



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA:

**MARCAJE FLUORESCENTE DE LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE
GP63 DE *Leishmania mexicana* MEDIANTE CRISPR/CAS9**

AUTOR: GÓMEZ HINOSTROZA, EDGAR SEBASTIÁN

DIRECTORA: TORRES ARIAS, MARBEL Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Marcaje fluorescente de la proteína de superficie GP63 de *Leishmania mexicana* mediante CRISPR/Cas9” fue realizado por el señor Gómez Hinostroza, Edgar Sebastián el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de junio de 2019.

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea punteada.

Marbel Torres Arias, Ph.D.

C.C. 1802949154



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Gómez Hinostroza, Edgar Sebastián**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Marcaje fluorescente de la proteína de superficie GP63 de Leishmania mexicana mediante CRISPR/Cas9** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 28 de junio de 2019.

Firma:

Edgar Sebastián Gómez Hinostroza

C.C. 1717870644



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN

*Yo, **Gómez Hinostroza, Edgar Sebastián** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ES-PE publicar el trabajo de titulación: **Marcaje fluorescente de la proteína de superficie GP63 de Leishmania mexicana mediante CRISPR/Cas9 en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.***

Sangolquí, 28 de junio de 2019.

Firma:
Firma manuscrita en tinta azul que dice 'Sebastián H.'
.....

Edgar Sebastián Gómez Hinostroza

C.C. 1717870644

DEDICATORIA

A Dios por guiar mi camino y mis decisiones a lo largo de toda mi vida.

A mi familia que ha estado siempre para apoyarme en lo que he necesitado.

A mis amigos del colegio que día a día me dieron el impulso a seguir superándome y no desfallecer.

Sebastián

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas por abrirme las puertas y permitirme ser parte de esa maravillosa familia.

A la Escuela de Patología Sir William Dunn por proveerme de material y conocimiento especialmente al doctor Tom Beneke y a la doctora Eva Gluenz, lo que provó ser crucial para el desarrollo de la presente investigación.

A los integrantes nuevos y antiguos del grupo de biología sintética de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE con los que, juntos, descubrimos nuestra pasión y desarrollamos habilidades que serán útiles en los días consiguientes de nuestras vida.

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE FIGURAS	x
1 CAPÍTULO 1-INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general del proyecto	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
2 CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO	4
2.1 Leishmaniasis	4
2.1.1 Métodos de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis	5
2.2 <i>Leishmania mexicana</i>	6
2.2.1 Formas parasitarias	6
2.2.2 Ciclo de vida del parásito	7
2.2.3 Proteínas de membrana de <i>Leishmania</i> spp.	8
2.2.4 Importancia de GPI en <i>L. mexicana</i>	9

2.3	Edición genómica.....	10vii
2.3.1	Meganucleasas	11
2.3.2	Dedos de zinc (ZFN).....	11
2.3.3	TALENs.....	12
2.3.4	CRISPR/Cas9.....	14
2.3.5	CRISPR/Cas9 en <i>Leishmania</i> spp.....	14
2.3.6	Otros métodos de edición génica en <i>Leishmania</i>	17
2.3.7	Técnicas de transfección	18
2.4	Fluorescencia.....	19
2.4.1	Proteínas fluorescentes como reporteros.....	19
3	CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍA	22
3.1	Cultivo del parásito.....	22
3.2	Obtención de los plásmidos.....	22
3.3	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con plásmidos TB007 y PLOT-mNG-Neo-Neo	23
3.4	Extracción de plásmidos pTB007 y pPLOT-mNG a partir de <i>E. coli</i> -Lisis alcalina	23
3.5	ARNsg y brazos de homología.....	24
3.6	Diseño de primers.....	24
3.7	ADN single guide (sg).....	25
3.8	Amplificación de la secuencia de anclaje a GPI de GP63 (Inserto)	26
3.9	Corte con enzimas de restricción y ligación del inserto en el plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo	27
3.10	Selección de colonias de <i>E. coli</i> con el plásmido PLOT-mNG modificado con el sitio de anclaje a GPI.....	28
3.11	Transfección de <i>Leishmania mexicana</i> con el plásmido TB007 Cas9T7 Tub	29
3.12	Transfección de <i>Leishmania mexicana</i> con ADN donador	29
3.13	Microscopía de fluorescencia	32
3.14	PCR de confirmación de la recombinación	32

4	CAPÍTULO 4 - RESULTADOS	33
4.1	Diseño de primers.....	33
4.2	Caracterización con enzimas de restricción.....	35
4.3	Amplificación de la secuencia de anclaje a GPI de la proteína de membrana GP63	36
4.4	Modificación del plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo y amplificación del cassette	37
4.5	Transfección de <i>Leishmania mexicana</i>	38
4.6	Fluorescencia de <i>L. mexicana</i> transfectada	40
4.7	PCR de confirmación de la recombinación y seguimiento.....	41
5	CAPÍTULO 5 - DISCUSIÓN	43
5.1	Transfección de <i>Leishmania mexicana</i>	43
5.2	Fluorescencia de <i>L. mexicana</i> transfectada	44
5.3	PCR de confirmación de la recombinación y seguimiento.....	44
6	CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES	47
7	CAPÍTULO 7 - RECOMENDACIONES	48
8	BIBLIOGRAFÍA	49

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	<i>Clasificación taxonómica de Leishmania mexicana.....</i>	7
Tabla 2	<i>Programa de PCR para la amplificación del inserto a partir de ADN genómico.....</i>	26
Tabla 3	<i>Mezcla máster de PCR para dos reacciones de amplificación y un control negativo para la amplificación de la secuencia terminal de GPI.</i>	27
Tabla 4	<i>Resumen de la digestión secuencial de pPLOT-mNG con SacI y BamHI. .</i>	28
Tabla 5	<i>Componentes de la PCR de colonias para screening de 15 colonias más un control negativo.....</i>	28
Tabla 6	<i>Programa para la PCR de colonias.....</i>	29
Tabla 7	<i>Componentes de la PCR para cuatro reacciones más el control negativo.</i>	30
Tabla 8	<i>Programa de la PCR para amplificación del ADN donador.....</i>	30
Tabla 9	<i>Primers diseñados para marcar con fluorescencia la proteína GP63 de L. mexicana.....</i>	34
Tabla 10	<i>Selección de Leishmania mexicana transfectada, a los siete días. Las poblaciones (1-5) corresponden a promastigotes transfectados y expuestos al antibiótico.....</i>	38

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Promastigote de <i>Leishmania</i> spp. visto con un microscopio electrónico de barrido.....	6
Figura 2	Ilustración del funcionamiento de las nucleasas utilizadas para generar DSBs para edición genómica. Fuente:(Yu, Batara, y Lu, 2015).....	10
Figura 3	Esquema del funcionamiento de los dedos de zinc. Dos monómeros (púrpura) reconocen una secuencia de aproximadamente 20 bp (azul) y la enzima de restricción <i>FokI</i> (verde) escinde la doble hebra de ADN. Fuente: (Pelletier, 2016).	13
Figura 4	Ilustración del funcionamiento de las TALENs. Las repeticiones de 34 aminoácidos reconocen un 1 bp del genoma y la enzima de restricción <i>FokI</i> fusionada escinde una de las hebras. Fuente: (Pelletier, 2016).	13
Figura 5	Esquema que representa el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9. El ARNg se ensambla en la proteína Cas9 y la guía al sitio diana junto a la secuencia PAM, para que escinda la doble hebra Fuente:(Pelletier, 2016).	15
Figura 6	Plásmido TB007 circular con sus componentes señalados y el sitio de corte de <i>HindIII</i> para linearización (sup.).....	16
Figura 7	Plásmido PLOT-mNG-Neo-Neo circular con sus componentes marcados y los sitios de corte para <i>BamHI</i> y <i>SacI</i> (inf.).....	16
Figura 8	Estructura cristalográfica de mNeonGreen. Fuente:(Clavel y cols., 2016).	21
Figura 9	Esquema de la caracterización esperada para los plásmidos. a pTB007 y b pPLOT-mNG.....	23

- Figura 10** Obtención del ADNsg. En primer lugar, paso A, se realizó una PCR sin ADN molde en donde ambos primers, G00 F y G00 R, se complementaban y la polimerasa completó los espacios; lo que generó una doble hebra de ADNsg que se transfectó (paso B) en promastigotes de *L. mexicana* resistentes a hyg. Dentro del parásito se dió el paso C, la polimerasa de ARN T7 codificada en el plásmido TB007 transcribió al ADNsg en el ARN guía..... 26
- Figura 11** Amplificación de la región 3' de GP63. A) Unión de los primers en el gen de GP63 y B) amplicón que contiene el sitio de anclaje a GPI, un codón de terminación y sitios de restricción 5' para *BamHI* y 3' para *SacI*. 27
- Figura 12** Generación del ADN donador. Se añadió la secuencia terminal de GP63 en la posición 3' de mNG. A) Digestión secuencial del plásmido pPLOT-mNG y al producto de PCR de los primers GP63s (ver tabla 9) con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI*. B) Ligación del fragmento de PCR en el plásmido pPLOT-mNG. C) Amplificación del cassette completo con los primers CassF y Cass R (véase tabla 9). Finalmente, este cassette fue usado como ADN donador junto al ADNsg, en promastigotes previamente transfectados con pTB007 que mostraban resistencia a hyg. 31
- Figura 13** Inserción de mNeon Green en el gen de GP63. A) Gen wild-type de GP63. B) Cas9 junto al ARNg escinde la doble hebra de ADN del gen GP63 en el sitio diana. C) Recombinación del ADN donador con el ADN genómico e inserción del cassette con la proteína de marcaje (mNG) y un gen de resistencia a G418..... 31

- Figura 14** Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pTB007. A) Corte real del plásmido y B) Corte virtual. El número y tamaño de fragmentos tamaño coinciden para todos los casos; sin embargo, en el corte con *EcoRI* no se observa en agarosa el fragmento cercano a 1000 bp debido a que estaba en una concentración baja debido a la estequiometría. No obstante, sí se ve diferencia entre el fragmento mayor de *EcoRI* (13.000 bp) y el de *Sall* (14.000 bp)..... 35
- Figura 15** Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pPLOT-mNG. A) Corte real y B) Corte virtual. De igual manera que con pTB007, el número y tamaño de fragmentos obtenidos con *BamHI* y *SacI* coincide entre A) y B). En la primera línea de *BamHI* existe actividad estrella que fue corregida disminuyendo la concentración de enzima de $80 \frac{U}{\mu L}$ a $10 \frac{U}{\mu L}$ 36
- Figura 16** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para detección de un amplicón de 420 pb que corresponde a la región terminal del gen de Gp63. En la línea C- se encuentra el control negativo de reacción y en las líneas 1-6 reacciones de PCR de ADN genómico con los primers Gp63S-F y Gp63S-R..... 36
- Figura 17** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de la PCR de colonias de *E. coli* con plásmidos de resistencia a ampicilina. Banda de 497 nt indica la presencia del plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo modificado. El control negativo se ubica en el pocillo marcado como C-, las colonias 1, 2, 3 y 4 (repetición)..... 37
- Figura 18** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del ADN donador. Las bandas de 3100 bp corresponden a amplificones del cassette que contenía la proteína fluorescente mNG, la señal de anclaje a GPI y el gen de resistencia a neomicina. El pocillo C- corresponde al control negativo, y los 1, 2 y 3 a reacciones de PCR..... 38

- Figura 19** Comparación del número de parásitos entre los tratamientos. Las poblaciones (1-5) corresponden a promastigotes transfectados y expuestos al antibiótico. Estos datos corresponden a una única transfección y no se realizó un promedio debido a que se seleccionó a las dos poblaciones con mayor número de parásitos..... 39
- Figura 20** Células de *L. mexicana* en medio líquido con G418 como marcador de selección. Los promastigotes en la imagen se encuentran en rosetas (agrupaciones) que evidencia crecimiento. Lente de 60X. Campo claro. 39
- Figura 21** *Leishmania mexicana* transfectada vista en un microscopio de epifluorescencia. En esta imagen tomada en campo claro se puede presenciar la coloración verduzca de los promastigotes transfectados, expuestos durante 14 días al marcador de selección G418. Lente de 60X. 40
- Figura 22** Rosetas (agrupamientos) fluorescentes de *L. mexicana*. Las flechas indican la zona donde se observó una tonalidad verde en las rosetas cuando se las exponía al luz azul. Lente de 20X, filtro GFP. 41
- Figura 23** PCR de confirmación de recombinación. Se puede notar que los amplificones son del mismo tamaño (\approx 391 bp). Las muestras nombradas como pocillo (1 y 2) corresponden a células doblemente transfectadas. 42
- Figura 24** PCR de seguimiento. Las bandas obtenidas utilizando el ADN de promastigotes wild-type (WT), con la primera transfección (TB007) y seleccionados con G418 (transfectantes) permanecen del mismo tamaño (\approx 391bp), sin observarse una banda de 1000 bp. 42

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxiribonucleico

ARN = Ácido ribonucleico

Amp = Ampicilina

bp = Pares de bases de nucleótidos

CRISPR = Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

Cys = Cisteína

DSBs = Escisiones de la doble cadena de ADN

GP63 = Glicoproteína de 63 kDa o Leishmanolisina

GPI = Glicosilfostadifilinositol

His = Histidina

HR = Recombinación homóloga

Hyg = Higromicina

mNG = mNeonGreen

nt = Nucleótido

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

sg = Single guide

TALEN = Nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción

ZFN = Nucleasas de dedos de zinc

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad desatendida causada por cerca de 20 especies del género *Leishmania*, que afecta a un número considerable de personas en el Ecuador y en el mundo; siendo la proteína GP63 esencial para la infectividad del parásito. Por otro lado, la técnica CRISPR/Cas9 ha demostrado ser práctica en la edición genómica de *Leishmania* spp., tanto para marcaje de proteínas como para silenciamiento de genes. Por lo tanto, en el presente estudio se aplicó el sistema CRISPR/Cas9 para fusionar la proteína fluorescente mNeonGreen a GP63, con el fin de que en un futuro se pueda aprovechar su seguimiento en tiempo real. Se logró transfectar *Leishmania mexicana* con un plásmido que contenía Cas9 y resistencia a higromicina, además de un ADN donador que, además de mNeonGreen, codificaba una enzima de resistencia a G418. Después de días de selección, se obtuvo una población resistente a G418 que sugiere que la transfección fue exitosa, aunque no fue posible observar fluorescencia a la longitud de onda característica de mNeonGreen; surgiendo, asimismo, inconvenientes con posible autofluorescencia. Este fenómeno pudo deberse a que la eficiencia de transfección fue baja y las técnicas de sondeo poco sensibles o que la Cas9 guiada por el ARNg tuvo un inconveniente encontrando la secuencia diana, por posibles rearrreglos de la cromatina.

Palabras clave:

- CRISPR/Cas9
- GP63
- *Leishmania mexicana*
- Leishmanolisina

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by approximately 20 species of the genus *Leishmania*. This illness thrives in Ecuador and in tropical regions of the world. Alongside other proteins, GP63 proved to be an important factor to developed leishmaniasis. On the other hand, CRISPR/Cas9 is a practical tool for genomic editing in *Leishmania* spp., with a range of applications including tagging and knock-outs. Because of this, CRISPR/Cas9 was applied in this study to fuse the fluorescent protein mNeonGreen to GP63, in order to obtain a real-time track for later use. *Leishmania mexicana* promastigotes were successfully transfected with a plasmid harbouring Cas9 and a hygromycin resistance gene. Likewise, a donor DNA coding mNeonGreen and a neomycin resistance gene were electropored into the hygromycin resistant population. Subsequently, a G418 resistant population was obtained after days of selection, which suggests that transfection was successful. Still, the fluorescence observed in *L. mexicana* promastigotes corresponded to a different wavelength than the one associated with mNeonGreen, implying that there was an inconvenience regarding autofluorescence. This phenomenon may have been induced by a low transfection rate and low-sensitivity tests, or Cas9 might have had a complication finding the target sequence. The latter may have been generated by a chromatin rearrangement.

Keywords:

- CRISPR/Cas9
- GP63
- *Leishmania mexicana*
- Leishmanolysin

CAPÍTULO 1-INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

Ciertas especies del género *Leishmania* son capaces de producir leishmaniasis, enfermedad que a su vez se divide en cutánea, mucocutánea y visceral (Handler, Patel, Kapila, Al-Qubati, y Schwartz, 2015; Meunier, 2014). Leishmaniasis cutánea generan úlceras indoloras en la piel (Handler y cols., 2015; Meunier, 2014; OMS, 2018a), en la mucocutánea las úlceras destruyen zonas de la nariz, boca y faringe (Handler y cols., 2015; Meunier, 2014); y en leishmaniasis visceral se ven afectados órganos como el hígado y el bazo, provocando pérdida de peso, fiebre, anemia y algunas veces la muerte (Handler y cols., 2015; OMS, 2018a).

