

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN
GÉNICA EN LOS PROCESOS DE
DIFERENCIACIÓN DE “LEISHMANÍA
INFANTUM” MEDIANTE MICROARRAYS DE
ADN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pedro José Alcolea Alcolea

Bajo la dirección del doctor

Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-694-2067-6

© Pedro José Alcolea Alcolea, 2010

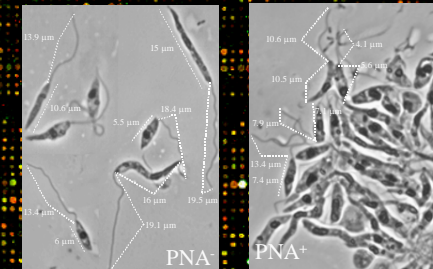
Esta Tesis Doctoral está basada en el análisis de los perfiles de expresión génica diferencial en los procesos de diferenciación que tienen lugar en el ciclo biológico de *Leishmania infantum*, agente etiológico de la leishmaniasis humana y canina en la cuenca mediterránea. Para abordar el estudio, se construyeron *microarrays* que representan el genoma completo del parásito a partir de una genoteca y se realizaron análisis de hibridación para la detección de genes diferencialmente expresados. En concreto, se realizaron análisis transcriptómicos de los promastigotes procedentes de cultivo axénico y del tubo digestivo del flebotomo, díptero vector de la enfermedad, las subpoblaciones de promastigotes procíclicos y metacíclicos en fase estacionaria de cultivo axénico y la influencia del aumento de la temperatura y la acidificación en la diferenciación del promastigote al amastigote. El análisis conjunto de los datos ha permitido obtener información global acerca de los procesos de diferenciación.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Centro de Investigaciones Biológicas

Análisis de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de *Leishmania infantum* mediante *microarrays* de ADN



TESIS DOCTORAL
Pedro José Alcolea Alcolea
Madrid, 2010



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Centro de Investigaciones Biológicas

**Análisis de los perfiles de expresión génica
en los procesos de diferenciación de
Leishmania infantum mediante
microarrays de ADN**

Tesis doctoral

Pedro José Alcolea Alcolea

Director: Prof. Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Madrid, 2010

Memoria presentada por Pedro José Alcolea Alcolea
para optar al Grado de Doctor en Biología por la
Universidad Complutense de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Madrid) bajo la dirección del Prof. Vicente Larraga Rodríguez de Vera con una beca predoctoral I3P (Itinerario Integrado de Inserción Profesional) del CSIC.



D. Vicente Larraga Rodríguez de Vera, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

Certifica:

Que la Tesis Doctoral titulada *“Análisis de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de Leishmania infantum mediante microarrays de ADN”*, de la que es autor el Licenciado en Biología D. Pedro José Alcolea Alcolea, ha sido realizada bajo su dirección en el laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas y cumple los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor en Biología.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado autorizando su presentación a veintitrés de abril de dos mil diez.

Dr. Vicente Larraga Rodríguez de Vera

A mis padres

A mi abuela

A.L.D., M.L.C., I.T.L., M.P.J.A., N.A.L., A.A.L., M.F.A

In memoriam

Agradecimientos

“En ambiente favorable, hasta el apocado siente crecer sus fuerzas; un medio hostil o indiferente abate el ánimo mejor templado”. Tras exponer la importancia que tiene la perseverancia y otras virtudes en la investigación científica, D. Santiago Ramón y Cajal escribió este enunciado en “Reglas y Consejos sobre Investigación Científica” o “Los Tónicos de la Voluntad”. Desde hace tiempo he tenido la gran suerte de contar con la ayuda y el apoyo de muchas personas en el terreno profesional y personal que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral, por lo que me siento plenamente satisfecho.

En primer lugar, agradezco al Profesor Vicente Larraga que me haya otorgado la oportunidad de desarrollar esta Tesis Doctoral en su laboratorio de Parasitología Molecular y que me haya transmitido sus conocimientos, su experiencia y su apoyo.

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Ana Alonso su gran contribución al desarrollo del estudio, su ayuda y orientación científica y personal y, en definitiva, su amistad.

Ha sido también una gran experiencia haber contado con la ayuda del Dr. Rafael Giraldo y de la Dra. Alicia Sánchez en las etapas iniciales del proyecto, por lo que les estoy muy agradecido.

Agradezco la oportunidad de haber desarrollado una parte importante de esta Tesis Doctoral en el Centro de Astrobiología (INTA-CSIC, Torrejón de Ardoz) al Dr. Juan Pérez. En el laboratorio de Ecología Molecular de dicho centro, la colaboración del Dr. Víctor Parro y la Dra. Mercedes Moreno ha sido esencial para el desarrollo del estudio, ya que nos han transmitido su experiencia en el campo de la Genómica Funcional para poder desarrollar la construcción de los *microarrays* y los análisis de expresión génica diferencial. Agradezco también la contribución del Dr. Manuel Gómez, de la Unidad de Secuenciación y Bioinformática del CAB, que ha realizado el ensamblaje y el análisis de las secuencias y ha contribuido en otros aspectos relacionados con el análisis de los datos. En la misma unidad, he podido contar con la ayuda de Marina Postigo para la secuenciación de todos los clones seleccionados en los análisis de expresión. También he podido contar con la orientación del Dr. Eduardo González y el Dr. Francisco Ferrezuelo.

