dictyostelium discoideum* (76), humanos (77) y ratones (78), donde la expresión diferencial de proteínas ribosomales está asociada con distintos estadios de desarrollo. La evidencia directa de que el cambio en la composición del ribosoma tiene un efecto en los mensajeros que son traducidos fue probado en ratones, donde al alterar la composición del ribosoma, mediante knock-down de algunas proteínas ribosomales, se alteraban también los mensajeros asociados al ribosoma. Por ejemplo, al disminuir la expresión de rpL10A, se aumenta la asociación de mensajeros involucrados en la organización de la matriz extracelular, en el desarrollo de vasos sanguíneos, etc., y disminuye la asociación de mensajeros relacionados al metabolismo de vitaminas solubles y el desarrollo de gónadas femeninas.

Además, en levaduras, organismo modelo de quiescencia, se asoció la expresión diferencial de proteínas ribosomales parálogas (rpL32-1/rpL32-2) al paso de un estadio

de proliferación a quiescencia. Se observó que rpL32-2 está expresada en mayor proporción en la fase logarítmica, mientras que rpL32-1 se expresa mayoritariamente en la fase estacionaria, donde la limitación de nutrientes promueve el estado de quiescencia. Al sobreexpresar rpL32-1 se inhibe la división celular, mientras que la sobreexpresión de rpL32-2 la promueve. Además, el análisis transcriptómico muestra que la sobreexpresión de los parálogos está asociada con la expresión de distintos subgrupos de genes relacionados con la división celular (79). Por lo que hipotetizamos que pueden ocurrir cambios similares en la composición de las proteínas del ribosoma en *Leishmania* en el paso de proliferación a quiescencia.

Es importante señalar que la comparación de geles bidimensionales permite comparar la abundancia relativa de proteínas pertenecientes a la fracción ribosomal, más no comparar la abundancia de ribosomas entre estadios. Esto debido a que la técnica de geles bidimensionales compara una cantidad de proteínas fija entre estadios, independientemente de las diferencias en la cantidad de ribosomas entre estadios.

En el presente estudio se encontró que 16 de las 220 manchas correspondientes a la fracción ribosomal se encuentran diferencialmente expresadas durante distintas fases del desarrollo en *Leishmania*. Estos resultados prueban que, al igual que en otros organismos, *Leishmania mexicana* posee ribosomas con composiciones heterogéneas. Sin embargo, futuros ensayos funcionales son necesarios para comprobar si estas diferencias tienen un efecto biológico en el estado de quiescencia.

Utilizando un método bioinformático se pudieron identificar 7 de estas proteínas ribosomales diferencialmente expresadas. Es necesario resaltar que para confirmar la identidad de estas proteínas es necesario verificar los resultados mediante espectrometría de masas. En este estudio no fue posible realizar estos ensayos debido a su alto costo y la limitación tecnológica. Sin embargo, el análisis comparativo de los patrones de expresión es una primera aproximación en la descripción de la heterogeneidad de la composición del ribosoma amastigotes quiescentes.

Es común encontrar en reportes de geles bidimensionales, manchas en distintas posiciones identificadas con una misma proteína, debido a que las proteínas pueden presentar modificaciones postraduccionales que modifican tanto el peso molecular como punto isoeléctrico, adicionalmente pueden presentarse variaciones de la proteína por splicing alternativo, o cortes en la secuencia de la proteína. Por ello la asignación de identidades debe ser verificada, ya que estas modificaciones, así como proteínas con similares puntos isoeléctricos y pesos moleculares pueden generar falsas asignaciones. Por lo tanto, las asignaciones realizadas en este trabajo son especulativas y necesitan comprobaciones adicionales, ya sea por espectrometría de masas o comprobar la diferencia de expresión por un análisis más directo como *western blot*.

El análisis de geles bidimensionales de proteínas ribosomales mostro que la mancha asignada a la proteína ribosomal l7/l12-like está subexpresada en Ama H. En bacterias, la presencia de esta proteína es necesaria para la actividad de GTPasa de factores de traducción: EF-G, RF3 Y IF2. Esta actividad de GTPasa es necesaria para el inicio de la traducción, elongación y terminación (80). En *E. coli* se reportó que existen de 4 a 6 copias de esta proteína en un ribosoma en forma de dímeros. Cuando un solo dímero está unido al ribosoma, la tasa de crecimiento disminuye, además en ensayos de cinética de traducción *in vitro* los ribosomas con solo un dímero de L7/L12 tiene una tasa de síntesis mucho más lenta que cuando se unen más dímeros (81). Por lo tanto, La disminución de la expresión de esta proteína es consistente con la disminución de la síntesis global de proteínas en el estado de amastigote y plantea la posibilidad de que células quiescentes controlen los niveles de esta proteína para regular la tasa de síntesis de proteínas.