La leishmaniasis cutánea y mucocutánea, afectan a un número considerable de personas en el Ecuador, especialmente en la provincia de Pichincha (Alvar y cols., 2012; Calvopiña, Loor, Lar, Zambrano, y Hashiguch, 2012) y a 12 millones de personas mundialmente (Handler y cols., 2015). Entre las especies de *Leishmania* encontradas en el Ecuador están *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. naiffi*. Esta enfermedad disminuye la productividad y la calidad de vida del individuo ya que aparte de la infección en sí, se crean secuelas de por vida (Handler y cols., 2015).

La leishmaniasis muchas veces está relegada de la investigación sobre enfermedades tropicales (Hotez y cols., 2006; Pawar y cols., 2014), causando un rezago de conocimiento si se compara con otras patologías. Adicionalmente, la distribución del vector (*Lutzomyia* o *Phlebotomus*) que propaga la enfermedad ha empezado a variar, encontrándose en zonas no endémicas como Europa y Estados Unidos que presenten una distribución altitudinal menor a 1300 msnm. y una temperatura con un rango de entre 20 a 25°C (Acosta y cols., 2013; Alawieh y cols., 2014; Handler y cols., 2015; González y cols., 2010; Ready, 2010). Por esta razón, el estudio del parásito, su ciclo de vida y su mecanismo de infección es necesario para abordar mejores tratamientos y nuevos métodos de profilaxis.

Debido a que el método actual para marcar a proteínas de membrana con fluorescencia involucra la muerte del parásito, no se puede determinar qué está pasando en tiempo real. Por ello, se plantea crear una proteína de fusión de manera que se pueda seguir el funcionamiento y localización del polipéptido de membrana en tiempo real; lo cual ya se ha realizado para otras proteínas, especialmente intracelulares y flagelares, con el fin de poder estudiar sus interacciones e importancia para la viabilidad del parásito (Beneke y cols., 2017; Dean y cols., 2015; Zhang y Matlashewski, 2015).

1.2. Justificación

La leishmaniasis es una enfermedad de alta mortalidad y morbilidad que afecta a 12 millones de personas, principalmente pobres y desnutridas (Handler y cols., 2015; Observatory, 2018; OMS, 2018a). Infecta a un promedio de 1 millón de personas anualmente y provoca la muerte a cerca de 25.000 en el mismo período (Handler y cols., 2015; OMS, 2018a). A pesar de ser una enfermedad endémica en ciertos lugares, no se conoce en detalle su comportamiento a nivel celular y molecular; por lo tanto, es necesario conocer su conducta si es que se quiere llegar a disminuir su prevalencia. Asimismo, en los últimos años debido al cambio climático (OMS, 2018a; Ready, 2010), las moscas del género *Phlebotomus* que transmiten a los parásitos de *Leishmania* se han desplazado a zonas en las que antes no se habían reportado, tales como Europa y ciertos estados de EEUU (Alawieh y cols., 2014; Handler y cols., 2015; González y cols., 2010; Ready, 2010); por lo cual más y más países se van a ver afectados a medida que la temperatura global aumente.

Por ello, el marcaje de una proteína tan importante en la infección y supervivencia del parásito como es la GP63 (Metcalf y Etges, 2006; Sádlová, Volf, Victoir, Dujardin, y Votýpka, 2006; Thiakaki, Kolli, Chang, y Soteriadou, 2006; Yao, Donelson, y E. Wilson, 2003) llevaría a un mejor entendimiento sobre la distribución espacial y temporal de lo que acontece en la superficie de las células infectadas y de las vesículas que el parásito secreta; lo que a su vez

allanaría el camino a nuevos tratamientos y métodos profilácticos más disponibles, seguros y efectivos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general del proyecto

Marcar con fluorescencia a la proteína de superficie GP63 de *Leishmania mexicana* mediante CRISPR/Cas9.

1.3.2. Objetivos específicos

- Transfectar promastigotes de *Leishmania mexicana* con un segmento de ADN que contenga el gen de la proteína fluorescente (GFP).
- Observar fluorescencia de promastigotes de *Leishmania mexicana* con un microscopio de fluorescencia.
- Comprobar que se ha modificado el genoma con el gen de GFP mediante PCR.
- Realizar un seguimiento de GP63:GFP en la multiplicación parasitaria.

CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO

2.1. Leishmaniasis

Es una enfermedad producida por el parásito *Leishmania* que es transmitido por picaduras de dípteros pertenecientes al género *Phlebotomus* (Handler y cols., 2015; Meunier, 2014; OMS, 2018a; Romero, 2007) (en el Viejo Mundo) y *Lutzomya* o arenilla (Meunier, 2014) (en el Nuevo Mundo); en donde se encuentran en la forma extracelular flagelada o promastigote. Entre los principales reservorios de la enfermedad están los perros, humanos, babuinos, murciélagos y roedores (Bottone, 2006; Handler y cols., 2015).

Se han reportado tres tipos de leishmaniasis: cutánea (la más común), mucocutánea y visceral (la más grave) (Bottone, 2006; Handler y cols., 2015; Meunier, 2014; OMS, 2018a). El primer tipo está caracterizado por el desarrollo de úlceras indoloras en áreas expuestas de la piel, varias semanas o meses luego de la picadura de los dípteros (Handler y cols., 2015; Meunier, 2014; OMS, 2018a). El segundo tipo, que es producido entre otros por *L. mexicana* (Marin-Iniesta y Marin-Luango, 1982; Romero, 2007), es el más común del continente americano y causa principalmente la destrucción de la nariz, boca y faringe después de que las lesiones cutáneas hayan sanado (Handler y cols., 2015; Meunier, 2014; OMS, 2018a). Finalmente, en la leishmaniasis visceral se genera fiebre, hepatosplenomegalia, pérdida de peso y anemia (Handler y cols., 2015; Meunier, 2014; OMS, 2018a) y es considerada como la forma más grave, con una mortalidad del 95 % si se deja sin tratamiento (Handler y cols., 2015; OMS, 2018a).

No obstante, la mayoría de las personas infectadas por el parásito no desarrollan la enfermedad (OMS, 2018a). Los niños son los más vulnerables, tanto por la probabilidad de ser picados por individuos del género *Phlebotomus* o *Lutzomya* como porque su sistema inmune no está completamente desarrollado (Handler y cols., 2015; OMS, 2018a). Incluso, un huésped puede estar infectado simultáneamente por dos especies de *Leishmania* (Handler y cols., 2015).

Existen tres vías para tratar la enfermedad, dependiendo de la especie del parásito, aspecto, número y localización de las lesiones, y su asociación con cartílago o linfagitis (Meunier, 2014). La primera vía es dejar sin tratamiento, la segunda es administrar glucantima intralesional y la tercera consiste en dosis intramusculares o intravenosas de estibogluconato de sodio con antibióticos de amplio espectro para controlar infecciones bacterianas (Meunier, 2014). De igual manera, se pueden controlar los vectores mediante fumigación y evitar picaduras mediante el uso de repelente de insectos (Meunier, 2014; OMS, 2018a).

2.1.1. Métodos de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis

2.1.1.1 Diagnóstico

En el caso de la leishmaniasis mucocutánea o cutánea, el diagnóstico se basa en el conteo directo de amastigotes en frotis teñidos con Giemsa, provenientes de biopsias o raspados de llagas, e incluso se pueden utilizar cultivos para incrementar la sensibilidad hasta en un 85 %, pero son propensos a contaminarse (N. E. Aronson y Joya, 2019; Reithinger y Dujardin, 2007; Elmahallawy y cols., 2014). De igual manera, es posible realizar una tinción con hematoxilina-eosina de cortes del tejido de las úlceras; no obstante, esta prueba no es muy sensible. Por otro lado, no es usual el detectar anticuerpos en sangre ya que generalmente se encuentran en baja concentración, ni recurrir a PCR, ELISA, Western blot o IFA por la dificultad de aplicarlas en países en vías de desarrollo (N. E. Aronson y Joya, 2019; Reithinger y Dujardin, 2007; Elmahallawy y cols., 2014).

2.1.1.2 Tratamiento

En cuanto al tratamiento, no existe uno general debido a que depende de las características de la zona (el tratamiento puede llegar a ser específico para cada cepa) (N. Aronson y cols., 2017). Para la leishmaniasis cutánea se pueden utilizar medicamentos parenterales (deoxicolato de anfotericina B, antimoniales pentavalentes, estibogluconato de sodio, antimoniato de meglumina, anfotericina B liposomal y isetionato de pentamidina), orales (gluconazol, ketoconazol,

miltefosina, estibogluconato de sodio y antimonio de meglumina) o tópicos (paromomicina y MBCL, paromomicina y gentamicina) (N. Aronson y cols., 2017).

Por otro lado, para la leishmaniasis mucocutánea se utiliza el deoxicolato de anfotericina B, anfotericina liposomal, miltefosina, antimoniales pentavalentes, estibogluconato de sodio y antimonio de meglumina (N. Aronson y cols., 2017). Es importante notar que el estibogluconato de sodio no está aprobado por la FDA para ninguna de las dos leishmaniasis, sin embargo puede ser obtenido por patrocinio del CDC (N. Aronson y cols., 2017).

2.2. *Leishmania mexicana*

Leishmania mexicana es un protozoo que forma parte del género *Leishmania*, el cual está compuesto por cerca de 20 especies causantes de enfermedades (OMS, 2018a), y a su vez pertenece a la familia Trypanosomatidae (Bottone, 2006; OMS, 2018a; Uribarren, 2017). Además, el género puede subdividirse en cuatro complejos: el *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. donovani* (Bottone, 2006; Handler y cols., 2015). En Ecuador, *L. mexicana* tiene una mayor prevalencia en la provincia de Sucumbíos (Kato y cols., 2016).

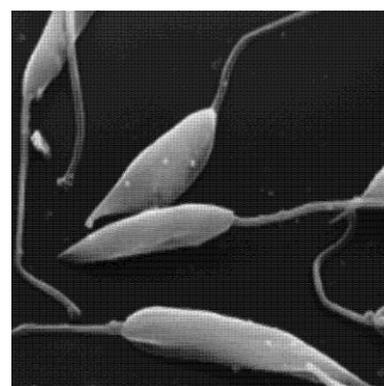


Figura 1: Promastigote de *Leishmania* spp. visto con un microscopio electrónico de barrido.

2.2.1. Formas parasitarias

Los individuos de *Leishmania* pueden encontrarse en dos tipos celulares o formas parasitarias (promastigote [forma móvil] o amastigote [dentro de macrófagos]) dependiendo del huésped en el que se encuentren (Romero, 2007; Sunter y Gull, 2017). La primera forma parasitaria o promastigote se localiza dentro del díptero *Phlebotomus* o *Lutzomya* y se caracteriza por su flagelo anterior que le permite movilizarse dentro del insecto, fijarse a los microvellos de las

Tabla 1:
Clasificación taxonómica de Leishmania mexicana.

Clasificación taxonómica	
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigofora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Especie	mexicana

Fuente: Keas, B. (1999).

células del intestino medio y sentir el gradiente de azúcares que se forma cuando el díptero se alimenta (Sunter y Gull, 2017). El promastigote, además, puede encontrarse en cuatro formas de desarrollo, el procíclico (fase G1 y S), nectomónado (fase S), leptomónado (flagelo más largo que del procíclico) y metacíclico (Sunter y Gull, 2017).

La segunda forma parasitaria de *Leishmania* es el amastigote y se presenta cuando infecta a macrófagos de mamíferos (Romero, 2007; Sunter y Gull, 2017). Tiene una estructura similar a la del promastigote, excepto que no tiene un flagelo y es más redondeado (Sunter y Gull, 2017). Dentro de la célula, los amastigotes suprimen la producción de superóxido dismutasa y aumentan la producción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y la TGF- β (Kilma, 2007). Es importante notar que el parásito se multiplica por fisión binaria tanto en promastigotes (Lainson y Shaw, 1978), en este caso de manera longitudinal, y en amastigotes (Lawyer, Young, Butler, y Akin, 1987).

2.2.2. Ciclo de vida del parásito

Los parásitos del género *Leishmania* tienen un ciclo de vida digenético, es decir que requieren de un huésped mamífero y de un insecto como vector (Bard, 1989; Sunter y Gull, 2017). Una vez dentro del huésped, el parásito actúa destruyendo células del sistema fagocitario mononuclear por lo que, intentando compensar la pérdida de estas células, surge la esplenomegalia (agrandamiento patológico del bazo) (Romero, 2007). Una vez que el parásito es fagocitado

(proceso facilitado por proteínas como la GP63 y LPG que actúan sobre el sistema del complemento) este inhibe procesos moleculares del macrófago (Uribarren, 2017) de manera que la célula inmune no destruye a *Leishmania* y lo disemina a lugares secundarios (Kilma, 2007). Posteriormente, el promastigote se convierte en su forma intracelular o amastigote dentro del macrófago (Handler y cols., 2015; Uribarren, 2017). Finalmente, cuando un insecto del género *Lutzomya* pica a un individuo infectado, el amastigote se transforma en promastigote dentro del sistema digestivo del insecto. Una vez que se liberan de los macrófagos se adhieren al epitelio intestinal y, en cuatro días, los promastigotes están listos para infectar otra persona (Bottone, 2006; Handler y cols., 2015; Lainson y Shaw, 1978).

2.2.3. Proteínas de membrana de *Leishmania* spp.

Las proteínas de superficie de *Leishmania* spp. son candidatos a dianas en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento, dado que se ha demostrado que tienen inmunoreactividad con anticuerpos de personas que padecen leishmaniasis (Ejazi y cols., 2018). Las que muestran más potencial son el factor de elongación 1α , la α -tubulina y la glicoproteína 63 (Ejazi y cols., 2018), pero esta última es la que genera una mayor respuesta por parte del organismo ya que se puede detectar en orina anticuerpos anti-GP63 hasta seis meses después de curada la enfermedad (Ejazi y cols., 2018). Gracias a esto se puede considerar a la GP63 como la proteína de membrana más apropiada para el desarrollo de nuevas formas de detección y tratamiento.

2.2.3.1 Metaloproteínasa GP63

La glicoproteína 63 (GP63) o también denominada *leishmanolisina*, es una proteínasa que incorpora zinc en su estructura tridimensional y es importante para la infección a macrófagos (Bouvier, 2004; Joshia, Kelly, Kamhawi, Sack, y McMaster, 2002; Baker, Muller, y Rollinson, 1999). Se suele encontrar como dímeros en gran densidad y anclada en la superficie de la membrana celular de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. (Bouvier, 2004; Joshia y cols., 2002; Baker y cols., 1999); sin embargo, en el amastigote la cantidad y actividad de la GP63

es inferior a la del promastigote (Baker y cols., 1999). GP63 tiene actividad proteolítica cuando tirosina está en la posición P1, residuos hidrofóbicos en la posición P1', y residuos básicos en las posiciones P2 y P3; probablemente ayudando a la escisión del factor C3 del sistema del complemento y así aumentar la capacidad infectiva a macrófagos (Joshia y cols., 2002; Baker y cols., 1999). GP63 se traduce en forma de una preproenzima que madura para dar lugar a la enzima activa y anclada en glucofosfatidilinositol (GPI) de la membrana celular (Bouvier, 2004; Baker y cols., 1999).

2.2.4. Importancia de GPI en *L. mexicana*

El glicosilfosfatidilinositol es una modificación post-traducciona l de las proteínas que les permite fijarse/anclarse a la membrana plasmática de la célula, con su terminal N hacia el espacio extracelular (Paulick y Bertozzi, 2008). El GPI está conformado por una cola fosfolipídica, un núcleo de glucano y un enlace de fosfoetanolamina (Paulick y Bertozzi, 2008). El rol del GPI en las células no está dilucidado en su totalidad, ya que tiene un rol tan amplio desde transducción de señales hasta partenogénesis de priones (Paulick y Bertozzi, 2008). Sin embargo, GPI es importante en parásitos eucariotas ya que influye en la capacidad infectiva de estos sobre la célula huésped (Ilgoutz y McConville, 2001; Reddy y cols., 2015; Webb y cols., 1997).