He tenido la oportunidad de contar con la colaboración del Dr. Alfredo Toraño y la Dra. Mercedes Domínguez, del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda), que han aportado valiosas ideas en diversos aspectos científicos y técnicos y me han permitido desarrollar en su laboratorio una parte importante de los procedimientos, por lo que les estoy muy agradecido. Asimismo, agradezco al Dr. Ricardo Molina su contribución imprescindible en el análisis de los promastigotes extraídos del tubo digestivo del flebotomo.

Gracias a todos mis compañeros del CIB por su cercanía y su apoyo: a Irene, M^a Ángeles, María Colmenares, Amaya, Fátima, Ana Lázaro, Guillermo y

Sandra, que estuvieron trabajando en el laboratorio, y a Abel y Miguel, que actualmente están realizando su Tesis; a nuestros vecinos, Ana “Peces”, Luis Guaita, Sara, Silvia y Mercedes; y a otros compañeros del centro, María “Hellín”, Luque, Javier, Eugenia, Pilar, Mar, Andrea, Eva, María Moreno, Fátima, Eli, Benet, Juan, Ana M. Hernández, Ramón Díaz, Elena Fernández, Ana Serrano, Alicia Rodríguez, Andrés Fernández y Carmen Terrón. Gracias a Inma, del ISCIII, a Eduardo Gil y Marta Godoy del CNB y a Ana Peris, de la Universidad de Zaragoza.

Agradezco a mis compañeros Patxi, Luis Rivas, Yolanda, Miriam, Graciela, Carolina, Salvador, Olga, Jorge, Patricia Garrido y Elena que hayan hecho de mi estancia en el CAB una experiencia inolvidable, y en especial a Patricia Cruz, que me ha transmitido siempre su entusiasmo y su alegría.

No puedo olvidar mencionar a Antonio Galiana, al que agradezco que me haya transmitido sus conocimientos en su laboratorio de análisis clínicos y que me haya estimulado siempre a trabajar en la investigación.

Gracias a mis amigos del Colegio Mayor, Alberto, Alejandro, Álvaro, Pablo, Ramón y Raúl, con los que he podido contar también durante estos años de trabajo. Gracias también a mis amigos David, Juan y Diego.

Han sido importantes las numerosas ocasiones en las que he podido reponer fuerzas a través de mi gran afición, la música, para continuar con el trabajo del laboratorio. Agradezco a todos mis compañeros de la Unión Musical de Pozuelo de Alarcón, la Coral Polifónica “Jesús Montalbán” de Socuéllamos y la Coral “El Canto” de Colmenar Viejo que pueda contar con ellos.

Quiero transmitir mi profundo agradecimiento a mis amigos de siempre, Carmen, Daniel, Fernando, José Padilla y Julián, por su cercanía, comprensión y apoyo.

Por último, la mayor muestra de gratitud está dirigida a toda mi familia por su apoyo, su cariño y su entusiasmo. Quiero mencionar de manera especial a mis hermanas, Cecilia y Luz María, a mi tía Carmen y a los pequeños José Ramón y Jesús Manuel, mis sobrinos, que me hacen olvidar mis preocupaciones. Por último, gracias a mi abuela Eusebia, por su bondad y su cariño, y a Pedro y Cecilia, padres ejemplares que me lo han dado todo y sin cuya ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Índice

ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La leishmaniasis.....	3
1.1.1. Epidemiología	3
1.1.1.1. Leishmaniasis humana	3
1.1.1.2. Leishmaniasis canina: el perro como reservorio de <i>L. infantum</i>	5
1.1.2. Manifestaciones clínicas.....	5
1.1.2.1. Leishmaniasis humana en el Viejo Mundo.....	5
1.1.2.2. Leishmaniasis humana en el Nuevo Mundo.....	6
1.1.2.3. Leishmaniasis canina	7
1.1.3. Respuesta inmunitaria	8
1.1.4. Diagnóstico	9
1.1.5. Tratamiento.....	9
1.1.6. Control y profilaxis.....	10
1.2. El vector	11
1.2.1. Biología y ecología	11
1.2.2. Interacción parásito-vector	13
1.3. El género <i>Leishmania</i>	14
1.3.1. Taxonomía y filogenia.....	14
1.3.2. Biología celular y aspectos básicos de la diferenciación.....	16
1.3.3. Metabolismo	20
1.3.4. El glicocáliz y la organización de las vías endocíticas y de secreción	21
1.3.5. El cultivo <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y la metaciclologénesis.....	23
1.3.6. La influencia del pH y la temperatura en la diferenciación de los promastigotes a amastigotes.....	24
1.4. Organización genómica, expresión génica y modificación de proteínas en el género <i>Leishmania</i>	26
1.4.1. El genoma de <i>Leishmania</i> spp	26
1.4.2. Epigenética.....	28
1.4.3. Transcripción y regulación post-transcripcional de la expresión génica.....	28
1.4.4. Traducción	30
1.4.5. Modificación de proteínas	31
1.4.5.1. Glicosilación.....	31
1.4.5.2. Lipidación. Modificación de proteínas y glicoconjugados con GPI.....	33
1.5. El estudio del transcriptoma y del proteoma de <i>Leishmania</i> spp.....	33
2. OBJETIVOS.....	37