Se encontró que las proteínas ribosomales RPL 2 Y RPS4 están sobreexpresadas en Ama H. La sobreexpresión de proteínas ribosomales en el estadio de amastigote es inesperado, debido a que se reportó que los ribosomas y la tasa de síntesis de proteínas disminuyen en el estadio de amastigote, por lo que resulta contradictorio gastar energía en un componente que sirve para sintetizar proteínas, especialmente en un contexto de escasez de nutrientes. Sin embargo, la hipótesis de un ribosoma con

capacidad selectiva para traducir un subgrupo de mensajeros dependiendo de su composición podría explicar este fenómeno. En ausencia de un control de la expresión génica a nivel transcripcional en *Leishmania*, un mecanismo de regulación a nivel traduccional, como el del ribosoma selectivo, podría desempeñar un rol de gran importancia para la expresión diferencial de genes que garanticen la adaptación del parásito a condiciones de estrés como hipoxia y limitación de nutrientes.

La proteína ribosomal L2, una de las proteínas sobreexpresadas en Ama H, puede desempeñar funciones extra-ribosomales ligadas a la regulación de la transcripción. Su función canónica como parte del ribosoma es permitir la asociación de las subunidades 30S y 50S, además está asociada en la unión del tRNA con los sitios P Y A. (82). En *E. coli*, se demostró que además de su función en el ensamblaje del ribosoma, L2 puede desempeñar una función de modulación de la transcripción, interactuando con la subunidad alfa de RNA polimerasa, esta interacción promueve la expresión de genes en presencia de un promotor específico. (83)

La proteína ribosomal S4, sobreexpresada en Ama H, se ha descrito como tejido específico en el humano. Canónicamente está ubicada en la interfase, entre las subunidades y es necesario para el correcto plegamiento de la subunidad menor. Se ha reportado que los parálogos de esta proteína son altamente específicos dependiendo del tejido, en el humano la el parálogo Yq11.223, codificado en el cromosoma Y, el cual es expresado únicamente en testículos y próstata, y sobreexpresado durante la espermatogénesis (84). Esta capacidad de ser expresada selectivamente sugiere un rol activo para la especialización de un tipo celular.

En las proteínas ribosomal L2 Y S4 se describió posibles formas de regulación de la expresión génica en otros organismos, lo cual sugiere que en *Leishmania* podría ocurrir un mecanismo similar. Esta regulación podría explicar la sobreexpresión de estas proteínas ribosomales en una célula que tiene una baja tasa biosintética, el gasto energético necesarios para producir estas proteínas en mayor abundancia serían justificadas si estas permiten regular la expresión de genes necesarios para entrar o mantenerse a un estado quiescente. Para comprobar esta hipótesis, primero es

necesario confirmar la identidad de estas proteínas y posteriormente realizar ensayos funcionales en *Leishmania*.

CONCLUSIONES

En este trabajo se presenta por primera vez un modelo *in vitro* en condiciones de hipoxia con una población mayoritaria de células quiescentes, que es replicable y escalable para cultivos celulares con grandes volúmenes. Este modelo constituye una herramienta útil para la caracterización del estado quiescente en amastigotes ya que permite discernir los cambios asociados a quiescencia de los cambios relacionados al cambio de estadio, al utilizar un grupo intermedio, compuesto por amastigotes, pero heterogéneo para quiescencia. Este nuevo modelo permitirá realizar ensayos bioquímicos, proteómicos y de expresión de genes que requieran grandes cantidades de células.

Con el análisis de marcadores de quiescencia a nivel de mRNA se obtuvieron tres candidatos: Ama8A, Ama34D y DRBD3. Las deltas amastinas (Ama 8A y Ama34D) son los candidatos más interesantes al ser marcadores positivos de quiescencia. Junto con el marcador negativo de 18s rRNA podrían conformar un sistema eficaz para el estudio del amastigote quiescente. Además, surgen nuevas interrogantes sobre el comportamiento del resto de genes del subgrupo de deltas amastinas, ¿Es posible que todo el subgrupo de delta amastinas se sobreexpresen mayoritariamente en condiciones de quiescencia? y cuál es el rol que podría desempeñar estas amastinas en una célula quiescente.