La mayoría de las proteínas de superficie de tripanosomátidos se encuentran ancladas en GPI, en contraposición a los eucariotas superiores cuyas proteínas de superficie son, usualmente, transmembrana (Ilgoutz y McConville, 2001; McConville y Ferguson, 1993); además, se ha encontrado GPI libre (sin proteínas) en la membrana plasmática de *Leishmania* spp. (Ilgoutz y McConville, 2001). Estas proteínas de membrana y GPI libre cumplen funciones mediadoras entre el parásito y la célula huésped (Ilgoutz y McConville, 2001); no obstante, se cree que ninguna proteína es esencial individualmente sino que todo el conjunto proteico es quien le da la infectividad al parásito (Hilley, Zawadzki, McConville, Coombs, y Mottram, 2017).

2.3. Edición genómica

La edición genómica es el conjunto de procedimientos usados para la alteración precisa (inserción, delección, modificación o reemplazo) del material genético cromosómico (genoma) de un organismo (OMS, 2018b). Estos procedimientos han ido evolucionando en las últimas décadas, permitiendo a la comunidad científica modificar cada vez más especies y de manera más accesible (Pelletier, 2016). Sin embargo, para editar el genoma es necesario el poder escindir la doble hebra de ADN y esto se realiza con cuatro tipos de nucleasas: meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción (TALENs) y caspasas del sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR); cada tipo con sus características propias (Appasani, 2018; Crommelin, Sindelar, y Meibohm, 2019; Kovalchuk y Kovalchuk, 2016; Pelletier, 2016).

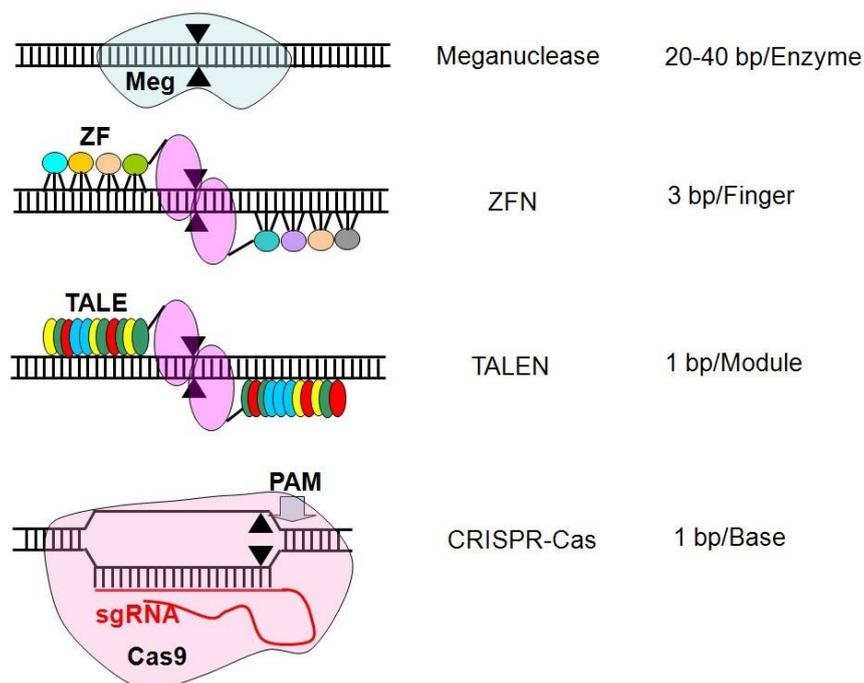


Figura 2: Ilustración del funcionamiento de las nucleasas utilizadas para generar DSBs para edición genómica.

Fuente:(Yu y cols., 2015)

2.3.1. Meganucleasas

Las meganucleasas son proteínas utilizadas para provocar DSBs sitio-específicas (Silva y cols., 2011; Bilichak y Eudes, 2016; Kurnaz, 2015) debido a que tienen una alta especificidad en vista de que reconocen secuencias de aproximadamente 20 bp o más (Bilichak y Eudes, 2016; Kurnaz, 2015) y una menor toxicidad que otras técnicas (excepto CRISPR/Cas9) (Kurnaz, 2015). Posteriormente, el sitio escindido se reparará por HR (Zhang, Lypaczewski, y Matlashewski, 2017), permitiendo así la introducción de material genético. Las meganucleasas se pueden categorizar en cinco familias dependiendo de su estructura y secuencia (Silva y cols., 2011) pero la más conocida y utilizada es la familia LAGLIDADG (Silva y cols., 2011), siendo la *I-SecI* la endonucleasa más usada (Zhang y cols., 2017).

Se han empleado a las meganucleasas satisfactoriamente para modificar levaduras (Epinat y cols., 2003; Kuijpers y cols., 2013), *Xenopus* (Ogino, McConnell, y Grainger, 2006; Pan, Chen, Loeber, Henningfeld, y Pieler, 2006), pez cebra (Soroldoni, Hogan, y Oates, 2009; Clemens, Grabher, Joly, Joachim, y Wittbrodt, 2004) y células de mamíferos (Arnould y cols., 2007; Wang y cols., 2014), con una eficiencia de máximo 10% (Silva y cols., 2011; Szczepek y cols., 2007); a pesar que se ha evidenciado fallas en el reconocimiento (Traver, Anderson, y Adelm, 2009). Adicionalmente, estas proteínas pueden ser modificadas para que reconozcan otros sitios y así poder ampliar el espectro de uso (Kurnaz, 2015; Daboussi, Stoddard, y Zhang, 2015). No obstante, alterar mediante ingeniería de proteínas a la meganucleasa para que reconozca otro sitio es un problema y limita la posible aplicación de esta tecnología en otras dianas y en más especies (Pelletier, 2016).

2.3.2. Dedos de zinc (ZFN)

Una estrategia más versátil para generar DSBs sitio-específicos fue desarrollada por el grupo Chandrasegaran, la cual se basa en la fusión del motif dedo de zinc de Cys2-His2 (extremo N-terminal) a la enzima de restricción *FokI* (extremo C-terminal) (Kim, Cha, y Chandrasegaran, 1996; Smith y cols., 2000). En este sistema, los dominios de dedos de zinc, los cuales pertene-

cen a factores de transcripción eucariotas (Brown, Sander, y Argos, 1985; J. Miller, McLachlan, y Klug, 1985), guían a la enzima *FokI* a través de la doble cadena de ADN permitiendo así una escisión sitio-específica con salientes 5' de 4 bp (Kim y cols., 1996; Smith y cols., 2000; Pelletier, 2016).

Cada unidad de dedo de zinc está formada por tres o cuatro módulos de unión (cada módulo reconoce un triplete de nt), de tal manera que dos monómeros de ZFNs reconocen una secuencia de 18 a 24 bp, espaciadas por 5 a 6 bp (S. Orlando y cols., 2010; Kurnaz, 2015). En esta técnica se puede modificar a los dominios para que reconozcan los sitios dianas deseados (Pelletier, 2016) e incrementa la probabilidad de inserción por HR en comparación con las meganucleasas (Bibikova y cols., 2001).

Los ZFNs han demostrado ser útiles para la modificación de organismos tales como *Arabidopsis* (De Pater, Neuteboom, Pinas, Hooykaas, y Van Der Zaal, 2009; Lloyd, Plaisier, Carroll, y Drews, 2005; Tovkach, Zeevi, y Tzfira, 2009) y *Xenopus* (Young y cols., 2011), así como células de mamífero (S. J. Orlando y cols., 2010; Pruett-Miller, Connelly, Maeder, Joung, y Porteus, 2008; Santiago y cols., 2008). De igual manera, ha sido posible emplear los ZFNs en terapia génica con retrovirus (Montini y cols., 2009). Sin embargo, persiste el problema de modificar la proteína para que reconozca un sitio diana en particular debido a que es difícil predecir las interacciones entre aminoácidos y nucleótidos (Kumar y Jain, 2015). Otros inconvenientes de los ZFNs son: el alto costo de ensamblaje (Bilichak y Eudes, 2016), cuando el sitio está metilado (Pelletier, 2016) y problemas de propiedad intelectual, especialmente en plantas (Chandrasekharan, Kumar, Valley, y Rai, 2009).

2.3.3. TALENs

De una manera similar a los ZFNs se diseñaron a las TALENs (nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción). En este caso se fusionaron proteínas de unión a ADN (TALEs) al dominio catalítico de *FokI* (Christian y cols., 2010; Li y cols., 2011), por lo que, al igual que en los dedos de zinc, se requiere la formación de dímeros y el rediseño de las TALEs

2.3.4. CRISPR/Cas9

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR por sus siglas en inglés) junto con endonucleasas *cas* comprenden el mecanismo de ciertas bacterias para resistir infecciones por bacteriófagos (Barrangou y cols., 2007; Brouns y cols., 2008; Horvath y Barrangou, 2008). Una vez que un virus entra a una bacteria que posee este sistema, parte del ADN viral se integra entre las repeticiones palindrómicas de modo que si existe una infección nueva por el mismo virus la bacteria utilizará el sistema para degradar el genoma viral y resistir la infección (Brouns y cols., 2008).

Sin embargo, se encontró una forma de aprovechar el sistema CRISPR asociado a la *cas9* para editar el genoma o regular la expresión de genes en organismos vivos (Ran y cols., 2013; Sander y Joung, 2014). En este caso se utiliza el mismo concepto, un segmento de ARN que se ensambla a una caspasa (*cas9*) que a su vez tiene actividad endonucleasa (Ran y cols., 2013; Sander y Joung, 2014), sin embargo se añade una parte más que consiste en un segmento de ADN que se inserta en el sitio de corte por homología (Doudna y Charpentier, 2014; Ran y cols., 2013; Sander y Joung, 2014). De esta manera se ha logrado generar knock-outs (Hai, Teng, Guo, Li, y Zhou, 2014; Lu y cols., 2017; Shalem y cols., 2013), regulación génica (Hilton y cols., 2015; Gilbert y cols., 2013; Polstein y Gersbach, 2015), expresión de proteínas heterólogas (Lian, Hamedirad, y Zhao, 2018; Peng y cols., 2015; Shi, Liang, Zhang, Ang, y Zhao, 2016) y marcaje de proteínas (Beneke y cols., 2017; Dean y cols., 2015; Zhang y Matlashewski, 2015).

2.3.5. CRISPR/Cas9 en *Leishmania* spp.

Zhang y Matlashewski han reportado la posibilidad de modificar el genoma de *L. donovani*, *L. major* y *L. mexicana* con CRISPR/Cas9, produciendo knock-outs, marcajes con GFP y traslocaciones cromosómicas (Zhang y Matlashewski, 2015; Zhang y cols., 2017). No obstante, para esta técnica de CRISPR se requiere que el ARNg (codificado en ADNg) se ligue en un plásmido, que a su vez provea de resistencia a neomicina. Con el fin de evitar el proceso de corte y ligación del ARNg, una nueva técnica para *L. mexicana* se desarrolló en la escuela de

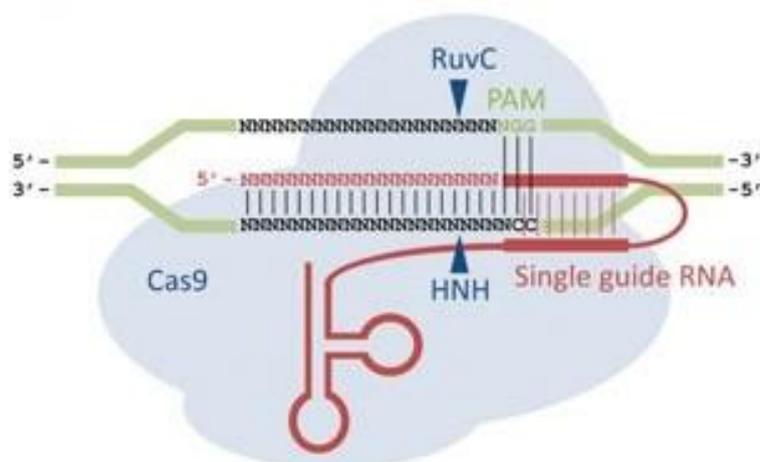


Figura 5: Esquema que representa el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9. El ARNg se ensambla en la proteína Cas9 y la guía al sitio diana junto a la secuencia PAM, para que escinda la doble hebra

Fuente:(Pelletier, 2016).

patología Sir William Dunn de la Universidad de Oxford por Beneke y cols. (2017).

En esta variante de CRISPR/Cas9 se inicia con una transfección de promastigotes con el plásmido linearizado TB007 y la posterior selección de la población resistente al antibiótico. Este plásmido contiene la proteína Cas9, un marcador de selección para higromicina y la polimerasa de ARN T7 para la transcripción del ARNg (Beneke y cols., 2017).

Una vez obtenida la población resistente, se procede a una segunda transfección con el ADN single guide (ADNsg), obtenido mediante una PCR con dos oligos, y el ADN donador amplificado a partir de pPLOT-mNG-Neo-Neo o una de sus variantes que le provee al parásito de resistencia a neomicina (Beneke y cols., 2017).

Este método es mucho más rápido debido a que no se requiere armar un plásmido para el ARNg y, ya que el gen de NeonGreen está flanqueado por genes de resistencia, se puede marcar el extremo N-terminal o C-terminal de cualquier proteína (Beneke y cols., 2017).

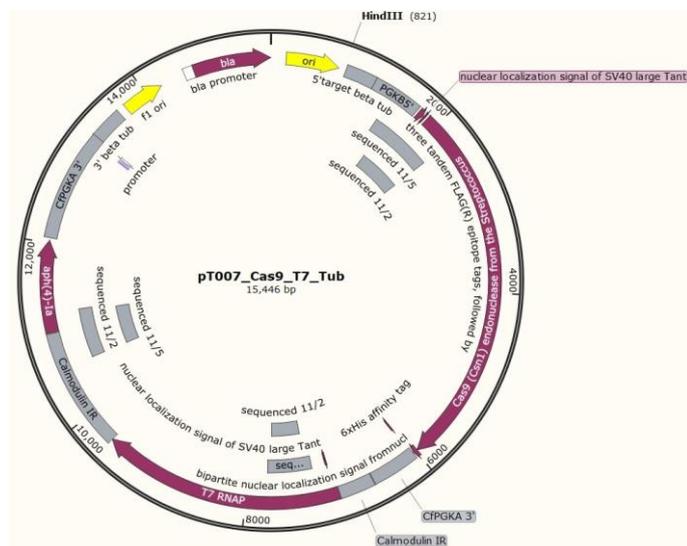


Figura 6: Plásmido TB007 circular con sus componentes señalados y el sitio de corte de *HindIII* para linearización (sup.).

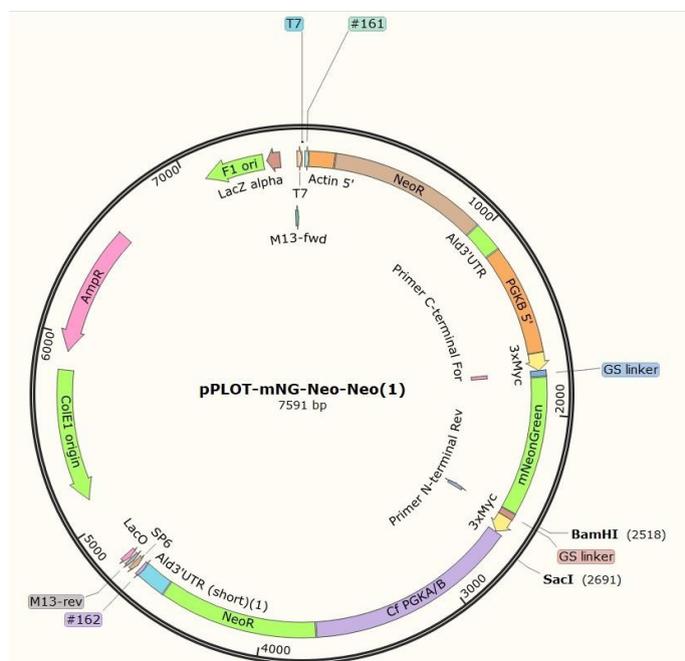


Figura 7: Plásmido PLOT-mNG-Neo-Neo circular con sus componentes marcados y los sitios de corte para BamHI y SacI (inf.).