3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Diseño experimental	43
3.2. Material biológico	44
3.2.1. Parásitos	44
3.2.2. Bacterias	44
3.2.3. Insecto vector.....	44
3.2.4. Línea celular humana.....	45
3.3. Compuestos químicos y soluciones.....	45
3.3.1. Compuestos orgánicos e inorgánicos, ácidos nucleicos y proteínas	45
3.3.2. Purificación de aglutinina de cacahuete (PNA).....	46
3.3.3. Medios de cultivo.....	47
3.4. Cultivos celulares y técnicas de microscopía.....	47
3.4.1. Cultivo de bacterias	47
3.4.2. Transformación de bacterias competentes	47
3.4.3. Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania</i> spp	48
3.4.4. Aglutinación de promastigotes con PNA y selección negativa	48
3.4.5. Cultivo de la línea celular U937 y estimulación con ésteres de forbol.....	49
3.4.6. Obtención de amastigotes intracelulares de <i>L. infantum</i> por infección <i>in vitro</i> de células U937 estimuladas	49
3.4.7. Microscopía óptica e inmunofluorescencia.....	50
3.5. Infección de <i>P. perniciosus</i> con <i>L. infantum</i> y aislamiento de promastigotes del tubo digestivo	51
3.6. Aislamiento, amplificación y análisis de ácidos nucleicos	51
3.6.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	51
3.6.2. Extracción de ADN genómico de <i>Leishmania</i> spp. y humano.....	52
3.6.3. Extracción de ARN total de <i>L. infantum</i>	52
3.6.4. Amplificación de ADN genómico y de ARNm	53
3.6.5. Síntesis y marcaje indirecto con cianinas de ADN genómico y ADNc	54
3.6.6. Electroforesis en gel de agarosa y análisis densitométrico de ácidos nucleicos	55
3.6.7. Análisis de ARN mediante electroforesis capilar de alta resolución.....	56
3.6.8. Análisis de ácidos nucleicos mediante espectroscopía de absorción ultravioleta-visible	56
3.7. Técnicas de proteómica	56
3.7.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos totales de <i>L. infantum</i>	56
3.7.2. Electroforesis bidimensional y cuantificación relativa de proteínas	57
3.7.3. Digestión trípica en gel y análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF	59
3.8. Construcción de una genoteca genómica completa de <i>L. infantum</i>	60
3.8.1. Preparación del ADN pasajero mixto	60
3.8.2. Preparación del vector plasmídico pUC18.....	61
3.8.3. Ligación del inserto y el vector y obtención de clones recombinantes	62
3.9. Construcción de <i>microarrays</i> genómicos de <i>L. infantum</i>	62
3.9.1. Amplificación por PCR, purificación y redistribución de los insertos.....	62
3.9.2. Preparación de los controles internos de los <i>microarrays</i>	64
3.9.3. Construcción de <i>microarrays</i> de ADN con el sistema robotizado <i>MicroGrid II TAS</i>	65