A nivel de proteínas mediante una aproximación bioinformática se proponen 3 marcadores candidatos de quiescencia RPL7/L12, RPL2 y RPS4. Sin embargo, al no confirmar su identidad por espectrometría de masas se propone evaluar la expresión de estos candidatos mediante *western blot* para confirmar la expresión diferencial en los grupos evaluados. Resulta de interés el comportamiento de RPL7/L12, ya que al igual que en bacterias los niveles de esta proteína podrían actuar como un mecanismo

general para regular la capacidad de síntesis de proteínas del ribosoma, por lo que podría ser una pieza clave para la adaptación del parásito al estado quiescente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J and Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017; 6 (F1000 Faculty Rev):750.
2. Ministerio de Salud del Perú. Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de las Leishmaniasis en el Perú. Lima: Dirección General de Salud de las Personas. Dirección del Programa de Control de Enfermedades Transmisibles – Control de Malaria y OEM. 1995.
3. Centro Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades. Casos de leishmaniosis Perú 2000-2021. 2021. Recuperado de: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2021/SE11>
4. Scott P, Novais FO. Cutaneous *leishmaniasis*: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep 18;16(9):581–92.
5. Dowlati, Y. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. 1996; 14(5), 425–431. doi:10.1016/0738-081x(96)00058-2
6. Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007; 7(9), 581–596. doi:10.1016/s1473-3099(07)70209-8
7. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*. 2005 Apr;169(4):1807–14.
8. Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: Leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol*. 2008;10(6):1221–34.
9. Mendonça MG, de Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of Leishmania Parasites in Scars after Clinical Cure of American.

- Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? *J Infect Dis* . 2004;189(6):1018–23
10. Saravia NG, Segura I, Labrada LA, Weigle K, Giannini SH, Pacheco R, et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection-reactivation or reinfection? *Lancet*. 1990.
 11. Mandell MA, Beverley SM. Continual renewal and replication of persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(5):E801–10.
 12. De Virgilio C. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):306–39
 13. Gengenbacher M, Kaufmann SHE. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. *FEMS Microbiology Reviews*. (2012)514–532.
 14. Mikolajczak SA, Vaughan AM, Kangwanrangsan N, Roobsoong W, Fishbaugher M, Yimamnuaychok N, et al. *Plasmodium vivax* liver stage development and hypnozoite persistence in human liver-chimeric mice. *Cell Host Microbe*. 2015;17(4): 526–535.
 15. Kloehn J, Saunders EC, O’Callaghan S, Dagley MJ, McConville MJ. Characterization of Metabolically Quiescent *Leishmania* Parasites in Murine Lesions Using Heavy Water Labeling. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):1–19.
 16. Jara M, Berg M, Caljon G, De Muylder G, Cuypers B, Castillo D, et al. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. *PLoS One*. 2017;12(7):1–22.
 17. Honeyborne, I. et al. Profiling persistent tubercule bacilli from patient sputa during therapy predicts early drug efficacy. *BMC Med* 14, 68 (2016)
 18. Shimanuki, M. et al. Two-step, extensive alterations in the transcriptome from G0 arrest to cell division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 12, 677–692 (2007).

19. Pereira, S. F., Gonzalez, R. L. Jr. & Dworkin, J. Protein synthesis during cellular quiescence is inhibited by phosphorylation of a translational elongation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E3274–3281 (2015).
20. Jara, M., Maes, I., Imamura, H. et al. Tracking of quiescence in *Leishmania* by quantifying the expression of GFP in the ribosomal DNA locus. *Sci Rep* 9, 18951 (2019).
21. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:374-389
22. Teixeira M, De Jesus Santos R, Sampaio R, Pontes-de-Carvalho L, Dos-Santos WL. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 2002;88(11).
23. Mitra M, Ho LD, Collier HA. Un modelo in vitro de quiescencia celular en fibroblastos dérmicos humanos primarios. *Métodos Mol Biol.* 2018; 1686: 27-47. doi: 10.1007 / 978-1-4939-7371-2_2
24. Leistikow RL, Morton RA, Bartek IL, Frimpong I, Wagner K, Voskuil MI. The *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *J Bacteriol.* 2010 Mar;192(6):1662-70. doi: 10.1128/JB.00926-09. Epub 2009 Dec 18. PMID: 20023019; PMCID: PMC2832541.
25. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;181(2):61–72.
26. Michaeli S. Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology.* 2011; 6(4).
27. Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1077–86.
28. Ling D, Salvaterra PM. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS One.* 2011 Mar 15; 6(3):e17762.

29. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006 Aug 9;1(3):1559–82.
30. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006 Oct 6;7:33.
31. Rebouças E de L, Costa JJ do N, Passos MJ, Passos JR de S, Hurk R van den, Silva JRV. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2013 Feb;56(1):143–54.
32. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38:D457-62.
33. Antonia AL, Wang L, Ko DC. A Real Time PCR Assay for Quantification of Parasite Burden in Murine Models of Leishmaniasis. *bioRxiv.* 2018 May 2
34. Ouakad M, Bahi-Jaber N, Chenik M, Dellagi K, Louzir H. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania major* developmental stages. *Parasitol Res.* 2007 Jul 23;101(2):473–7.
35. Price HP, Menon MR, Panethymitaki C, Goulding D, Mckean PG, Smith DF. Myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferase: an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. Vol. 17. *JBC Papers in Press*; 2002.
36. Mane VP, Heuer MA, Hillyer P, Navarro MB, Rabin RL. Systematic Method for Determining an Ideal Housekeeping Gene for Real-Time PCR Analysis. *J Biomol Tech.* 2008;19(5):342.
37. Aduai V, Castillo D, Zimic M, Gutierrez A, Decuypere S, Vanaerschot M, et al. Comparative Gene Expression Analysis throughout the Life Cycle of *Leishmania braziliensis*: Diversity of Expression Profiles among Clinical Isolates. Ghedin E, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 May 10, 5(5):e1021.
38. Nguyen TN, Schimanski B, Günzl A. Active RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei* Harbors a Novel Subunit Essential for Transcription. *Mol Cell Biol.* 2007;27(17).

39. Brandenburg J, Schimanski B, Nogoceke E, Nguyen TN, Padovan JC, Chait BT, et al. Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. *EMBO J.* 2007;26(23).
40. Cloutier S, Laverdière M, Chou MN, Boilard N, Chow C, Papadopoulou B. Translational control through eIF2 α phosphorylation during the *Leishmania* differentiation process. *PLoS One.* 2012;7(5).
41. Chow C, Cloutier S, Dumas C, Chou MN, Papadopoulou B. Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2 α kinase-dependent eIF2 α phosphorylation. *Cell Microbiol.* 2011;13(7).
42. Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;136(1).
43. Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(2).
44. De Paiva RMC, Grazielle-Silva V, Cardoso MS, Nakagaki BN, Mendonça-Neto RP, Canavaci AMC, et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. *PLoS Pathog.* 2015; 11(12): e1005296.
doi:10.1371/journal.ppat.1005296
45. Zaidi A, Singh KP, Ali V. *Leishmania* and its quest for iron: An update and overview. Vol. 211, *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2017. 15–25.
doi:10.1016/j.molbiopara.2016.12.004
46. Cabello-Donayre M, Orrego LM, Herráez E, Vargas P, Martínez-García M, Campos-Salinas J, et al. *Leishmania* heme uptake involves LmFLVCRb, a novel porphyrin transporter essential for the parasite. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(9).
47. Laranjeira-Silva MF, Hamza I, Pérez-Victoria JM. Iron and Heme Metabolism at the *Leishmania*–Host Interface. *Trends in Parasitology.* 2020.

48. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.* 2014 Aug;2(4):MGM2-0023-2013
49. Gazanion E, Garcia D, Silvestre R, Gérard C, Guichou JF, Labesse G, et al. The Leishmania nicotinamidase is essential for NAD + production and parasite proliferation. *Mol Microbiol.* 2011; 82(1).
50. Luis Ernesto Contreras Rodríguez. Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de Leishmania braziliensis. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá, Colombia. 2016.
51. O'Farrell, P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 1975; 250(10), 4007–4021. doi:10.1016/s0021-9258(19)41496-8
52. Huber, L. A. Organelle Proteomics: Implications for Subcellular Fractionation in Proteomics. *Circulation Research.* 2003; 92(9), 962–968. doi:10.1161/01.res.0000071748.483
53. Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, et al. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell.* 2017;67(1):71–83.e7.
54. Moreira, D., Santarém, N., Loureiro, I., Tavares, J., Silva, A. M., Amorim, et al. Impact of Continuous Axenic Cultivation in Leishmania infantum Virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2019; 6(1), e1469. doi:10.1371/journal.pntd.0001469
55. Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.* 2012 Jan;33(2):366–9.
56. PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide Caister Academic Press 2011, ISBN 978-1-904455-72-1.
57. Mehta, P., Woo, P., Venkataraman, K., & Karzai, A. W. Ribosome Purification Approaches for Studying Interactions of Regulatory Proteins and RNAs with the Ribosome. *Bacterial Regulatory RNA.* 2012; 273–289. doi:10.1007/978-1-61779-949-5_18