2.3.6. Otros métodos de edición génica en *Leishmania*

En el Reino Unido, un grupo de investigadores de la Imperial College London y de la Universidad de Oxford desarrollaron una técnica de edición génica en *Leishmania* que igualmente utiliza recombinación homóloga (Dean y cols., 2015). Sin embargo esta metodología se basa en la generación de un fragmento de ADN que contenga tanto el gen de la GFP como un gen de resistencia, mediante long primer PCR; sin requerir de un corte con una endonucleasa (Chaim, Hoshida, Fukunaga, y Akada, 2012) pero necesitando de brazos de homología mucho más largos (500 nt) y con menor eficiencia de transformación (10^{-5} transfectantes por célula añadida). Otro método de edición génica por recombinación homóloga utiliza plásmidos linearizados desarrollados en el laboratorio de la Dra. Papadopoulou (Roy y cols., 2000), que poseen brazos de homología para la región 3' del promotor de ARN ribosomal 18s alrededor de un gen de marcaje (luciferasa (Roy y cols., 2000) o GFP) más un gen de resistencia

Por otro lado, se ha desarrollado un método de expresión de proteínas heterólogas en *Leishmania* sin recurrir a la integración en el genoma. En 1990 LeBowitz y cols. utilizaron el plásmido episomal (no se insertan en el genoma) pX para expresar β -galactosidasa en promastigotes de *L. amazonensis*. Este plásmido se ha utilizado en posteriores aplicaciones para la expresión de GFP con el fin de observar en qué parte del insecto se reproducen los promastigotes (Guevara y cols., 2001) y como control para marcaje de proteínas (Ha, Schwarza, Turco, y Beverle, 1996). Igualmente, se han utilizado plásmidos episomales para comparar la facilidad de transfección entre las diferentes formas del parásito (dos Santos-Costa, de Assis-Golim, Rossi-Bergmann, Trindade-Costa, y Selma, 2011).

2.3.7. Técnicas de transfección

Con el fin de introducir material genético externo a una célula eucariota, se han desarrollado diversas técnicas de transfección (Nicholl, 2012). De las técnicas más usadas por su versatilidad es la electroporación, que se caracteriza por la creación de choque de alto voltaje que genera agujeros temporales en la membrana plasmática y, así, se le permite al ADN ingresar a la células (Borges y cols., 2013; Nicholl, 2012; Potter y Heller, 2010). En este procedimiento la optimización es más rápida, fácil y la tasa de transfectantes es alta; pudiendo ser utilizado para ocasionar knock-outs, knock-ins, marcajes y knock-downs (Potter y Heller, 2010).

Por otro lado, se puede introducir material genético mediante microinyección en donde se usa una aguja para perforar la membrana e introducir ADN en la célula; sin embargo, el número de transfectantes es ínfimo en comparación con otras técnicas y, además, se requiere de mucha práctica para dominar (Nicholl, 2012). El último método importante de transfección de uso generalizado es la lipofección en el cual se forman liposomas que contengan el fragmento de ADN (J. H. Felgner y cols., 1994; P. L. Felgner y cols., 1987).

2.3.7.1 Técnicas de transfección en *Leishmania*

El método más utilizado para la transfección en los parásitos del género *Leishmania*, tanto promastigotes como amastigotes, es la electroporación (Dean y cols., 2015; LeBowitz, Coburn, McMahon, y Beverley, 1990; Guevara y cols., 2001; Ha y cols., 1996; Cha-aim y cols., 2012) gracias a su eficiencia (Beverley y Clayton, 1993). No obstante, también se ha utilizado lipofección para introducir ADN en *Leishmania* y realizar knock-outs (Nandana, Trana, Trinha, Silverman, y Lopez, 2007) o para marcar fluorescentemente proteínas sin función conocida hasta el momento (Nayaka, Sahasrabuddhe, Bajpai, y Gupta, 2005); sin embargo, el uso de esta técnica se confina a pocos artículos. Otros métodos de transfección no han sido reportados.

2.4. Fluorescencia

La fluorescencia se puede definir como la emisión espontánea de radiación provocada por especies electrónicamente excitadas por fotones de luz, que desaparece una vez que la fuente de luz es interrumpida (Valeur y Berberan-Santos, 2012; Jameson, 2014). Asimismo, el espectro de emisión es el cambio de la intensidad de la fluorescencia en función de la longitud de onda de la luz que produce fluoróforo (Jameson, 2014), mientras el espectro de excitación corresponde al rango de longitud de onda que el fluoróforo absorbe (Jameson, 2014).

Gracias a esto, se han desarrollado múltiples para los fluoróforos como localizar una molécula mediante un microscopio (Valeur y Berberan-Santos, 2012). Por ello, para poder observar moléculas específicas hay que tomar en cuenta las características hidro/liposolubles, la tasa de decaimiento de fluorescencia y el espectro de emisión/excitación del fluoróforo (Valeur y Berberan-Santos, 2012; Jameson, 2014).

De igual manera, la fluorescencia se ha convertido en uno de los recursos más importantes para la imagenología en biología (Day y Davidson, 2014; Morris, 2013). Esto es debido a que es un método no destructivo utilizado en el seguimiento en tiempo real, tanto en células individuales como en organismos modelos, de moléculas importantes en procesos biológicos (Day y Davidson, 2014; Morris, 2013). Sin duda, los fluoróforos de seguimiento en tiempo real más importantes son las proteínas fluorescentes, debido a que se emplea la propia maquinaria de la célula para producir el fluoróforo, se degradan relativamente despacio y son altamente sensibles (Chalfie y Kain, 2005; Morris, 2013)

2.4.1. Proteínas fluorescentes como reporteros

La primera proteína fluorescente se encontró en el borde de la campana de la medusa *Aequorea victoria* en el año de 1955, pero solo en 1962 se logró demostrar la naturaleza de la proteína fluorescencia y, para 1974, se la logró (Pallás, 2008). El gen de las proteínas fluorescentes se pueden unir a ADN codificante de una proteína de interés y expresarse sin afectar

sus propiedades (Blanco, Cañete, y Pablos, 2014), formando quimeras que permiten analizar la interacción de moléculas (author, 2017) y, asimismo, localizar, rastrear, observar movilidad y metabolismo (Berg, Tymoczko, y Stryer, 2012).

2.4.1.1 Green Fluorescent Protein

Un fluoróforo de gran importancia es la proteína verde fluorescente (GFP) originalmente encontrada en la medusa *Aequorea victoria* (Jameson, 2014). Esta proteína consiste de 238 aminoácidos que se pliegan dando como resultado una estructura tridimensional en forma de barril (Jameson, 2014). GFP tiene una capacidad aprovechable, la cual es que el gen que la codifica puede fusionarse a cualquier otro y por lo tanto se puede marcar proteínas sin la necesidad de conjugación química (Jameson, 2014). Sin embargo, la fluorescencia de la proteína verde fluorescente original puede verse afectada por cambios en el pH, temperatura u oligomerización (Jameson, 2014).

2.4.1.2 mNeonGreen

Otro fluoróforo que ha cobrado gran importancia es el monómero fluorescente mNeonGreen desarrollado a partir de la proteína LanYFP de *Branchiostoma lanceolatum* (Shaner y cols., 2013; Steiert, Petrov, Schultz, Schwille, y Weidemann, 2018). Esta proteína tiene un espectro de absorción de 506 nm y uno de emisión de 517 nm por lo que genera una fluorescencia verde-amarillenta, con un brillo que decrece si el pH se aleja del neutro (Shaner y cols., 2013; Steiert y cols., 2018). mNeonGreen es más fotoestable y brillante que GFP, además no es sensible a variaciones de iones Cl^- y el tiempo de maduración es menor que en GFP (Shaner y cols., 2013). Con el fin de validar la posibilidad de usarse para marcaje, se expresaron (en *E. coli*) proteínas fusionadas en sus terminales N o C a mNeonGreen; lográndose observar a los polipéptidos de fusión en la localización adecuada junto a la generación de fluorescencia (Shaner y cols., 2013).



Figura 8: Estructura cristalográfica de mNeonGreen.
Fuente:(Clavel y cols., 2016).

CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍA

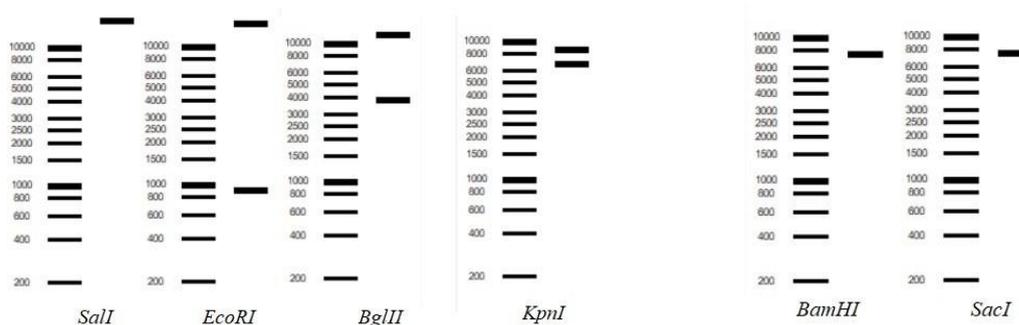
3.1. Cultivo del parásito

El laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas proveyó de los parásitos de *Leishmania mexicana* cultivados en forma de promastigote. El medio de cultivo en el que se mantuvo a los parásitos fue el Drosophila de Schneider suplementado con 10 % de BSF (Eurobio), 1 % de HEPES (Eurobio) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich); mantenido a una temperatura de 27°C.

Después de haber realizado las transfecciones, se utilizaron medios de selección que tenían la misma composición que el de proliferación con la diferencia de que para los parásitos transfectados con pTB007-Cas9-T7 se le adicionó higromicina (PhytoTechnology) a una concentración de $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$, mientras que los transfectados con el ADN donador se cultivaron con una concentración de G418 (Sigma Aldrich) de $80 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$.

3.2. Obtención de los plásmidos

Los plásmidos TB007 (figura 6) y PLOT-mNG-Neo-Neo (figura 7) que se utilizaron en este estudio fueron suministrados por la Sir William Dunn School of Pathology de la Universidad de Oxford. Posteriormente se los caracterizó con enzimas de restricción para confirmar las características descritas por Beneke y cols. (2017). Para ello se digirió a pTB007 con las enzimas Sall, EcoRI, BglII y KpnI; en donde cada una generaron fragmentos de diferente tamaño. Igualmente, se expuso a pPLOT-mNG a las enzimas *BamHI* y *SacI* que lo linearizaron.



(a) Número y tamaño de fragmentos esperados para pTB007 con las enzimas usadas. (b) Número y tamaño de fragmentos esperados para pPLOT-mNG.

Figura 9: Esquema de la caracterización esperada para los plásmidos. **a** pTB007 y **b** pPLOT-mNG.

3.3. Transformación de *Escherichia coli* con plásmidos TB007 y PLOT-mNG-Neo-Neo

Los plásmidos fueron introducidos por electroporación en *Escherichia coli* con el fin de mantenerlos y propagarlos, tanto para las PCRs como para las digestiones con enzimas de restricción. Para ello se colocaron 50 μL de bacterias electrocompetentes y $<5 \mu\text{L}$ de plásmido en un tubo de 0.6 mL frío. Después de 30 min de incubación en hielo, se transfirió el contenido a una cubeta de electroporación de 0.1 cm y se la colocó en un electroporador. Posteriormente, se dio un solo pulso de 1.8 kV, 25 μL y 200 Ω para inmediatamente colocar 950 μL de medio SOC en la cubeta, el contenido se transfirió a un tubo de 2 mL y se incubó a 37°C por una hora. Finalmente, las bacterias se plaquearon en medio Agar LB suplementado con Ampicilina (Amp) (Sigma Aldrich) ($\frac{100\mu\text{g}}{\text{mL}}$) y se incubaron a 37°C por toda la noche.

3.4. Extracción de plásmidos pTB007 y pPLOT-mNG a partir de *E. coli*-Lisis alcalina

Para recuperar el plásmido puro se cultivó *E. coli* en 5 mL de medio LB con Amp ($\frac{100\mu\text{g}}{\text{mL}}$) a 37°C durante 18 h. Después, se colocaron 1.5 mL del cultivo en un microtubo de 2 mL y se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se re-suspendió el pellet en 250 μL de la solución de Lisis I (glucosa [Thermo Scientific] 50 mM, Tris-HCl

[Thermo Scientific] 25 mM y EDTA [GTM] 10 mM) fría, se mezcló en un vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Luego se añadió 250 μL de solución de Lisis II (NaOH [Merck] 0.2 N y SDS [Thermo Scientific] 1 % ($\frac{w}{v}$)), se homogeneizó por inversión y se incubó en hielo. Luego de cinco minutos, se colocó 300 μL de solución de Lisis III (acetato de potasio [Sigma Aldrich] 5 M y ácido acético glacial [J.T. Baker] 11.5 % ($\frac{v}{v}$)) fría, se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a 4°C.

El sobrenadante fue dividido en dos microtubos de 2 mL, se añadió 2.5 volúmenes (1.2 mL) de etanol absoluto frío a cada tubo, se homogenizó por inversión y se incubó a -80°C por 30 min. Después, se centrifugaron los microtubos a 14 000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado con 1 mL de etanol al 75 % y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó, se dejó secar el pellet y se re-suspendió el plásmido en 50 μL de agua DEPC. El plásmido para uso inmediato se mantuvo a 4°C, caso contrario fue almacenado a -20°C hasta su uso. Una vez rehidratados los plásmidos, se procedió a cuantificarlos con un espectrofotómetro y a calcular tanto su concentración (en $\frac{ng}{\mu\text{L}}$) como su pureza ($\frac{260}{280}$ y $\frac{260}{230}$).

3.5. ARNsg y brazos de homología

Se seleccionó la región de la GP63 cercana al extremo 3' anterior a la señal de anclaje al GPI, debido a que no dañaría mayormente la estructura tridimensional de la metaloproteína, conservaría los sitios activos y permitiría el anclaje de la proteína de fusión al GPI. De esta manera, la escisión se dio en la posición 1586 del gen, por lo que además se requirió corregir el marco de lectura.

3.6. Diseño de primers

De acuerdo a la metodología de Dean y cols. (2015) se requieren de primers que amplifiquen la región 3' de la GP63 a la que se insertó la mNeon Green, incluyendo el codón de terminación y sitios de corte para enzimas de restricción a ambos lados, (*Bam*HI en 5' y *Sac*I en 3') para

poder ligar en el plásmido PLOT-mNG-Neo-Neo.

Una vez ligado en el plásmido, se necesitó de primers para poder amplificar todo el cassette que contenga la mNeon Green, la secuencia terminal de la GP63 y un gen de resistencia al G418 (un antibiótico análogo a la neomicina). Finalmente, se necesitó un par de primers que confirmen la presencia de mNeon Green en el genoma de *Leishmania*, en donde el forward debe anidarse en la zona no modificada de la GP63 y el reverse en la mNeon Green.

3.7. ADN single guide (sg)

El ADNsg se transcribió dentro de la célula dando lugar al ARNsg que se ensambló en la Cas9, diseñado según el protocolo de Beneke, y cols. (2017). Para ello se requirieron de dos oligos, el primero actuó como un primer forward que contenía el sitio promotor de la polimerasa de ARN T7, 20 bp que actuaron como guía y los 20 primeros bp que corresponden al "scaffold". Al contrario, el primer reverse contenía los 20 bp que se complementaron con el primer forward y los 40 bp restantes del scaffold.

Una vez obtenidos estos primers se realizó una PCR según el protocolo optimizado por Beneke y cols. (2017), que consta de 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 35 ciclos de desnaturalización (10 s a 98°C), annealing (30 s a 60°C) y extensión (15 s a 72°C). Los productos de PCR se guardaron a -20°C hasta su uso.

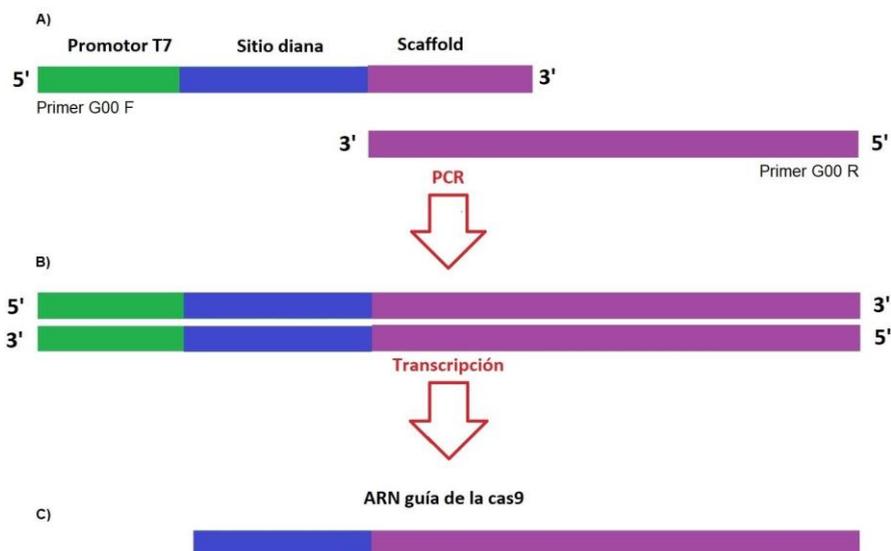


Figura 10: Obtención del ADNsg. En primer lugar, paso A, se realizó una PCR sin ADN molde en donde ambos primers, G00 F y G00 R, se complementaban y la polimerasa completó los espacios; lo que generó una doble hebra de ADNsg que se transfectó (paso B) en promastigotes de *L. mexicana* resistentes a hyg. Dentro del parásito se dio el paso C, la polimerasa de ARN T7 codificada en el plásmido TB007 transcribió al ADNsg en el ARN guía.