3.10. Análisis de la expresión génica diferencial con <i>microarrays</i> de ADN de <i>L. infantum</i>	67
3.10.1 Hibridación	67
3.10.2. Adquisición y análisis de las imágenes de los <i>microarrays</i>	69
3.10.3. Normalización de los datos y contraste de hipótesis.....	69
3.11. Análisis de las secuencias de ADN	70
3.11.1. Secuenciación.....	70
3.11.2. Ensamblaje y alineamiento de secuencias	71
3.11.3. Anotación de genes y funciones	72
3.11.4. Análisis de inserciones, deleciones y sustituciones	72
3.12. Validación por RT-PCR cuantitativa relativa en tiempo real.....	73
3.13. Meta-análisis	74
3.13.1. Contraste de hipótesis con el test de la distribución binomial	74
3.13.2. Análisis de significación de <i>microarrays</i> y <i>clustering</i> jerárquico iterativo.....	74
4. RESULTADOS.....	75
4.1. Construcción de <i>microarrays</i> genómicos completos de <i>L. infantum</i>	77
4.2. Estrategia de análisis de la expresión génica diferencial con <i>microarrays</i> de ADN y ensamblaje e identificación de secuencias génicas	79
4.3. Perfiles de expresión génica de los estadios fundamentales del ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	82
4.3.1. Ensayos de hibridación con <i>microarrays</i> para el análisis transcriptómico en promastigotes y amastigotes	82
4.3.2. Genes diferencialmente expresados en el ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	90
4.3.2.1. Cromatina, epigenética, replicación del ADN y metabolismo de nucleótidos.....	96
4.3.2.2. Expresión génica, modificación de proteínas y vías de secreción	96
4.3.2.3. Metabolismo de hexosas, fosforilación oxidativa y transporte.....	97
4.3.2.4. Biosíntesis de porfirinas	101
4.3.2.5. Metabolismo de aminoácidos y poliaminas y homeostasis redox	101
4.3.2.6. Metabolismo de lípidos	101
4.3.2.7. Proteólisis	102
4.3.2.8. Señalización intracelular y regulación del ciclo celular	102
4.3.2.9. Citoesqueleto y movimiento.....	103
4.3.2.10. Moléculas de superficie y genes de función desconocida	103
4.3.3. Menor tasa de sobre-expresión en amastigotes.....	104
4.3.4. Comparación de los perfiles de expresión génica de los promastigotes en fase logarítmica y estacionaria de cultivo axénico mediante técnicas de proteómica.....	105
4.4. Análisis de la expresión génica diferencial de las subpoblaciones de promastigotes procíclicos PNA ⁺ y metacíclicos PNA ⁻ de la población en fase estacionaria de cultivo axénico de <i>L. infantum</i>	107
4.4.1. Ensayos de hibridación con <i>microarrays</i> para el análisis transcriptómico de los promastigotes PNA ⁺ y PNA ⁻	107
4.4.2. Genes diferencialmente expresados en los promastigotes PNA ⁺ y PNA ⁻	114
4.4.2.1. Biosíntesis de glicoproteínas.....	117
4.4.2.2. Proteasas	117
4.4.2.3. Señalización intracelular	118

4.4.2.4. Metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos	118
4.4.2.5. Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos, expresión génica y modificación de las proteínas	119
4.4.2.6. Transporte y resistencia a drogas.....	120
4.4.2.7. Generación de energía y metabolismo redox.....	120
4.4.2.8. Citoesqueleto.....	120
4.4.2.9. ARN guía.....	120
4.4.3. Los promastigotes PNA ⁻ son más infectivos que los PNA ⁺ en <i>L. infantum</i>	121
4.5. La influencia de la temperatura y el pH en la expresión génica diferencial global en el proceso de diferenciación de los promastigotes a amastigotes de <i>L. infantum</i>	122
4.5.1. Crecimiento y morfología celular	122
4.5.2. Expresión de la glicoproteína gp46 con el aumento de temperatura y la acidificación....	123
4.5.3. Ensayos de hibridación con <i>microarrays</i> para el estudio de los perfiles de expresión génica diferencial $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH	123
4.5.4. El perfil de expresión génica $\Delta T\Delta pH$: la exposición concomitante al aumento de la temperatura y a la acidificación conduce a la diferenciación de los promastigotes a AL	129
4.5.5. Genes diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$	134
4.5.5.1. Superfamilia de las amastinas	134
4.5.5.2. Cluster A2-A2rel.....	135
4.5.5.3. Replicación del ADN, expresión génica y vías de secreción.....	135
4.5.5.4. Metabolismo energético	136
4.5.5.5. Metabolismo de lípidos	136
4.5.5.6. Biosíntesis de porfirinas	137
4.5.5.7. Transporte	137
4.5.5.8. Señalización intracelular	138
4.5.5.9. Citoesqueleto y flagelo	138
4.5.6. ΔT conduce a un patrón de expresión similar al producido por $\Delta T\Delta pH$	141
4.5.7. La acidificación da lugar a un patrón de expresión diferente al de $\Delta T\Delta pH$ y ΔT	143
4.6. Perfiles de expresión génica de los promastigotes de <i>L. infantum</i> expuestos a otras modificaciones en cultivo <i>in vitro</i>	145
4.6.1. Perfil de expresión génica global de los promastigotes de <i>L. infantum</i> en presencia de acetato de cadmio	145
4.6.2. Perfil de expresión génica de los promastigotes de <i>L. infantum</i> con depleción de suero bovino fetal	150
4.7. Análisis de la expresión génica diferencial de promastigotes de <i>L. infantum</i> obtenidos de <i>P. perniciosus</i> , promastigotes en cultivo axénico y amastigotes intracelulares	153
4.7.1. Empaquetamiento del ADN, epigenética, replicación y reparación del ADN, expresión génica y modificación post-traducciona.....	161
4.7.2. Transporte, fosforilación oxidativa y metabolismo de glúcidos, lípidos, aminoácidos y poliaminas y homeostasis redox	162
4.7.3. Proteólisis.....	163
4.7.4. Señalización intracelular y organización del citoesqueleto	163
4.7.5. Moléculas de superficie y genes de función desconocida.....	163