58. Horgan, G. W. Sample Size and Replication in 2D Gel Electrophoresis Studies. *Journal of Proteome Research*. 2007; 6(7), 2884–2887. doi:10.1021/pr070114a
59. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:RESEARCH0034
60. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8:R19.
61. Terzi, M. Y., Izmirli, M., & Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular Biology Reports*. 2016; 43(11), 1213–1220. doi:10.1007/s11033-016-4065-0
62. Pan, X., Whitten, D. A., Wilkerson, C. G., & Pestka, J. J. Dynamic Changes in Ribosome-Associated Proteome and Phosphoproteome During Deoxynivalenol-Induced Translation Inhibition and Ribotoxic Stress. *Toxicological Sciences*. 2013;138(1), 217–233. doi:10.1093/toxsci/kft270
63. McConville MJ, Saunders EC, Kloehn J, Dagley MJ. Leishmania Carbon Metabolism in the Macrophage Phagolysosome- Feast or Famine? *F1000Res*. 2015; 4:938. doi:10.12688/f1000research.6724.1
64. Ivanova, I. G., Park, C. V., & Kenneth, N. S. Translating the Hypoxic Response—the Role of HIF Protein Translation in the Cellular Response to Low Oxygen. *Cells*. 2019; 8(2), 114. doi:10.3390/cells8020114
65. Jackson, A. P. The Evolution of Amastin Surface Glycoproteins in Trypanosomatid Parasites. *Molecular Biology and Evolution*. 2009; 27(1), 33–45. doi:10.1093/molbev/msp214
66. Estévez, A. M. The RNA-binding protein Tb DRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36(14), 4573–4586. doi:10.1093/nar/gkn406

67. Fernández-Moya, S. M., García-Pérez, A., Kramer, S., Carrington, M., & Estévez, A. M. Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*. 2012; 7(11), e48870.
doi:10.1371/journal.pone.0048870
68. Amjad, S., Nisar, S., Bhat, A. A., Shah, A. R., Frenneaux, M. P., Fakhro, K., ... Bagga, P. (2021). Role of NAD⁺ in regulating cellular and metabolic signaling pathways. *Molecular Metabolism*, 49, 101195. doi:10.1016/j.molmet.2021.101195
69. Cloutier, S., Laverdière, M., Chou, M.-N., Boilard, N., Chow, C., & Papadopoulou, B. Translational Control through eIF2alpha Phosphorylation during the *Leishmania* Differentiation Process. *PLoS ONE*. 2012; 7(5), e35085.
doi:10.1371/journal.pone.0035085
70. Trauner, A., Loughheed, K. E. A., Bennett, M. H., Hingley-Wilson, S. M., & Williams, H. D. The Dormancy Regulator DosR Controls Ribosome Stability in Hypoxic *Mycobacteria*. 2012. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 24053–24063.
doi:10.1074/jbc.m112.364851
71. Trösch, R., & Willmund, F. The conserved theme of ribosome hibernation: from bacteria to chloroplasts of plants. 2018. *Biological Chemistry*, 0(0).
doi:10.1515/hsz-2018-0436
72. Saunders, E. C., Ng, W. W., Kloehn, J., Chambers, J. M., Ng, M., & McConville, M. J. Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of *Leishmania mexicana* Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism. *PLoS Pathogens*. 2014; 10(1), e1003888. doi:10.1371/journal.ppat.1003888
73. Ortiz, J. O., Förster, F., Kürner, J., Linaroudis, A. A., & Baumeister, W. Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition. *Journal of Structural Biology*. 2006; 156(2), 334–341. doi:10.1016/j.jsb.2006.04.014
74. Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt L, Grimaldi G Jr, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass

- spectrometry. *Mol Biochem Parasitol.* 2007 Jul;154(1):6-21. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.03.013. Epub 2007 Mar 30. PMID: 17499861.
75. D. Weijers, M. Franke-van Dijk, R.J. Vencken, A. Quint, P. Hooykaas, R. Offringa. An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development*, 2001 Nov;128(21):4289-99. PMID: 11684664.
76. Ramagopalt S, Roche HLE. Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology.* 1981;78(5) 3083-3087.
77. Lopes AM, Miguel RN, Sargent CA, Ellis PJ, Amorim A, Affara NA. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein an is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC Mol Biol.* 2010;11:33.
78. Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, et al. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell.*2011;145(3): 383–397.
79. Sun L, Yang X, Chen F, Li R, Li X, Liu Z, et al. Paralogous Ribosomal Protein L32- and L32-2 in Fission Yeast May Function Distinctively in Cellular Proliferation and Quiescence by Changing the Ratio of Rpl32 Paralogs. *PLoS One.* 2013;8(4)1-11.
80. Carlson, M. A., Haddad, B. G., Weis, A. J., Blackwood, C. S., Shelton, C. D., Wuerth, et al. Ribosomal protein L7/L12 is required for GTPase translation factors EF-G, RF3, and IF2 to bind in their GTP state to 70S ribosomes. *The FEBS Journal.* 2017; 284(11), 1631–1643. doi:10.1111/febs.14067
81. Mandava, C. S., Peisker, K., Ederth, J., Kumar, R., Ge, X., Szaflarski, W., & Sanyal, S. Bacterial ribosome requires multiple L12 dimers for efficient initiation and elongation of protein synthesis involving IF2 and EF-G. *Nucleic Acids Research.* 2011; 40(5), 2054–2064. doi:10.1093/nar/gkr1031
82. Diedrich, G., Spahn, C. M. T., Stelzl, U., Schäfer, M. A., Wooten, T., Bochkariov, D. E., ... Nierhaus, K. H. Ribosomal protein L2 is involved in the association of the

- ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *The EMBO Journal*. 2000; 19(19), 5241–5250. doi:10.1093/emboj/19.19.5241
83. Rippa, V., Cirulli, C., Di Palo, B., Doti, N., Amoresano, A., & Duilio, A. The Ribosomal Protein L2 Interacts with the RNA Polymerase Subunit and Acts as a Transcription Modulator in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2010; 192(7), 1882–1889. doi:10.1128/jb.01503-09
84. Lopes, A. M., Miguel, R. N., Sargent, C. A., Ellis, P. J., Amorim, A., & Affara, N. A. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC Molecular Biology*. 2010; 11(1), 33. doi:10.1186/1471-2199-11-33

ANEXOS

Tabla 1. Secuencia de primers de los genes evaluados en *L.mexicana*

Genes	Producto	Tri Tryp DB ID	Primer forward/Reverse	Tamaño del producto (pb)	Concentración final del primer (nM)
DRBD3	Proteína de unión a ARN	LmxM.04.1170	5' GTGACACAGCTTAGCATTCA 3' 5' TGCTAAAACGAATGTACACG 3'	190	400
NMT	N-miristoil transferasa	LmxM.31.0080	5' AGTATGCCTTTGCATCAACT 3' 5' GATACGCCAGTTGTAGAAG 3'	169	300
HP	Proteína hipotética	LmxM.33.0770	5' GTACAATGGGAAGCTGTGAG 3' 5' GAGCCAGTTGTAGACGAAAGT 3'	231	300
ACR2 ^a	As/Sb reductasa	LmxM.31.2740	5' AAGGTCGCGGTGATAGACTG 3' 5' GGCGACCTCTTCTCTCTT 3'	144	300
GSH2 ^a	Glutation sintasa	LmxM.14.0910	5' GCGGCACTTTCCAAGTATGT 3' 5' GGGGCTGATGAATGACAAGT 3'	94	300
PAP14 ^a	Polinucleotido adeniltransferasa	LmxM.14.1180	5' GTC AACGTGGT GCGAGTATG 3' 5' TGCA CGTTGTATCGGTAGGA 3'	122	400
LFR1	Reductasa de hierro férrico	LmxM.29.1610	5' AATTTGGTCTACTCGCTCTG 3' 5' ACATCTTTGGTGATGTCTC 3'	156	300
LIT1-4	Transportador de Hierro/Zinc	LmxM.30.3060 LmxM.30.3070	5' CACTGTTGTTGCTGTACTGG 3' 5' GCTACAAACAGGATGACCTT 3'	153	300
LHR1	Proteína relacionada al transporte de hierro	LmxM.24.2230	5' GCGCTCGTACTTTTGTGGAA 3' 5' GTCCTCTCGAGTGTGTCTC 3'	106	300
FLVCRb	Transportador de porfirina	LmxM.17.1430	5' TACCGTCCCTCGTTTACGTC 3' 5' CGTCAGGAGCACAAAGTTCA 3'	96	400
LIR1	Regulador de hierro 1	LmxM.21.1580	5' TCTCCTTCAACCTTGGGATG 3' 5' AATAATCGGCGTCTCACAC 3'	113	400
LMIT1 ^b	Mitoferrina	FR799561.1 (región: 25128-27617)	5' GAACGGCGTAGATACCGTGT 3' 5' GGTGCGTACTTCAGCGTGTA 3'	120	400
RPA31	Subunidad de ARN pol I	LmxM.03.0580	5' GAAGAGCTGGACCCTCAATG 3' 5' GAGGAGCACGTCGGTAATCT 3'	106	400
CITFA2	Factor de iniciación de transcripción de ARNr	LmxM.34.3150	5' CCTGTACACAAAGTGTCTG 3' 5' TTGATCCCCATTCTTATCTG 3'	159	300