3.8. Amplificación de la secuencia de anclaje a GPI de GP63 (Inserto)

Debido a que fue necesario ligar la región C terminal GP63 al plásmido PLOT-mNG y para asegurar que la proteína de fusión se haya anclado a GPI, se realizó una PCR con los primers Gp63S-F y Gp63S-R (tabla 9) con Platinum Taq, utilizando ADN genómico como molde, y se añadió a los extremos 5' y 3' sitios de restricción para *BamHI* y *SacI*, respectivamente.

Tabla 2:

Programa de PCR para la amplificación del inserto a partir de ADN genómico.

Ciclos	Operación	T (°C)	tiempo
1X	Denaturación inicial	98	2 min
	Denaturación	98	20 s
35X	Annealling	66	30 s
	Elongación	72	30 s
1X	Elongación final	72	10 min
1X	Enfriamiento	4	∞

Tabla 3:

Mezcla máster de PCR para dos reacciones de amplificación y un control negativo para la amplificación de la secuencia terminal de GPI.

Reactivo	1X	3X
Agua DEPC	17.4 μ L	52.2 μ L
Buffer 10X	2.5 μ L	7.5 μ L
dNTPs (10 mM)	0.5 μ L	1.5 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μ L	2.25 μ L
DMSO (99.9 %)	0.75 μ L	2.25 μ L
Platinum Taq	0.1 μ L	0.3 μ L
Gp63S-F (10 mM)	1 μ L	3 μ L
Gp63S-R (10 mM)	1 μ L	3 μ L
ADN	1 μ L	-
Total	25 μL	75 μL

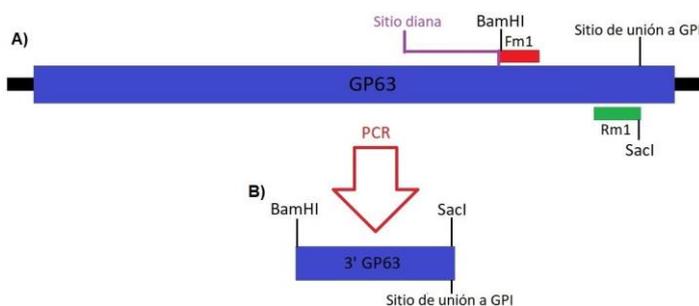


Figura 11: Amplificación de la región 3' de GP63. **A)** Unión de los primers en el gen de GP63 y **B)** amplicón que contiene el sitio de anclaje a GPI, un codón de terminación y sitios de restricción 5' para BamHI y 3' para SacI.

3.9. Corte con enzimas de restricción y ligación del inserto en el plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo

En primer lugar se realizó un corte con *SacI*, en donde se colocó en un microtubo de 1.5 mL, 20 μ g del plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo o 10 μ L del inserto para una reacción total de 30 μ L, según las recomendaciones del fabricante (Promega). La reacción se incubó a 37°C por dos horas y se procedió a precipitar el ADN con 3 μ L de acetato de sodio 3 M y 75 μ L de etanol absoluto. El microtubo se llevó a -80°C por 30 min, se centrifugó a 14 000 rpm por 30 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se colocó 50 μ L de etanol al 75 %, se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min, se eliminó el sobrenadante y se secó el tubo.

Una vez purificado el plásmido con el primer corte, se lo digirió con *BamHI*; después, al microtubo con el vector o inserto en pellet se le añadió 30 μL de reacción de digestión según la recomendación del fabricante (Promega), teniendo en cuenta que no se añadiría ADN extra. Se incubó a 37°C por 1h y 30 min, para luego inactivar la enzima a 65°C por 20 min.

Al haberse realizado ambos cortes en vector e inserto, se purificaron las reacciones con el kit Quick PCR Purification para eliminar los fragmentos menores a 300 nt. Después se ligaron 37.5 ng de vector y 12.5 ng de inserto en 10 μL de reacción de ligación según la recomendación del fabricante (Promega). La reacción se incubó por 3 horas a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche, y se tomaron 1.5 μL para transformar *E. coli* mediante electroporación.

Tabla 4:

Resumen de la digestión secuencial de pPLOT-mNG con SacI y BamHI.

Digestión secuencial	
<i>SacI</i>	2 horas
Precipitación con EtOH	-
<i>BamHI</i>	1 hora 30 min

3.10. Selección de colonias de *E. coli* con el plásmido PLOT-mNG modificado con el sitio de anclaje a GPI

Con el fin de identificar aquella colonia de *E. coli* que posea el plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo con el inserto, se utilizó una PCR con colonias tomadas directamente del plato Petri (PCR de colonias) con las siguientes condiciones:

Tabla 5:

Componentes de la PCR de colonias para screening de 15 colonias más un control negativo.

Reactivo	1X	16X
GoTaq Green 2X	12.5 μL	200 μL
Agua DEPC	10.5 μL	168 μL
LigS-F (10 mM)	1 μL	16 μL
LigS-R (10 mM)	1 μL	16 μL
Total	25 μL	400 μL

Tabla 6:*Programa para la PCR de colonias.*

Ciclos	Operación	T (°C)	tiempo
1X	Denaturación inicial	98	2 min
	Denaturación	98	20 s
35X	Annealing	62	50 s
	Elongación	72	30 s
1X	Elongación final	72	5 min
1X	Enfriamiento	4	∞

3.11. Transfección de *Leishmania mexicana* con el plásmido TB007 Cas9

T7 Tub

Se siguió el protocolo de Beneke y cols. (2017) con algunas modificaciones. Se utilizaron 10^7 parásitos, los cuales fueron centrifugados a $1300 \times g$ por 5 min y resuspendidos en 1 mL de buffer de electroporación Tb-BSF 1 \times (125 μ L de $CaCl_2$ 1.5 mM, 415 μ L de Tb-BSF 3 \times y 460 μ L de agua). Después se alicuotaron 200 μ L en una cubeta 4 mm BioRad y se añadieron 50 μ L de solución 0.2 μ g/ μ L de plásmido TB007 Cas9 T7 Tub. Posteriormente se realizaron dos pulsaciones con 25 μ F, 1500 V y una pausa de 10 s entre cada pulsación. Luego, se diluyó el contenido de las cubetas en una placa de 24 pocillos con 0.5 mL de medio Schneider Drosophila pre calentado, en donde se incubaron los parásitos de 8 a 16 h; para finalmente colocar 0.5 mL de medio Schneider Drosophila por pocillo además de 64 μ g de hyg. Posteriormente, se observaba el crecimiento de las poblaciones de cada pocillo a lo largo de 15 días, junto a un control, para asegurar que se generó una población resistente.

3.12. Transfección de *Leishmania mexicana* con ADN donador

El siguiente paso fue generar el ADN donador que contenía la proteína fluorescente, la región 3' de GP63 y el gen de resistencia. Por este motivo se amplificó este cassette a partir del plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo modificado, utilizando una Phusion Taq (NEB). Las condiciones de PCR fueron las siguientes.

Tabla 7:

Componentes de la PCR para cuatro reacciones más el control negativo.

Reactivo	1X	5X
Buffer Phusion Taq 5X	5 μL	25 μL
Agua DEPC	16 μL	80 μL
dNTPs (10 mM)	0.5 μL	2.5 μL
DMSO (99.9 %)	0.75 μL	3.75 μL
Phusion Taq	0.25 μL	1.25 μL
Cass-F (10 mM)	1 μL	5 μL
Cass-R (10 mM)	1 μL	5 μL
ADN	0.5 μL	-
Total	25 μL	125 μL

Tabla 8:

Programa de la PCR para amplificación del ADN donador.

Ciclos	Operación	T (°C)	tiempo
1X	Denaturación inicial	98	5 min
	Denaturación	98	30 s
35X	Annealing	62	30 s
	Elongación	72	3 min
1X	Elongación final	72	5 min
1X	Enfriamiento	4	∞

Para transfectar a *L. mexicana*, primero se dejó crecer a las células hasta la fase media logarítmica, se tomaron 6×10^7 parásitos mL^{-1} , se centrifugaron a $1300 \times g$ por 10 min y se re-suspendieron con 1 mL de un buffer de electroporación Tb-BSF $1 \times$. Posteriormente, se tomó el mL y se transfirió a un microtubo de 2 mL, se alicuotaron 200 μL en una cubeta de electroporación y se añadió 25 μL de ADN donador (cassette) y 25 μL de ADNsg (producto de PCR). Después, se realizaron dos pulsaciones con 25 μF , 1500 V y una pausa de 10 s entre cada pulsación. Luego, se diluyó el contenido de las cubetas en una placa de 24 pocillos con 0.5 mL de medio Schneider Drosophila precalentado, en donde se incubó los parásitos de 8 a 16 h, para finalmente colocar 0.5 mL de medio Schneider Drosophila por pocillo, que posea 80 $\frac{\mu g}{mL}$ G418 (Sigma Aldrich).

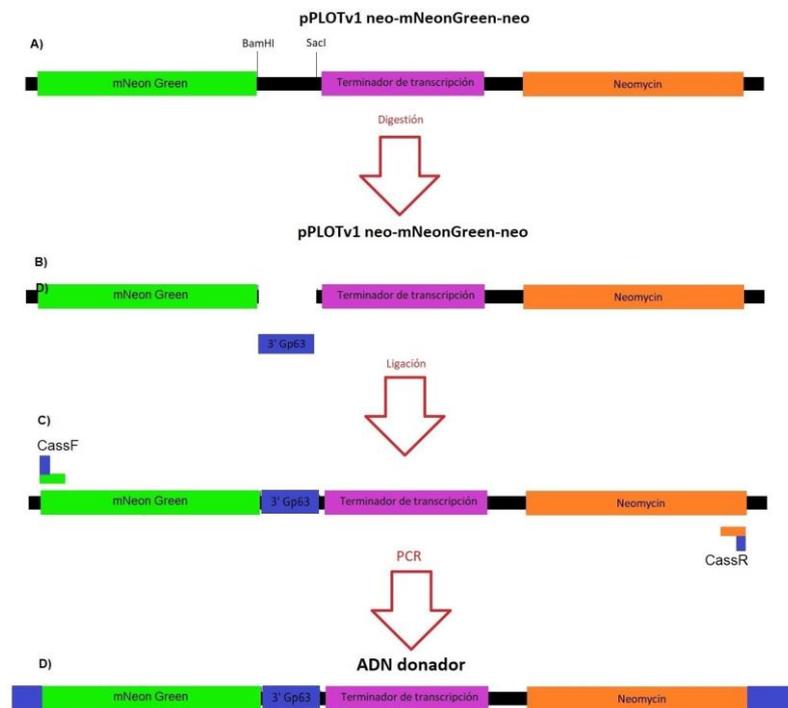


Figura 12: Generación del ADN donador. Se añadió la secuencia terminal de GP63 en la posición 3' de mNG. **A)** Digestión secuencial del plásmido pPLOT-mNG y al producto de PCR de los primers GP63s (ver tabla 9) con las enzimas de restricción BamHI y SacI. **B)** Ligación del fragmento de PCR en el plásmido pPLOT-mNG. **C)** Amplificación del cassette completo con los primers CassF y Cass R (véase tabla 9). Finalmente, este cassette fue usado como ADN donador junto al ADNsg, en promastigotes previamente transfectados con pTB007 que mostraban resistencia a hyg.

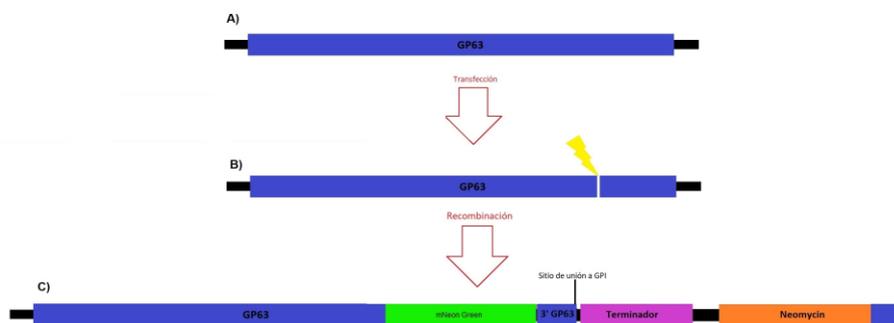


Figura 13: Inserción de mNeon Green en el gen de GP63. **A)** Gen wild-type de GP63. **B)** Cas9 junto al ARNg escinde la doble hebra de ADN del gen GP63 en el sitio diana. **C)** Recombinación del ADN donador con el ADN genómico e inserción del cassette con la proteína de marcaje (mNG) y un gen de resistencia a G418.

3.13. Microscopía de fluorescencia

A la población resistente a G418 se le expuso a luz azul en un microscopio de eplifluorescencia ix53 y a un microscopio automatizado Lionheart FX. En ambos casos se utilizó el filtro para GFP que excitó a la muestra a una longitud de onda de 469 nm y se observó la intensidad de fluorescencia emitida a 530 nm. Posteriormente, se recopilaron imágenes que después fueron limpiadas de ruido y superpuestas (en el caso de Lionheart).

3.14. PCR de confirmación de la recombinación

Se realizó una prueba para confirmar que el ADN donador esté en la región diana mediante una PCR. Para esto se diseñaron un par de primers que amplifiquen una región de 391 bp (para *L. mexicana* wild-type) o de aproximadamente 1000 bp (para *L. mexicana* transfectada y recombinada).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS

4.1. Diseño de primers

Los primers diseñados se listan en la tabla 9, como se puede observar el par G00 es de un tamaño mayor que los otros dado que estos no utilizan ADN como molde; de igual manera, los primers que se usaron para la amplificación del cassette son más grandes que el número usual (25 nt), no obstante estos sí utilizan amplifican ADN (pPLOT-mNG) pero añadieron 25 nt a cada lado como brazos de homología. Finalmente, el par GP63S poseía 12 nt en su terminal 5' como zona de interacción con enzimas de restricción y, después, se encuentran los sitios de restricción para *BamHI* en Gp63S-F y para *SacI* en Gp63S-R.

Tabla 9:

Primers diseñados para marcar con fluorescencia la proteína GP63 de L. mexicana.

Nombre	Secuencia	Amplificación/Función
CassF	GCCACGCGCACGTACAGCGTCCAGGTGGGTCTGGTAGTGGTTCCGG	Cassette
CassR	CCATGCCCAGCCTCTTCACGCCGTTTCCAATTTGAGAGACCTGTGC	Cassette
G00 F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTACAGCGTCCAGGTGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA	ADNsg
G00 R	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTGCTATTCTAGCTCTAAAAC	ADNsg
Gp63S-F	ATCTGCGTCCAGGGATCCGTGCGCGGCAGCAACGGCTA	Región 3' GP63
Gp63S-R	TCTAACAGCGTCGAGCTCTCAAGCTAGTGGGCCGTCCG	Región 3' GP63
LigS-F	GTTATACCACAGGAAACGGAAAGCG	PCR de colonias
LigS-R	TGCCATGAGAGAGAGCACCATTC	PCR de colonias

4.2. Caracterización con enzimas de restricción

Se incubaron a ambos plásmidos, pTB007 y pPLOT-mNG, con enzimas de restricción que tengan uno o dos sitios de corte, con el fin de asegurar su identidad. Si el número y tamaño de fragmentos observados en un gel de agarosa corresponden a los esperados (corte virtual), entonces se tendrían los plásmidos correctos. Como se puede observar en la figura 14 y 15 los cortes producidos sobre pTB007 y pPLOT-mNG, respectivamente, coinciden con los esperados que fueron realizados en el software Serial Cloner. Sin embargo, el fragmento de 1000 bp expulsado de pTB007 al digerirlo con *EcoRI* no se observa al estar en una concentración baja, por un bajo número de copia; asimismo, se puede evidenciar en la figura 15 que en la línea que corresponde al primer corte con *BamHI*, existe actividad estrella; la cual fue eliminada al optimizar la reacción de digestión.