5. DISCUSIÓN	165
5.1. Estrategia de análisis de la expresión génica diferencial en <i>L. infantum</i>	167
5.2. Expresión génica diferencial en los estadios fundamentales del ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	168
5.2.1. Análisis de los perfiles de expresión génica en E/L, E/A y L/A	168
5.2.2. Frecuencias de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes	174
5.3. Los perfiles de expresión génica de las subpoblaciones procíclica PNA ⁺ y metacíclica PNA ⁻ de promastigotes de <i>L. infantum</i> en fase estacionaria	176
5.4. El efecto en el transcriptoma de la temperatura y la acidificación en el proceso de diferenciación de los promastigotes a amastigotes en <i>L. infantum</i>	178
5.5. Perfiles de expresión génica de los promastigotes de <i>L. infantum</i> expuestos a otras modificaciones en cultivo <i>in vitro</i>	182
5.6. Análisis de los perfiles de expresión génica diferencial de los promastigotes <i>L. infantum</i> aislados de <i>P. perniciosus</i>	184
5.7. Los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de <i>L. infantum</i> : integración de los datos del estudio para el desarrollo de la genómica funcional en el género <i>Leishmania</i>	188
6. CONCLUSIONES	197
7. BIBLIOGRAFÍA	201
8. ANEXOS	225
Anexo I. Reactivos, soluciones y medios de cultivo	227
Anexo II. Oligonucleótidos para los análisis de qRT-PCR	233
Anexo III. Construcción de los <i>microarrays</i> genómicos de <i>L. infantum</i>	235
Anexo IV. Genes de función desconocida y clones no resueltos en los análisis de expresión génica con <i>microarrays</i> de <i>L. infantum</i>	239
Anexo V. Frecuencias absolutas y relativas de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes	273
Anexo VI. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en promastigotes logarítmicos y estacionarios de <i>L. infantum</i> mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	275
Anexo VII. Análisis de las secuencias de los minicírculos	277
Anexo VIII. Identificación de los clones en los <i>clusters</i> de expresión diferencial inducida por el aumento de temperatura y la acidificación independiente y simultáneamente	281
Anexo IX. Revisión de los datos de expresión génica diferencial en <i>Leishmania</i> spp	283
Anexo X. <i>Summary</i>	287
Anexo XI. Publicación de los datos del estudio	289
FE DE ERRATAS	291

Abreviaturas

Δ pH	Descenso a pH4,5
Δ T	Aumento de temperatura a 37 °C
Δ T/ Δ pH	Aumento de temperatura a 37 °C combinado con acidificación a pH4,5.
β 1,3GalT	β -1,3-galactosiltransferasa
α -1,3-ManT	α -1,3-Manosiltransferasa
α -cetoIVDH	α -cetoisovalerato deshidrogenasa (2-oxoisovalerato deshidrogenasa)
α CG	α -cetoglutarato
α GII-HPB	Proteína hipotética con función de unión a calcio del complejo α -glucosidasa II (GO)
β I	Importina β o dominio CAS/CSE.
β -ox	β -oxidación de los ácidos grasos
β -prop	<i>β-propeller protein</i> (proteína de láminas β dispuestas toroidalmente)
α -tub	α -tubulina
γ GCS	γ -glutamylcisteína sintasa
1,2-DAG	1,2-diacilglicerol
3'NT/Nasa	3'-nucleotidasa/nucleasa.
3-HA-CoA	3-hidroxiacil-CoA
3-HiB-CoA	3-hidroxiisobutiril-CoA
3-HMG-CoA	3-hidroximetilglutaril-CoA
6PF1K	6-fosfofructoquinasa
A	Amastigotes
A22ap	Peptidasa aspártica de tipo presenilina, clan AD, familia A22A
aap	Aminoácido permeasa
aATP11	Transportador de aminoácidos 11
ABC	ATPasa de tipo casete de unión a ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
ABCE	Subfamilia E de los transportadores ABC
AC	Adenilato ciclasa
ACP	Proteína portadora de acilo
ACR	Receptor de tipo adenilato ciclasa
ACT	Acil-CoA transferasa
ADCL	Leishmaniasis cutánea difusa anérgica
ADN λ	ADN del bacteriófago lambda
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNk	ADN del kinetoplasto
ADNr	ADN que codifica genes ARNr
ADP	Adenosín difosfato
ADPrf	Factor de ribosilación de ADP
AFG1	ATPasa AFG1
AG	Ácido graso
agm	Agmatinasa
AL	<i>Amastigote-like</i> (forma de tipo amastigote)
ALD	Fructosa-1,6 difosfato aldolase
amas	Gen de la superfamilia de las amastinas
AMP	Adenosín monofosfato
ANC	ADP/ATP translocasa
Apcx3	Subunidad 3 de la cadena media del complejo adaptador
aPPG	PPG del amastigote
AQ	Acuaporina
Ara	Arabinosa