elf2-alpha	Factor eucariótico de iniciación de transcripción 2, subunidad alfa	LmxM.03.0980	5' GTTGAGATTACCTGCTTTGC 3' 5' CTCCTTCATTGCTGAATAC 3'	186	300
PERK	Quinasa de elf2alpha	LmxM.33.2150	5' TACGTGACGACCTCAGTACA 3' 5' GCAGTAGAGGAAGAAGCTCA 3'	178	300
RK39-1	Kinesina	LmxM.14.1100	5' GACCAAGCTACAGGTCTCTG 3' 5' CTCCATGGCACTTTTTATTTC 3'	193	300
RK39-2	Kinesina	LmxM.14.1120	5' GAACTTTCTCGACGACTACG 3' 5' CTTAAGGTCCGTCAACTGAG 3'	163	300
Ama 34D	Amastina delta	LmxM.33.0500	5' TTGCCATCCTATCCATATTC 3' 5' GGTAGACGTACACCACGAGT 3'	156	300
Ama 8A	Amastina delta	LmxM.33.0960	5' CCAACACCTCGTACTATTCC 3' 5' CACGTAGTAGGTCAACACCA 3'	245	300
CPB2.8	Proteasa like catepsina L	LmxM.08.1030a	5' TTCGATAAGAACTGCACTCA 3' 5' TACCATCAGGAGTCTCGAAG 3'	178	300
ORF F	Open Reading Frame F	LmxM.34.5140	5' CGTTGATATCTGCGAGAAC 3' 5' GAACACAACATCCACAGAGTT 3'	196	300
ORF G	Transportador de bipterina	LmxM.34.5150	5' CACTGTTTCATGAGCAACATC 3' 5' CCAAAGTGAGTCAGTCCATT 3'	178	300
PNC	nicotinamidasa	LmxM.01.0450	5' CCATGCAGGTCGACTTCTTGG 3' 5' ATGATTCTCCGGATGCCAGT 3'	142	400
NDT	transportador de NAD+	LmxM.34.3330	5' TGTCGTTTTCGCACAGCATTG 3' 5' OCTCCAGCGTTTTCATCGAGT 3'	95	400
NAT	Transportador de ácido nicotínico	LmxM.24.0680	5' TTGGCCATCGGTATCAGCTC 3' 5' GAAACCGGCTGCAACAAACT 3'	132	400
18S ^{b,c}	ARN ribosomal 18S	GQ332360.1	5' CATCAAAGTGTGCCGATTACGTCC 3' 5' GAACTTTGGGCGGATAAAACACC 3'	114	400

^a Primers reportados anteriormente (Adaui et al. 2010)

^b ID de Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

^c Primers reportados anteriormente (Jara et al. 2017)

Tabla 1. Secuencia de primers de los genes evaluados en *L. mexicana*. Secuencia de primers, ID en tritrypDB y Genbank y condiciones de qPCR de los genes evaluados en *L. mexicana*