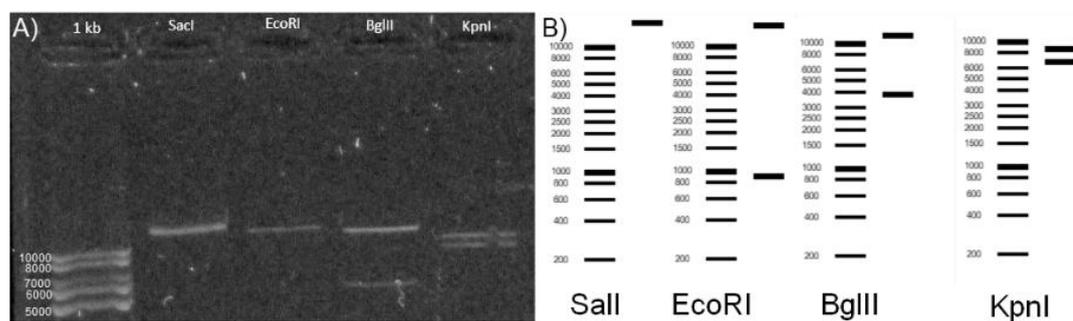


Figura 14: Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pTB007. **A)** Corte real del plásmido y **B)** Corte virtual. El número y tamaño de fragmentos tamaño coinciden para todos los casos; sin embargo, en el corte con *EcoRI* no se observa en agarosa el fragmento cercano a 1000 bp debido a que estaba en una concentración baja debido a la estequiometría. No obstante, sí se ve diferencia entre el fragmento mayor de *EcoRI* (13.000 bp) y el de *Sall* (14.000 bp).

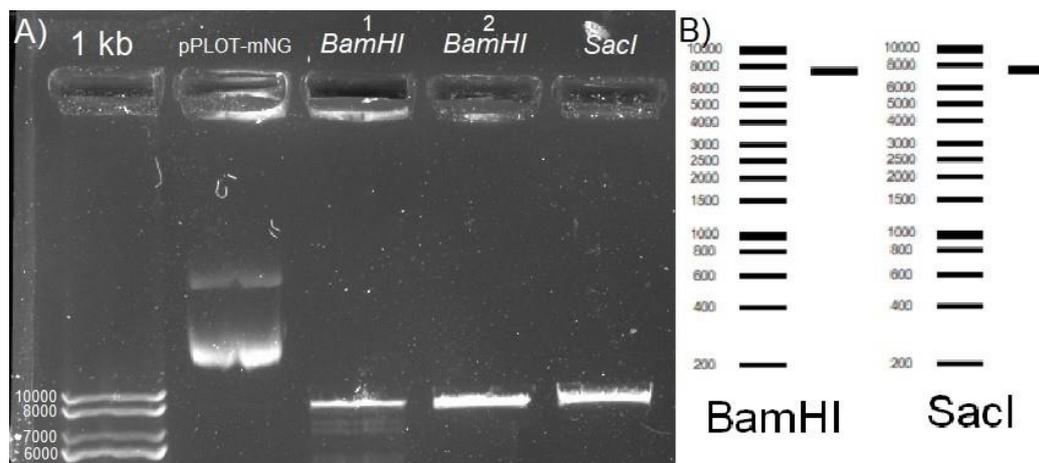


Figura 15: Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pPLOT-mNG. A) Corte real y B) Corte virtual. De igual manera que con pTB007, el número y tamaño de fragmentos obtenidos con *BamHI* y *SacI* coincide entre A) y B). En la primera línea de *BamHI* existe actividad estrella que fue corregida disminuyendo la concentración de enzima de $80 \frac{U}{\mu L}$ a $10 \frac{U}{\mu L}$.

4.3. Amplificación de la secuencia de anclaje a GPI de la proteína de membrana GP63

Se amplificó la región terminal de la proteína GP63 con el fin de insertarla en el vector que contiene la proteína fluorescente y de esta manera asegurar que la proteína de fusión se ancle a la membrana plasmática. La región terminal contenía una secuencia conservada que corresponde a una secuencia de anclaje a GPI a la cual se les sumaron sitios de corte para *BamHI* (5') y *SacI* (3'). En la imagen 15 se puede observar que se logró amplificar esta secuencia terminal, aunque parezca que en las líneas 5 y 6 la banda sea de mayor tamaño, este no es el caso dado que existió efecto sonrisa durante la migración del ADN en el gel.



Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para detección de un amplicón de 420 pb que corresponde a la región terminal del gen de Gp63. En la línea C- se encuentra el control negativo de reacción y en las líneas 1-6 reacciones de PCR de ADN genómico con los primers Gp63S-F y Gp63S-R.

4.4. Modificación del plásmido pPLOT-mNG-Neo-Neo y amplificación del cassette

Mediante una PCR de colonias se identificaron aquellas colonias de *E. coli* que contenían el vector modificado con el inserto. Los primers utilizados fueron LigS-F y LigS-R, en donde el primero se complementa a una zona 5' del sitio de corte con *Bam*HI, es decir en el plásmido original, y el primer reverse se une en la mitad del inserto; de manera que, únicamente, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 500 bp en aquellas colonias que contenían el inserto ligado al plásmido. Como se puede ver en la figura 17, las colonias 1, 2, 3 y 4 dieron positivo puesto que se observa un amplicón de aproximadamente 500 bp. En total, 6 de las 15 colonias seleccionadas para la PCR de colonias fueron positivas y se trabajó con dos de ellas.

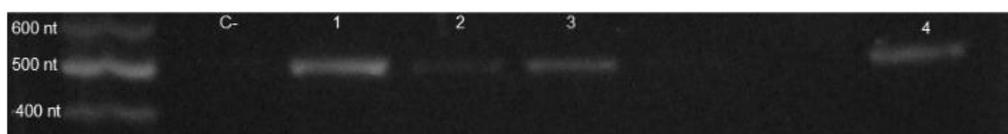


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de la PCR de colonias de *E. coli* con plásmidos de resistencia a ampicilina. Banda de 497 bp indica la presencia del plásmido pPLOT- mNG-Neo-Neo modificado. El control negativo se ubica en el pocillo marcado como C-, las colonias 1, 2, 3 y 4 (repetición).

El ADN donador (cassette completo amplificado de pPLOT-mNG) fue amplificado a partir del vector pPLOT-mNG-Neo-Neo modificado, con una Phusion Taq para asegurar que no existan mutaciones en la secuencia amplificada. Este cassette tenía aproximadamente 3100 bp y contenía la proteína fluorescente mNG, la señal de anclaje a GPI y el gen de resistencia a neomicina. Por este motivo, fue verificado al correrlo en un gel de agarosa al 1.2%, tal y como se puede contemplar en la figura 18.

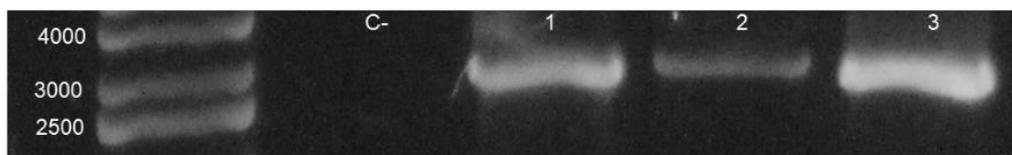


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del ADN donador. Las bandas de 3100 bp corresponden a amplificones del cassette que contenía la proteína fluorescente mNG, la señal de anclaje a GPI y el gen de resistencia a neomicina. El pocillo C- corresponde al control negativo, y los 1, 2 y 3 a reacciones de PCR.

4.5. Transfección de *Leishmania mexicana*

Después de la transfección se examinaron los pocillos con parásitos transfectantes. Se observó, en aquellas poblaciones de células transfectadas expuestas a $64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ hyg un número igual o mayor de parásitos que en el pocillo control, en el que se encontraba *L. mexicana* wild-type con hyg (tabla 10).

Tabla 10:

Selección de Leishmania mexicana transfectada, a los siete días. Las poblaciones (1-5) corresponden a promastigotes transfectados y expuestos al antibiótico.

Nombre del Pocillo	Número de parásitos
Control wild type sin antibiótico	1.92×10^6
Control wild type con antibiótico	1.50×10^6
Control transfectadas sin antibiótico	1.71×10^6
Población 1	1.76×10^6
Población 2	1.17×10^6
Población 3	1.97×10^6
Población 4	1.23×10^6
Población 5	1.28×10^6

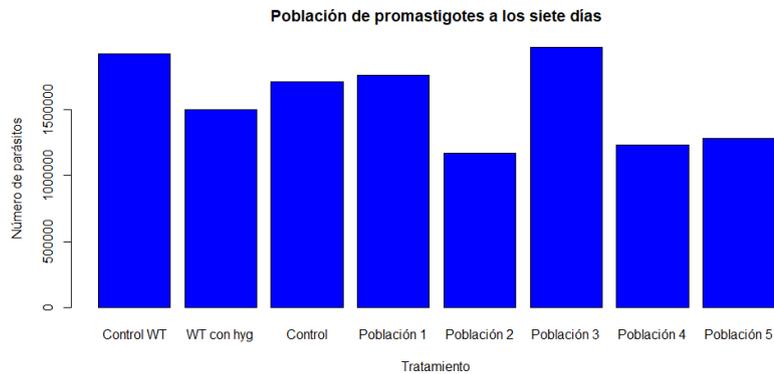


Figura 19: Comparación del número de parásitos entre los tratamientos. Las poblaciones (1-5) corresponden a promastigotes transfectados y expuestos al antibiótico. Estos datos corresponden a una única transfección y no se realizó un promedio debido a que se seleccionó a las dos poblaciones con mayor número de parásitos.

Asimismo, 14 días después de la segunda transfección con el ADN donador y el ADNsg se observaron a las células de *L. mexicana*, con el fin de valorar si se desarrolló una población resistente al segundo antibiótico (G418). Como se puede evidenciar en la figura 20, los promastigotes se encontraban dividiéndose lo que sugiere que los parásitos contenían el gen de resistencia.

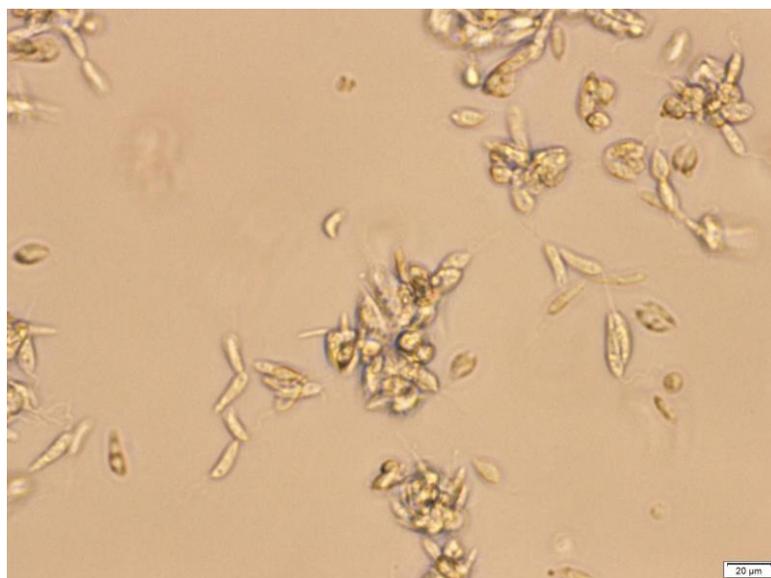


Figura 20: Células de *L. mexicana* en medio líquido con G418 como marcador de selección. Los promastigotes en la imagen se encuentran en rosetas (agrupaciones) que evidencia crecimiento. Lente de 60X. Campo claro.

4.6. Fluorescencia de *L. mexicana* transfectada

Se logró observar que los promastigotes de *L. mexicana* expuestos durante 13 días a G418 poseían una coloración verde cuando se les exponía a una longitud de onda cercana a 540 nm utilizando lentes de 60X y 20 X. Tal y como se puede evidenciar en las figuras 21 y 22. En esta última, la fluorescencia se concentra en el centro de las rosetas y no se evidencia en parásitos individuales.

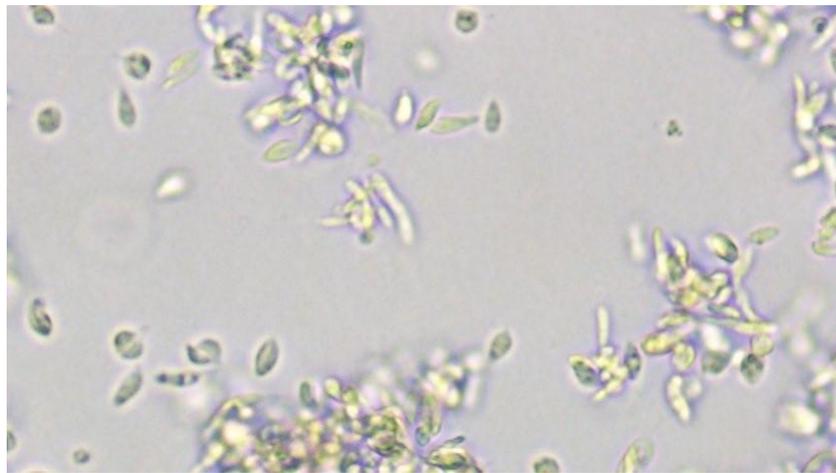


Figura 21: *Leishmania mexicana* transfectada vista en un microscopio de epifluorescencia. En esta imagen tomada en campo claro se puede presenciar la coloración verduzca de los promastigotes transfectados, expuestos durante 14 días al marcador de selección G418. Lente de 60X.

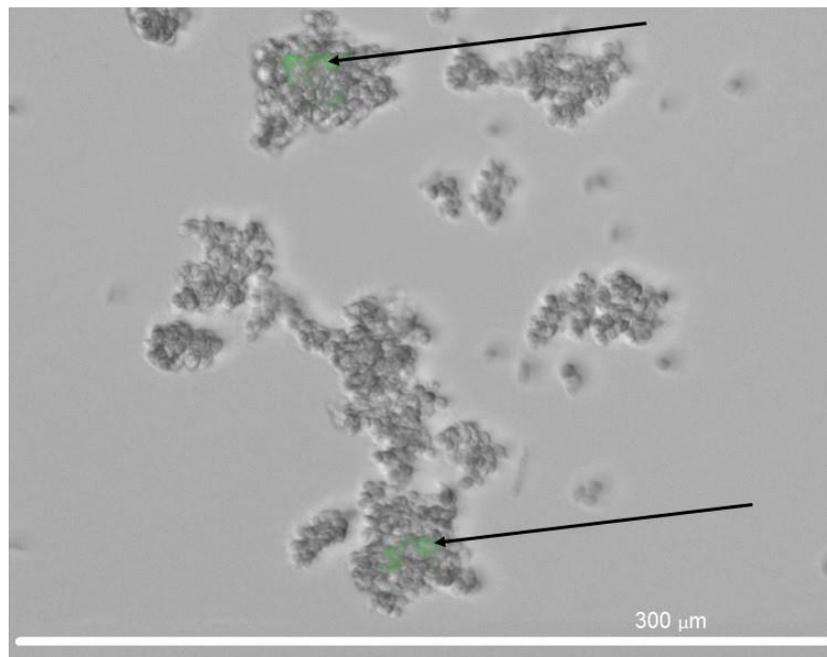


Figura 22: Rosetas (agrupamientos) fluorescentes de *L. mexicana*. Las flechas indican la zona donde se observó una tonalidad verde en las rosetas cuando se las exponía a luz azul. Lente de 20X, filtro GFP.

4.7. PCR de confirmación de la recombinación y seguimiento

Después de 15 días de crecimiento en medio con selección (G418) se procedió a la PCR de confirmación de recombinación. Se encontró que los fragmentos amplificados visibles de *L. mexicana* wild-type, transfectada con el plásmida TB007 y transfectada con el ADN donador, eran todos del mismo tamaño (≈ 391 bp) tal y como se puede observar en la figura 23. Se realizó lo mismo con promastigotes expuestos a G418 durante 22 días y se encontraron los mismos resultados (figura 24).