ARN	Ácido ribonucleico
ARNa	ARN amplificado
ARNaa	ARN doblemente amplificado
ARNbp	Proteína de unión a ARN
ARNc	ARN copia
ARNg	ARN guía
ARNh	ARN helicasa
ARNm	ARN mensajero
ARNPol	ARN polimerasa
ARNr	ARN ribosómico
ARNsn	ARN pequeño nuclear
ARNsno	ARN pequeño nucleolar
ARNsn-U5-sf	Factor U5 de corte y empalme (<i>splicing</i>) de ARNsn
ARNt	ARN de transferencia
AspCT	Aspartato carbamoil transferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BO	Botón de Oriente
BSA	Albúmina de suero bovino
BT	Biotina
C(III)O	Coproporfirinógeno (III) oxidasa
C2cp	Cisteína peptidasa de tipo calpaína, clan CA, familia C2
C54p	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C54
Ca ²⁺ -ATPasa	ATPasa de calcio de la familia P
cADNPolI	Subunidad catalítica de la ADN polimerasa I
cAMP	AMP cíclico
<i>cap</i>	Caperuza en 5' del ARN mensajero
CBL	Cisteína β liasa
CC	Condiciones control del experimento, estándar de cultivo de promastigotes
CCCH-Zn	Dominio en dedos de zinc
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
cdc	Proteína quinasa dependiente de ciclina
cdkbp	Proteína de unión a cdc
CGL	Cistationina γ-liasa
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CHAPS	1-propanosulfonato de 3-colamidopropildimetilamonio
Cit b5	Citocromo b5
Cit b5	Citocromo b5
CL	Leishmaniasis cutánea
Clatrina-H	Cadena pesada de la clatrina
CoA	Coenzima A
CoB	Proteína hipotética con función anotada con GO de unión a cofactor
COP	Coatómero, proteína que recubre vesículas del RE-aparato de Golgi-RE.
cox	Citocromo c oxidasa
CPA	Cisteína proteasa A de tipo catepsina-L
Cph	Ciclofilina (peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa)
cPP1	Subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1
CPS	Carbamoil fosfato sintetasa
CR	Receptor del complemento
Ct	Ciclo umbral en qRT-PCR (<i>Cycle threshold</i>)
Cy	Cianina
d	Sub-expresión
Da	Dalton
DAG	Gráfico acíclico directo

DCL	Leishmaniasis cutánea difusa
DCP	Proteína de eliminación de la caperuza (<i>cap</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGC	<i>Cluster</i> direccional de genes
DGC	<i>Cluster</i> direccional de genes
DH	Deshidrogenasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DK	Defosfo-CoA quinasa
DLC	Cadena ligera de la dineína
DMSO	Dimetilsulfóxido
dnaJ	Chaperona dnaJ
Dol-P-Glc	Dolicol fosfato glucosa
Dol-P-Man	Dolicol fosfato manosa
DRPP	Fosfoproteína diferencialmente regulada en el desarrollo
DTT	Ditiotreitol
DynH	Cadena pesada de la dineína
DynLC	Cadena ligera de la dineína
E	Promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico
ECH	Enoil-CoA hidratasa/isomerasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eEF	Factor eucariótico de elongación en la traducción
eIF	Factor eucariótico de iniciación de la traducción
ELISA	Enzimoimmunoensayo
Endo L-PSP	Endorribonucleasa L-PSP (pb5)
ESAG5	<i>Expressed site-associated protein 5</i> (proteína de genes asociados a los sitios de expresión)
ETCH	Cadena respiratoria de transporte de electrones
ETF	Flavoproteína de transferencia de electrones
EtN-P	Etanolamina fosfato
F	<i>Fold-change</i> (cociente de intensidad de fluorescencia Cy5/Cy3 si $Cy5 > Cy3$ o $Cy3/Cy5$ si $Cy5 < Cy3$)
F ₀ S9	Subunidad reguladora de la ATP sintetasa
F1 γ	Subunidad F1 γ de la ATP sintetasa
Fd	Ferredoxina
Fe/ZnT	Transportador de Fe y Zn
Fibril	Fibrilarina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FKBP	Peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa/proteína de unión a FK506
FNTA	Farnesiltransferasa
fPPG	PPG filamentoso
Ftasa- α	Farnesiltransferasa, subunidad α
FtsJ	Proteína de división celular
Gal	Galactosa
GalT	Transferasa de galactofuranosa al GIPL
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GIPL	Glicosilinositolfosfolípidos
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GluDH	Glutamato deshidrogenasa
GMC	Glucosa-metanol-colina oxidoreductasa
gMDH	Malato deshidrogenasa glicosomal
GNAT	Glucosa-6-fosfato N-acetiltransferasa
GO	<i>Gene Ontology</i> (base de datos de ontologías génicas)