Tabla. Identificación de proteínas totales expresadas diferencialmente

Mancha	Nombre	Código	PI /MW (Ex)	PI/MW (Te)	Codigo/NCBI (Re)	Doble emparejamiento	Ama C	Ama H
21	Eukaryotic Initiation Factor 5a	IF5A_LEIMU	5.08/20	4.83/17.82	J91/LbrM25.0730	Eukaryotic translation initiation factor 1A	↓ 0.388	1.046
30	Hypothetical protein, conserved	E9APL2_LEIMU	4.63/22	4.81/22.32	J77/LbrM14.0190	No	↑ 2.387	1.414
38	Tryparedoxin peroxidase 2	E9AQA6_LEIMU	6.24/23	6.31/22.21	J127/LbrM15.0720	GTP-binding protein, putative/Prefoldin-like protein	↑ 2.027	1.05
74	Eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6), putative	E9ASK9_LEIMU	5.30/28	5.05/27.12	J74/LbrM35.0920	No	↓ 0.402	0.552
82	Hypothetical protein, conserved	E9AXT3_LEIMU	5.62/29	5.63/30.34	J68/LbrM25.2070	No	↓ 0.49	1.518
98	Activated protein kinase C receptor (LACK)	E8NHN2_LEIMU	5.89/34	6.05/34.40	J53/LbrM28.2410	No	↓ 0.447	0.507
125	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative	E9B052_LEIMU	6.20/45	5.01/46.37	J33/brazil1604d10.q1k*	No	↓ 0.46	0.52
137	S-Adenosylmethionine synthetase	E9B1C6_LEIMU	5.35/50	5.41/43.13	J22/LbrM30.3250	No	↓ 0.243	0.571
139	Beta tubulin	E9AVI3_LEIMU	5.22/50	4.74/49.79	J29/LbrM33.0880	No	↓ 0.188	0.591
140	Beta tubulin	E9AVI3_LEIMU	5.00/51	4.74/49.79	J29/LbrM33.0880	No	↓ 0.293	0.59
143	Hypothetical protein, conserved/	E9B2K8_LEIMU	7.39/56	6.92/56.74	J66/LbrM32.0790	No	↓ 0.349	0.812
151	PGAM 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase	E9AUA1_LEIMU	5.64/62	5.37/60.81	J10/LbrM35.6390	No	↓ 0.478	0.755
157	Glucose-regulated protein 78	E9AZT9_LEIMU	5.66/67	5.18/71.79	J2/LbrM28.1120	No	↓ 0.336	0.777
163	Putative Heat shock 70 kDa protein	E9B099_LEIMU	5.93/72	5.34/71.2	J4/LbrM26.0990	No	↓ 0.274	0.786

Tabla 2 Identificación de proteínas totales expresadas diferencialmente. Se muestran las proteínas que lograron ser identificadas, se indica el nombre correspondiente a cada muestra, junto al código asignado en la base de datos UniProt, se muestra el punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (MW), para las condiciones experimentales (Ex), aquellas calculadas en los geles bidimensionales en este estudio, y los valores teóricos reportados calculados a partir de UniProt (Te) utilizando la herramienta bioinformática ExPASy, el código y la referencia de la proteína en la base de datos del NCBI corresponde a las identidades asignadas a estas proteínas en una publicación previa(73). La columna de doble emparejamiento indica si existen proteínas reportadas que coinciden en el rango de comparación de los valores experimentales. Ama C corresponde a la expresión relativa de AmaC/ Proesta y Ama H a la expresión relativa de Ama H/ Proesta.*

Secuencia disponible en BRAZIL.reads GeneDB database.

Tabla. Identificación de proteínas ribosomales expresadas diferencialmente

Mancha	Nombre	Código	PI /MW (Ex)	PI/MW (Te)	Doble emparejamiento	Ama C	Ama H
20	Ribosomal protein l7/l12-like protein	E9B284_LEIMU	8.25/19	8.33/21.85	No	0.534	↓ 0.427
58	40S ribosomal protein SA	E9ATT5_LEIMU	7.51/24	7.66/27.57	No	↓ 0.498	0.508
60	Ribosomal protein l7/l12-like protein	E9B284_LEIMU	7.99/24	8.33/21.85	40S ribosomal protein SA	↓ 0.393	0.506
116	40S ribosomal protein S2	E9ARV7_LEIMU	8.86/30	9.28/32.74	No	1.660	↓ 0.441
122	40S ribosomal protein SA	E9ATT5_LEIMU	7.94/30	7.66/27.57	No	↓ 0.480	↓ 0.418
187	Putative ribosomal protein L2	E9AMA7_LEIMU	9.75/46	9.89/43.23	Putative 40S ribosomal protein S4	1.731	↑ 2.253
192	Putative 40S ribosomal protein S4	E9APE6_LEIMU	9.76/51	9.97/47.30	No	↑ 2.03	↑ 2.807

Tabla 3. Identificación de proteínas ribosomales expresadas diferencialmente. Se muestran las proteínas que lograron ser identificadas, se indica el nombre correspondiente a cada mancha, junto al código asignado en la base de datos UniProt, se muestra el punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (MW), para las condiciones experimentales (Ex), aquellas calculadas en los geles bidimensionales en este estudio, y los valores teóricos calculados a partir de la base de datos de UniProt (Te) utilizando la herramienta bioinformática Expasy. La columna de doble emparejamiento indican si existen proteínas reportadas que coinciden en el rango de comparación de los valores experimentales. Ama C corresponde a la expresión relativa de AmaC/ Proesta y Ama H a la expresión relativa de Ama H/ Proest