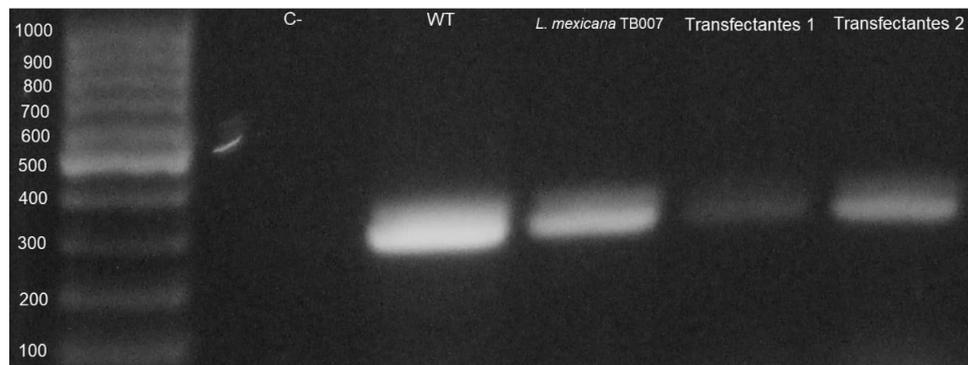


Figura 23: PCR de confirmación de recombinación. Se puede notar que los amplicones son del mismo tamaño (≈ 391 bp). Las muestras nombradas como pocillo (1 y 2) corresponden a células doblemente transfectadas.

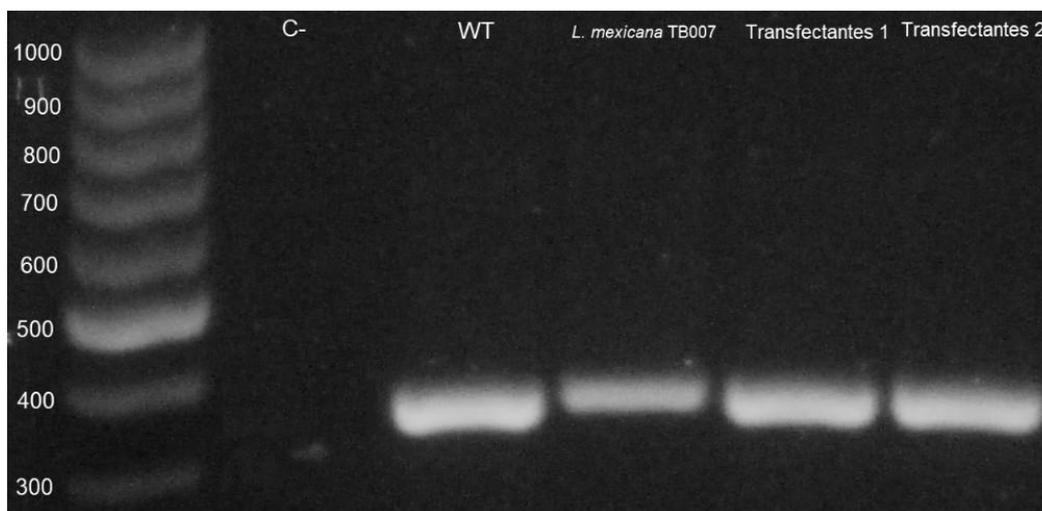


Figura 24: PCR de seguimiento. Las bandas obtenidas utilizando el ADN de promastigotes wild-type (WT), con la primera transfección (TB007) y seleccionados con G418 (transfectantes) permanecen del mismo tamaño (≈ 391 bp), sin observarse una banda de 1000 bp.

CAPÍTULO 5 - DISCUSIÓN

5.1. Transfección de *Leishmania mexicana*

El sistema que se utilizó en esta investigación requiere de dos plásmidos, uno que contenga a la Cas9 y polimerasa de ARN T7 (pTB007) y otro que se emplee como molde del que se extrae el gen de la proteína de fluorescencia (mNG, mCherry, YFP o mStrawberry) (Beneke y cols., 2017). Por ser tan importantes los plásmidos para que funcione la modificación de *L. mexicana* se procedió a caracterizarlos y, así, confirmar su identidad. Tal y como se puede ver en las figuras 14 y 15, los fragmentos creados por los cortes con enzimas de restricción corresponden a los esperados, corroborando la presencia de los plásmidos esperados.

No obstante, existió un inconveniente cuando se intentó digerir a pPLOT-mNG con *SacI* y *BamHI* en el mismo buffer. Ya que no se lograba distinguir, en el gel de agarosa, el fragmento de 172 bp liberado por ambas escisiones. Por ello se optó por asegurar ambos cortes con una digestión secuencial con cambio total de buffer. Gracias a ello se logró ligar exitosamente la sección terminal de GP63 que contiene la marca de anclaje a GPI en el plásmido pPLOT-mNG, tal y como se puede ver en la figura 17 de la PCR de colonias; en donde el 40% de las colonias que crecieron en el medio con Amp poseían el plásmido ligado.

Los promastigotes de *L. mexicana* fueron transfectados con un plásmido que contenía la Cas9 y la polimerasa de ARN T7, para después introducir el ADN donador y el ADNsg (Beneke y cols., 2017), pudiéndose esperar una tasa de transfección de una célula transfectante por cada 10^5 promastigotes. Después de la primera transfección, se logró observar una disminución del número de parásitos en el pocillo control varios días después de haber colocado el marcador de selección (hyg) y manteniéndose o aumentando la población en algunos pocillos que contenían promastigotes transfectados; lo cual coincide con lo expuesto por (Bolhassani y cols., 2011; Kapler, Coburn, y Beverly, 1990) que indican que se requiere de 15 a 20 días para seleccionar apropiadamente a los transfectantes. No obstante, esta situación dificulta en gran medida la se-

lección al no poder deshacerse completamente de las células wild-type.

De igual modo, en las figuras 20 y 21 se puede notar que la población de promastigotes se reproduce en medio suplementado con $80 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de G418, por lo que debe existir el cassette (ADN donador) cuando menos replicándose de manera episomal (Ouellette, 1994); ya que el gen de resistencia puede estar activo sin necesidad de que mNeonGreen se haya introducido en el lugar correcto. Es importante notar que en ambas selecciones (hyg y G418) se trabajó con dosis más altas que las recomendadas ($64 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ para hyg y $80 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$) (Beneke y cols., 2017) y aún así se obtuvo una población que podía dividirse. No obstante, la PCR end-point no evidenció la presencia de ninguno de los dos fragmentos de 1000 bp de ADN, sino solo los de 391 bp.

5.2. Fluorescencia de *L. mexicana* transfectada

Mediante microscopía de epifluorescencia se pudo observar una fluorescencia en individuos (figura 21) y en rosetas o agrupaciones (figura 22) a una longitud de onda cercana a 540 nm. No obstante, en un estudio realizado por la Universidad Ruprecht-Karls se evidenció que las mitocondrias de los promastigotes de *L. tarantolae* cultivados *in vitro* pueden tener autofluorescencia, con un pico máximo a 538 nm (Eckers y Deponete, 2012). Esto podría explicar el porqué se observó fluorescencia a una longitud de onda máxima diferente a la reportada para mNeonGreen, la cual es 517 (Shaner y cols., 2013).

5.3. PCR de confirmación de la recombinación y seguimiento

Como se puede determinar visualizando la figura 23, no se observa un fragmento de 1000 bp en ninguna población transfectante. Sin embargo, esto puede deberse a que la proporción de promastigotes con GP63 marcada con mNeonGreen es muy baja y, consecuentemente, la cantidad de ADN de transfectantes utilizado en el ensayo fue menor a la necesaria para generar fragmentos visibles utilizando una PCR convencional, por lo que se podría necesitar de otro

tipo de PCR para evaluar si existió transfección, como la ddPCR (Findlay, Vincent, Berman, y Postovit, 2016). Tomando en cuenta este resultado y al no observarse promastigotes fluorescentes a la longitud de onda de mNeonGreen, se puede considerar de que la cantidad de células transformantes es muy baja como para poder ser detectadas por estos métodos. Debido a esto, no es posible asegurar que haya existido recombinación pero tampoco descartar que no funcionan las transfecciones ya que los genes de resistencia se encuentran dentro de los parásitos transformados (resistencia a los marcadores de selección). Por ello es necesario esclarecer la situación seleccionando durante más tiempo a las células transfectantes y extraer el ADN en busca del fragmento de 1000 bp.

Por otro lado, existe la posibilidad de que el ADN donador no se haya insertado eficientemente en el genoma. Esto pudo haber sido producto de que el sitio diana no estaba disponible para la edición, dado que se ha visto que si selecciona una región en donde la cromatina esté cerrada, la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 disminuye (Jensen y cols., 2017). Que la conformación de la cromatina dificulte el acceso de proteínas en una región con un gen importante para la infección a macrófagos como es la GP63 (Bouvier, 2004; Joshia y cols., 2002; Baker y cols., 1999) generaría una desventaja en *L. mexicana* en la naturaleza; no obstante, el parásito usado en este proyecto se había mantenido durante generaciones en medio *Drosophila* de Schneider, fuera de los vectores y sin entrar en contacto con un organismo susceptible a infección; además, la presión de selección para mantener una proteína de infección era inexistente (Joshi, Kelly, Kamhawi, Sacks, y McMaster, 2002; Mottram, Coombs, y Alexander, 2004; Olivier, Atayde, Isnard, Hassani, y Shio, 2012).

A su vez, se ha evidenciado que los factores de virulencia de parásitos, GP63 es un factor de virulencia (Joshi y cols., 2002; Mottram y cols., 2004; Olivier y cols., 2012), bajan su expresión a medida que aumentan los pasajes *in vitro*; constatándose esta pérdida de proteínas de infección en *L. chagasi* (Beetham, Donelson, y Dahlin, 2003), *L. amazonensis* (Magalhaes y cols., 2014), *Trypanosoma cruzi* (Francisco y cols., 2017) y *Neospora caninum* (Bartley y cols., 2006). No se conoce a exactamente cuál es el mecanismo de regulación de expresión pero

ocurre en el núcleo y no en el ARNm del citoplasma (Beetham y cols., 2003). Debido a que un proceso nuclear disminuye la expresión se podría considerar al rearrreglo de la cromatina como el fenómeno causal, dado que ocurre normalmente en *Plasmodium falciparum* (Mackinnon y Read, 2004) y *Trypanosoma bruce* (Aresta-Branc, Pimenta, y Figueiredo, 2016) en la naturaleza para otros genes.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES

Se logró transfectar a promastigotes de *Leishmania mexicana*, la primera vez con el plásmido TB007 y la segunda vez con el ADN donador y el ADNsg, debido a que se recuperó una población resistente a los 14 días de haber introducido el ADN por electroporación, en ambos casos.

Posteriormente se logró observar fluorescencia en promastigotes doblemente transfectados mediante un microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de ≈ 540 nm, no obstante difería de la descrita para mNG y es similar a la de autofluorescencia de mitocondrias; por lo que la cantidad de parásitos marcados podría muy baja como para poder observarse o no se dio la recombinación.

En cuanto a la PCR de confirmación de recombinación, solo se observó el amplición de 391 bp que corresponde a una *L. mexicana* wild-typ. Lo cual puede deberse a que se necesita una mayor cantidad de parásitos marcados o que la eficiencia de edición del genoma fue baja.

En el seguimiento, se observó el mismo resultado de la primera PCR, dado que los amplicones observados se mantenían en 391 bp, sin observarse una banda a de 1000 bp, a pesar de que se mantuvo durante una semana más a los parásitos en medio de selección.

CAPÍTULO 7 - RECOMENDACIONES

Como primer punto, se podría considerar el transfectar a los promastigotes de *L. mexicana* utilizados en esta investigación con un par ADN donador-ADNsg que marquen otra proteína de membrana y así determinar si la proporción de parásitos modificados es baja o si la recombinación no tuvo lugar.

De igual manera, se debería probar el mismo procedimiento con otro fluoróforo, como el mCherry, para descartar la autofluorescencia de las flavoproteínas de la mitocondria, juntando la electroporación a otro método de transfección como lipofección con lipofectamina con el fin de aumentar la eficiencia de transfección.

Asimismo, sería preferible adicionar, como método molecular de confirmación, una técnica sensible de detección de proteínas como lo es Western blot y así confirmar o descartar si hubo éxito en el marcaje.

Finalmente, es necesario el mantener la presión de selección en la población resistente y verificar si existe un cambio en la fluorescencia o si, eventualmente, la población pierde la resistencia después de más pasajes en un medio suplementado con $80 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de G418.

Referencias

- Acosta, L. A., Mondragón Shem, K., Vergara, D., Vélez-Mira, A., Cadena, H., y Carrillo-Bonilla, L. (2013). Ampliación de la distribución de *Lutzomyia longipalpis* en el departamento de caldas: potencial aumento del riesgo de leishmaniasis visceral. *Biomédica*.
- Alawieh, A., Musharrafieh, U., Jaber, A., Berry, A., Ghosn, N., y Bizri, A. R. (2014). Revisiting leishmaniasis in the time of war: the syrian conflict and the lebanese outbreak. *International Journal of Infectious Diseases*.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., . . . den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*.
- Appasani, K. (Ed.). (2018). *Genome editing and engineering*. Cambridge University Press.
- Aresta-Branc, F., Pimenta, S., y Figueiredo, L. M. (2016). A transcription-independent epigenetic mechanism is associated with antigenic switching in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 44(7).
- Arnould, S., Perez, C., Cabaniols, J.-P., Smith, J., Gouble, A., Grizot, S., . . . Paques, F. (2007). Engineered i-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*.
- Aronson, N., Herwaldt, B., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., . . . Magil, A. (2017). Guidelines diagnosis and treatment of leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Aronson, N. E., y Joya, C. A. (2019). Cutaneous leishmaniasis updates in diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics of North America*.
- author, M. M. (2017). Single molecule analysis. En E. J. G. Peterman (Ed.), (cap. Fluorescent Labeling of Proteins). Springer.
- Baker, J., Muller, J., y Rollinson, D. (Eds.). (1999). *Advances in parasitology* (Vol. 43). Academic Press.
- Bard, E. (1989). Molecular biology of leishmania. *Biochemical Cellular Biology*.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyava, P., Moineau, S., . . . Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*.

- Bartley, P., Wright, S., Sales, J., Chianini, F., Buxton, D., y Innes, E. (2006). Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of neospora caninum in vivo. *Parasitology*, 133(4).
- Beetham, J. K., Donelson, J. E., y Dahlin, R. R. (2003). Surface glycoprotein psa (gp46) expression during short- and long-term culture of leishmania chagasi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131(2).
- Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., y Gluenz, E. (2017). A crispr cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *Open Biology*.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2012). *Biochemistry*. Basingstoke.
- Beverley, S., y Clayton, C. (1993). Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. En J. Hyde (Ed.), (cap. 25). Springer.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D., Trautman, J., Smith, J., Kim, Y., y Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular Cell Biology*.
- Bilichak, A., y Eudes, F. (2016). Genome stability. En O. K. Igor Kovalchuk (Ed.), (caps. Capítulo 12: Genetic Engineering of Plants Using Zn Fingers, TALENs, and CRISPRs). Academic Press.
- Blanco, F. J., Cañete, J. D., y Pablos, J. L. (2014). *Técnicas de investigación básica en reumatología*. Editorial Médica Panamericana.
- Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., . . . Rafati, S. (2011). Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable gfp expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology*.
- Borges, R., Horne, J., Melo, A., Vidal, J., Vieceli, F., Melo, M., . . . Yan, C. (2013). A detailed description of an economical setup for electroporation of chick embryos in ovo. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*.
- Bottone, E. (2006). *An atlas of clinical microbiology of infectious diseases* (Vol. 2). Taylor and Francis.
- Bouvier, J. (2004). Handbook of proteolytic enzymes. En N. R. Alan Barrett y F. Woessne (Eds.), (Segunda ed., p. 764-769). Academic Press.