gp	Glicoproteína
gp46	Glicoproteína de superficie de 46 KDa
GPDE	Glicerofosfodiéster fosfodiesterasa
gPEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GS	Glucógeno sintasa
GSK	Glucógeno sintasa quinasa
GSS	<i>Genome Survey Sequences</i> (Secuencias de sondeo del genoma)
GT	Simportador glucosa/H ⁺
GT1	Glicosiltransferasa 1
GTP	Guanosina trifosfato
H	Histona
H2Bv	Variante de histona H2B
HAD	Hidroxiácido deshidrogenasa
HADH	Hidroxiácido deshidrogenasa
HASP	Proteína hidrofílica de superficie
HCL-ST	<i>Clustering</i> (agrupamiento) jerárquico iterativo con dendrograma de soporte
H-deAC	Histona deacetilasa
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
HiBCH	3-HiBCoA hidratasa
HIFBS	Suero bovino fetal inactivado por calor
HMM	Modelos ocultos de Markov
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HPT	Proteína hipotética con función de transporte (GO)
hsp	Proteína de choque térmico
HTreg	Proteína hipotética con función de regulación de la transcripción (GO)
<i>hν</i>	Fotón
ICMT	Isoprenilcisteína metiltransferasa
IEF	Isoelectroenfoque
IF	Intensidad de fluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia directa con detección indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMP	Inosina monofosfato
IndPC	Piruvato/indolpiruvato carboxilasa
INO1	<i>mio</i> -inositol-1-fosfato sintasa
iNOS	Óxido nítrico sintasa
IPC	Inositol fosfoceramida
IPR	Base de datos <i>InterPro</i> que asigna términos funcionales a las secuencias, incluyendo los de la base de datos GO
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactopiranosido
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
KEGG	Base de datos <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
kin	Kinesina
KMBT	α-cetometiobutirato
L	Promastigotes en fase logarítmica de cultivo axénico
LACK	Análogo de la proteína quinasa C activada, p36
LB	Medio Luria-Bertani
LIG I	ADN ligasa I
LOWESS	Algoritmo de normalización <i>Locally Weighted Scatter Plot Smoothing</i> (corrección o pulido de la nube de puntos con valoración local para ajustarla a la línea M = 0)
LPG	Lipofosfoglicano
X	

<i>lpg2</i>	Proteína biosintética del lipofosfoglicano
LPI	Lisofosfatidilinositol
L-PSP	Endorribonucleasa L-PSP (pb5)
LTR	Terminaciones largas repetidas
mACDH	Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial
MALDI	Desorción e ionización asistida por matriz (MS)
Man	Manosa
MAPK(h)	Proteína quinasa activada por mitógeno (homólogo)
MBAP	Fosfatasa ácida unida a la membrana
MCL	Leishmaniasis mucocutánea
MCS	Sitio de clonaje múltiple
MetM24	Metionina aminopeptidasa de la familia M24
MEV	Programa informático <i>Multi Experiment Viewer</i>
MGL	Monoglicérido lipasa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mmc	Proteína de mantenimiento de minicromosomas
mMP20	Metaloxopeptidasa de la familia M20
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
MPET	4-metil-5-(β-hidroxietil)-tiazol monofosfato
MPETS	Proteína de síntesis de METP
mPol ID	ADN polimerasa ID mitocondrial
mPPG	PPG anclado a la membrana
MPU	Unidad principal de bombeo (<i>Main Pumping Unit</i>)
MRP	Proteína de resistencia a múltiples drogas
MS	Espectrometría de masas
MSH	Proteína de reparación de desapareamientos
Mtap	Proteína asociada a microtúbulos
MVP	Proteína mayoritaria de las cúpulas celulares (<i>Major Vault Protein</i>)
MVT	Túbulo multivesicular
MWS	Estación principal de lavado del <i>arrayer</i> (<i>Main Wash Station</i>)
NAD(P)	Nicotinamina adenina dinucleótido (fosfato)
NAGPIBP	Proteína biosintética de N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol
NAGPID	N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol de-N-acetilasa
Ncbp	Proteína nuclear de unión al <i>cap</i>
Ndkb	Nucleósido difosfato quinasa b
NPC	Complejo del poro nuclear
NTF	Factor sensible a N-etilmaleimida
OAA	Oxalacetato
OGT	N-acetilglucosamina transferasa de residuos O-unidos
ORF	Marco abierto de lectura
P1/S1	P1/S1 nucleasa
PABP	Proteína de unión a poli-A
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAR4	Proteína del vástago paraflagelar
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Piruvato carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa
P-Dol	Dolicol fosfato
PES	Complejo prostaglandina peróxido sintasa
PFAM	Base de datos basada en alineamientos múltiples de secuencias y HMMs.
PFR	Proteína del vástago paraflagelar