- Brouns, S., Jore, M., Lundgren, M., Westra, E., Slijkhuis, R., Snijders, A., . . . van-der Oost, J. (2008). Small crispr rnas guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*.
- Brown, R., Sander, C., y Argos, P. (1985). The primary structure of transcription factor tffiiia has 12 consecutive repeats. *FEBS Letters*.
- Calvopiña, M., Loor, R., Lar, F., Zambrano, P., y Hashiguch, Y. (2012). Prevalencia y formas clínicas de las leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de pichincha - ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*.
- Cha-aim, K., Hoshida, H., Fukunaga, T., y Akada, R. (2012). Fusion per via novel overlap sequences. En J. Peccoud (Ed.), (cap. 8). Springer Protocolls.
- Chalfie, M., y Kain, S. R. (Eds.). (2005). *Green fluorescent protein: Properties, applications and protocols*. John Wiley and Sons.
- Chandrasekharan, S., Kumar, S., Valley, C., y Rai, A. (2009). Proprietary science, open science and the role of patent disclosure: the case of zinc-finger proteins. *Nature Biotechnology*.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., . . . Voytas, D. F. (2010). Targeting dna double-strand breaks with tal effector nucleases. *Genetics*.
- Clavel, D., Gotthard, G., von Stetten, D., Sanctis, D. D., Pasquier, H., Lambert, G. G., . . . Royant, A. (2016). Structural analysis of the bright monomeric yellowgreen fluorescent protein mneongreen obtained by directed evolution. *Structural Biology*.
- Clemens, Grabher, Joly, J.-S., Joachim, y Wittbrodt. (2004). Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease i-scei. *Methods in Cell Biology*.
- Crommelin, D., Sindelar, R., y Meibohm, B. (Eds.). (2019). *Pharmaceutical biotechnology*. Springer.
- Daboussi, F., Stoddard, T., y Zhang, F. (2015). Advances in new technology for targeted modification of plant genomes. En F. Zhang, H. Puchta, y J. Thomson (Eds.), (cap. Engineering Meganuclease for Precise Plant Genome Modification). Springer.
- Day, R. N., y Davidson, M. W. (Eds.). (2014). *The fluorescent protein revolution*. CRC Press.
- Dean, S., Sunter, J., Wheeler, R., Hodkinson, I., Gluenz, E., y Gull1, K. (2015). A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biology*.

- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J., . . . Yan, N. (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*.
- De Pater, S., Neuteboom, L., Pinas, J., Hooykaas, P., y Van Der Zaal, B. (2009). ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology Journal*.
- dos Santos-Costa, S., de Assis-Golim, M., Rossi-Bergmann, B., Trindade-Costa, F., y Selma, G. (2011). Use of in vivo and in vitro systems to select *Leishmania amazonensis* expressing green fluorescent protein. *Korean J Parasitol*, 49(4), 357-364.
- Doudna, J., y Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*.
- Eckers, E., y Deponte, M. (2012). No need for labels: The autofluorescence of *Leishmania tarentolae* mitochondria and the necessity of negative controls. *PLOS ONE*, 7(10).
- Ejazi, S. A., Bhattacharyya, A., Choudhury, S. T., Ghosh, S., Sabur, A., Pandey, K., . . . Ali, N. (2018). Immunoproteomic identification and characterization of *Leishmania* membrane proteins as non-invasive diagnostic candidates for clinical visceral leishmaniasis. *Nature Scientific Reports*.
- Elmahallawy, E., Martínez, A., Rodríguez, J., Hoyos, Y., Agil, A., Navarro, J., y Gutiérrez, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*.
- Epinat, J., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Puzin, C., . . . Lacroix, E. (2003). A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*.
- Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., . . . Felgner, P. L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., . . . Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Findlay, S. D., Vincent, K. M., Berman, J. R., y Postovit, L.-M. (2016). A digital PCR-based method for efficient and highly specific screening of genome edited cells. *PLOS ONE*.

- Francisco, J. S., Barría, I., Gutiérrez, B., Neira, I., Muñoz, C., Sagua, H., . . . González, J. (2017). Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of trypanosoma cruzi trypomastigote virulence. *Microbes and Infection*, 19(1).
- Gilbert, L., Larson, M., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G., Torres, S., . . . Qi, L. (2013). Crispr-mediated modular rna-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*.
- González, C., Wang, O., Strutz, S., González-Salazar, C., Sánchez-Cordero, V., y Sarkar, S. (2010). Climate change and risk of leishmaniasis in north america: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Guevara, P., Pinto-Santini, D., Rojas, A., Crisante, G., Añez, N., y Ramirez, J. L. (2001). Green fluorescent protein-tagged leishmania in phlebotomine sand flies. *Journal of Medical Entomology*.
- Ha, S., Schwarza, J., Turco, S., y Beverle, S. (1996). Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected leishmania. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., y Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of crispr/cas system. *Cell Research*.
- Handler, M., Patel, P., Kapila, R., Al-Qubati, Y., y Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
- Hilley, J. D., Zawadzki, J. L., McConville, M. J., Coombs, G. H., y Mottram, J. C. (2017). Leishmania mexicana mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (gpi):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of gpi-anchored proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4).
- Hilton, I., D'Ippolito, A., Vockley, C., Thakore, P., Crawford, G., Reddy, T., y Gersbach, C. (2015). Epigenome editing by a crispr-cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*.
- Horvath, P., y Barrangou, R. (2008). Crispr/cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*.
- Hotez, P., Molyneux, D., Fenwick, A., Ottesen, E., Sachs, S. E., y Sachs, J. D. (2006). Incorpor-

- rating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for hiv/aids, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.*
- Ilgoutz, S. C., y McConville, M. J. (2001). Function and assembly of the leishmania surface coat. *International Journal for Parasitology*, 31.
- Jameson, D. (2014). *Introduction to fluorescence*. Taylor and Francis.
- Jensen, K. T., Floe, L., Petersen, T. S., Huang, J., Xu, F., Bolund, L., . . . Lin, L. (2017). Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect crispr-cas9 gene editing efficiency. *FEBS Letters*.
- Joshi, P. B., Kelly, B. L., Kamhawi, S., Sacks, D. L., y McMaster, W. (2002). Targeted gene deletion in leishmania major identifies leishmanolysin (gp63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Joshia, P., Kelly, B., Kamhawi, S., Sack, D., y McMaster, R. (2002, Marzo). Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (gp63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1), 33-40.
- Kapler, G. M., Coburn, C. M., y Beverly, S. M. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Molecular And Cellular Biology*,
- Kato, H., Gomez, E., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., . . . Hashiguchi, Y. (2016). Geographic distribution of *Leishmania* species in ecuador based on the cytochrome b gene sequence analysis. *Neglected Tropical Diseases*.
- Kilma, P. (2007). The amastigote forms of leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal of Parasitology*.
- Kim, Y., Cha, J., y Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to fok i cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Kovalchuk, I., y Kovalchuk, O. (Eds.). (2016). *Genome stability*. Academic Press.
- Kuijpers, N., Chroumpi, S., Vos, T., Solis-Escalante, D., Bosman, L., Pronk, J., . . . Daran-Lapujade, P. (2013). One-step assembly and targeted integration of multigene constructs assisted by the i-scei meganuclease in *saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*.
- Kumar, V., y Jain, M. (2015). The crispr-cas system for plant genome editing: advances and

- opportunities. *Journal of Experimental Botany*.
- Kurnaz, I. (2015). *Techniques in genetic engineering*. CRC Press.
- Lainson, R., y Shaw, J. J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in latin-america. *Nature*.
- Lawyer, P. G., Young, D. G., Butler, J. F., y Akin, D. E. (1987). Development of leishmania mexicana in lutzomyia diabolica and lutzomyia shannoni (diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*.
- LeBowitz, J., Coburn, C., McMahon, D., y Beverley, S. (1990). Development of a stable leishmania expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Lee, G.-H., y Aung, M. M. (2016). Modern tools for genetic engineering. En M. Kormann (Ed.), (cap. Gene Correction Technology and Its Impact on Viral Research and Therapy). ExLi4EvA.
- Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D. P., y Yang, B. (2011). Tal nucleases (talns): hybrid proteins composed of tal effectors and foki dna-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*.
- Lian, J., Hamedirad, M., y Zhao, H. (2018). Advancing metabolic engineering of saccharomyces cerevisiae using the crispr/cas system. *Biotechnology Journal*.
- Lloyd, A., Plaisier, C., Carroll, D., y Drews, G. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Lu, J., Shao, Y., Qin, X., Liu, D., Chen, A., Li, D., . . . Wang, X. (2017). Crispr knockout rat cytochrome p450 3a1/2 model for advancing drug metabolism and pharmacokinetics research. *Scientific Reports*.
- Mackinnon, M. J., y Read, A. F. (2004). Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLOS Biology*.
- Magalhaes, R. D. M., Duarte, M. C., Mattos, E. C., Martins, V. T., Lage, P. S., Chavez-Fumagalli, M. A., . . . Coelho, E. A. F. (2014). Identification of differentially expressed proteins from leishmania amazonensis associated with the loss of virulence of the parasites. *PLOS ONE*,8(4).

- Mak, A., Bradley, P., Cernadas, R., Bogdanove, A., y Stoddard, B. (2012). The crystal structure of tal effector pthx01 bound to its dna target. *Science*.
- Marin-Iniesta, F., y Marin-Luango, F. (1982). *Manual para el diagnóstico de leishmaniasis*. EDITUM.
- McConville, M., y Ferguson, M. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical Journal*.
- Metcalf, P., y Etges, R. (2006). Handbook of metalloproteins. En W. B. Albrecht Messerschmidt y M. Cygler (Eds.), (Vol. 3, cap. Zinc). Wiley.
- Meunier, Y. (2014). *Tropical diseases: A practical guide for medical practitioners and students*. Oxford University Press.
- Miller, J., McLachlan, A., y Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor iiiA from xenopus oocytes. *The EMBO Journal*.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., . . . Rebar, E. J. (2011). A tale nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C., Ranzani, M., y Benedicenti, F. (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of hsc gene therapy. *Journal of Clinical Investigations*.
- Morris, M. C. (Ed.). (2013). *Fluorescence-based biosensors* (Primera ed., Vol. 113). Academic Press.
- Mottram, J. C., Coombs, G. H., y Alexander, J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of leishmania. *Current Opinion in Microbiology*.
- Nandana, D., Trana, T., Trinha, E., Silverman, J., y Lopez, M. (2007). Identification of leishmania fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a novel activator of host macrophage src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase shp-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Nayaka, R., Sahasrabudde, A., Bajpai, V., y Gupta, C. (2005). A novel homologue of coronin colocalizes with actin in filament-like structures in leishmania. *Molecular and Biochemi-*

cal Parasitology.

- Nicholl, D. (2012). *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press.
- Observatory, G. H. (2018). *Leishmaniasis: Situation and trends*. Fact sheet.
- Ogino, H., McConnell, W., y Grainger, R. M. (2006). High-throughput transgenesis in xenopus using i-scei meganuclease. *Nature Protocols*.
- Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., y Shio, M. T. (2012). Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease gp63. *Microbes and Infection*.
- OMS. (2018a, Marzo). *Leishmaniasis*. Fact sheet.
- OMS. (2018b). *The question of genome manipulation in human embryos*.
- Orlando, S., Santiago, Y., DeKolver, R., Freyvert, Y., Boydston, E., y Moehle, E. (2010). Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Research*.
- Orlando, S. J., Santiago, Y., DeKolver, R. C., Freyvert, Y., Boydston, E. A., Moehle, E. A., . . . Cost, G. J. (2010). Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Research*.
- Ouellette, B. P. G. R. M. (1994). Autonomous replication of bacterial dna plasmid oligomers in leishmania. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Pallás, V. (Ed.). (2008). *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. Mundi-Prensa Libros.
- Pan, F. C., Chen, Y., Loeber, J., Henningfeld, K., y Pieler, T. (2006). I-scei meganuclease-mediated transgenesis in xenopus. *Developmental Dynamics*.
- Paulick, M. G., y Bertozzi, C. R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*.
- Pawar, H., Renuse, S., Khobragade, S., Chavan, S., Sathe, G., Kumar, P., . . . Pandey, A. (2014). Neglected tropical diseases and omics science: Proteogenomics analysis of the promastigote stage of leishmania major parasite. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(8).
- Pelletier, S. (2016). Genome editing. En K. Turksen (Ed.), (cap. Genome Editing with Targetable Nucleases). Springer International.
- Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., . . . Zhang, P. (2015). Production of human albumin in pigs through crispr/cas9-mediated knockin of human cdna into swine

- albumin locus in the zygotes. *Scientific Reports*.
- Polstein, L., y Gersbach, C. (2015). A light-inducible crispr-cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nature Chemical Biology*.
- Potter, H., y Heller, R. (2010). Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Pruett-Miller, S., Connelly, J. P., Maeder, M. L., Joung, J. K., y Porteus, M. H. (2008). Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells. *Molecular Therapy*.
- Ran, F., Hsu, P., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D., y Zhang, F. (2013). Genome engineering using the crispr-cas9 system. *Nature Protocols*.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in europe. *Eurosurveillance*.
- Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., y Gaur, D. (2015). Multiprotein complex between the gpi-anchored cyrpa with pfrh5 and pfripr is crucial for plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Science*.
- Reithinger, R., y Dujardin, J.-C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (Tercera ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Roy, G., Dumas, C., Sereno, D., Wu, Y., Singh, A., Tremblay, M., . . . Papadopoulou (2000). Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Sander, J., y Joung, K. (2014). Crispr-cas systems for editing, regulating and targeting genome. *Nature Biotechnology*.
- Santiago, Y., Chan, E., Liu, P.-Q., Orlando, S., Zhang, L., Urnov, F. D., . . . Collingwood, T. N. (2008). Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Sádlová, J., Volf, P., Victoir, K., Dujardin, J.-C., y Votýpka, J. (2006). Virulent and attenuated

- lines of leishmania major: Dna karyotypes and differences in metalloproteinase gp63. *Folia Parasitologica*, 53, 81–90.
- Shalem, O., Sanjana, N., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D., Mikkelsen, T., . . . Zhang, F. (2013). Genome-scale crispr-cas9 knockout screening in human cells. *Science*.
- Shaner, N., Lambert, G., Chamma, A., Ni, Y., Cranfill, P., Baird, M., . . . Wang, J. (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nature America*.
- Shi, S., Liang, Y., Zhang, M., Ang, E., y Zhao, H. (2016). A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*.
- Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., y Paques, F. (2011). Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: Perspectives and challenges for gene therapy. *Current Gene Therapy*.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F., Reddy, A., Chandrasegaran, S., y Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger dna-recognition domains. *Nucleic Acids Research*.
- Soroldoni, D., Hogan, B., y Oates, A. (2009). Simple and efficient transgenesis with meganuclease constructs in zebrafish. *Zebrafish*.
- Steiert, F., Petrov, E., Schultz, P., Schwill, P., y Weidemann, T. (2018). Photophysical behavior of mneongreen, an evolutionarily distant green fluorescent protein. *Biophysical Journal*.
- Sunter, J., y Gull, K. (2017). Shape, form, function and leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *The Royal Society Publishing*.
- Szcepek, M., Brondani, V., Buchel, J., Serrano, L., Segal, D., y T., C. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*.
- Thiakaki, M., Kolli, B., Chang, K.-P., y Soteriadou, K. (2006, Mayo). Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in balb/c mice. *Microbes and Infection*, 8(6), 1455-1463.
- Tovkach, A., Zeevi, V., y Tzfira, T. (2009). A toolbox and procedural notes for characterizing

- novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells. *Plant Journal*.
- Traver, B., Anderson, M., y Adelm, Z. (2009). Homing endonucleases catalyze double-stranded dna breaks and somatic transgene excision in aedes aegypti. *Insect Molecular Biology*.
- Uribarren, T. (2017, Marzo). *Leishmaniosis*.
- Valeur, B., y Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular fluorescence* (Segunda ed.). Wiley-VCH.
- Wang, Y., Zhou, X.-Y., Xiang, P.-Y., Wang, L.-L., Tang, H., Xie, F., . . . Wei, H. (2014). The meganuclease i-scei containing nuclear localization signal (nls-i-scei) efficiently mediated mammalian germline transgenesis via embryo cytoplasmic microinjection. *PLOS ONE*.
- Webb, H., Carnall, N., Vanhamme, L., Rolin, S., Abbeele, J. V. D., Welburn, S., . . . Carrington, M. (1997). The gpi-phospholipase c of trypanosoma brucei is nonessential but influences parasitemia in mice. *Journal of Cell Biology*.
- Yao, C., Donelson, J., y E.Wilson, M. (2003, Noviembre). The major surface protease (msp or gp63) of *Leishmania sp.* biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132(1), 1-16.
- Young, J. J., Cherone, J. M., Doyon, Y., Ankoudinova, I., Faraji, F. M., Lee, A. H., . . . Zeitler, B. (2011). Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog xenopus tropicalis using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Yu, L., Batara, J., y Lu, B. (2015). Application of genome editing technology to microrna research in mammals. *IntechOpen*.
- Zhang, W.-W., Lypaczewski, P., y Matlashewski, G. (2017). Optimized crispr-cas9 genome editing for leishmania and its use to target a multigene family, induce chromosomal translocation, and study dna break repair mechanisms. *mSphere*.
- Zhang, W.-W., y Matlashewski, G. (2015). Crispr-cas9-mediated genome editing in leishmania donovani. *mBio*.