PFR1D	Proteína 1D del vástago paraflagelar
PG	Fosfoglicerato
PGFS	Prostaglandina F sintetasa
PGluM	Fosfoglucomutasa
PGM ^{BPI}	Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-difosfoglicerato
PH	Dominio plextrina
<i>p</i> -HPL	<i>p</i> -hidroxifenillactato
<i>p</i> -HPP	<i>p</i> -hidroxifenilpiruvato
PI	Fosfatidilinositol
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol trifosfato quinasa
PI4K	Fosfatidilinositol 4-quinasa
PK	Proteína quinasa
PKA	Familia de las proteína kinasas A
PKC	Familia de las proteína kinasas C
PKDL	Leishmaniasis dérmicas Post Kala-azar
PLD	Fosfolipasa D
PMA	12-miristato 13-acetato 4β-forbol
PMM	Fosfomanomutasa
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PNA	Aglutinina de cacahuete (<i>peanut agglutinin</i>)
PO	Protoporfirinógeno oxidasa
Polβ	ADN polimerasa β
PP	Pirofosfato
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
PPG	Proteofosfoglicano
PPG-Lp	Proteína de tipo constituyente del proteofosfoglicano
pPPG	PPG del promastigote
Pro-Pper	Promastigotes derivados de <i>Phlebotomus perniciosus</i>
PRPPS	Fosforribosil pirofosfato sintetasa
PSA	Antígeno de superficie del promastigote 2 (gp46)
PSG	Gel de secreción del promastigote
PT	Transportador de pteridina
PT3	Transportador de pteridina 3
PirP	Piridoxal fosfato
qRT-PCR	PCR cuantitativa relativa en tiempo real
R	Conjunto de proteínas ribosómicas diferencialmente expresadas
RABreg	Regulador de la Rab GTPasa
RAPD	Amplificación al azar de ADN polimórfico
RE	Retículo endoplásmico
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RINGfp	Proteína con dedos de zinc de tipo RING o rififilina
RNR	Ribonucleótido reductasa
rPKA	Subunidad reguladora de la proteína quinasa A
RRS1	Proteína de ensamblaje de los ribosomas 1
rS-no-ATPasa	Subunidad no-ATPasa reguladora del proteasoma
S	Componentes ribosómicos
SAGE	Análisis en serie de la expresión génica
SALp	Proteína de tipo antígeno de superficie
SAM	Análisis de significación de <i>microarrays</i>
SAMDC	S-adenosil-metionina decarboxilasa
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (fosfatasa alcalina de gamba)
SAPP	Fosfatasa ácida secretada
SbGRP	Proteína de resistencia a estibogluconato sódico

SCDH	Deshidrogenasa de cadena corta
SCL	Succinil-CoA ligasa
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
sec13	Factor del complejo de translocación
sec14	Factor citosólico del complejo de translocación
sec61	Subunidad 61 del núcleo del traslocón
Ser/Thr PK	Serina/treonina proteína quinasa
Ser/Thr PPasa	Serina/treonina proteína fosfatasa
SerP51	Serina peptidasa, familia S51, peptidasa E
Sf3A	Factor de splicing 3A
SHERP	Proteína pequeña hidrofílica asociada al RE
SL	ARN <i>spliced-leader</i>
SLA	Antígeno soluble de <i>Leishmania</i>
SLAC	Retroelementos asociados al SL
smc3	Proteína 3 de mantenimiento estructural de cromosomas
SNARE	Receptores de SNAP (proteínas solubles de anclaje NTF).
snRNP	Ribonucleoproteína pequeña nuclear
SOD	Superóxido dismutasa
SpS	Espermidina sintasa
SSC	Tampón citrato sódico salino
StDH	3-oxo-5- α -esteroide deshidrogenasa
STE	Tampón NaCl, Tris y EDTA
Sx	Sintaxina
TAE	Tampón Tris acetato EDTA
TAG	Triacilglicerol
TAT	Tirosina aminotransferasa
TATE	Elemento asociado a los telómeros
TB	Medio <i>Terrific Broth</i>
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos (de Krebs)
Tcp	Proteína chaperona del complejo adaptador (<i>Tailless Complex Protein</i>)
TE	Tampón Tris EDTA
TEMED	NNN'N'-tetrametiletilendiamina
TFSUI1	Factor transcripcional SUI1
TGL	TAG lipasa
TGN	Red <i>trans</i> -Golgi
Th	Linfocitos T colaboradores
THR	Tiorredoxina
Thr _t S	Treonil-ARNt sintetasa
Tim17	Translocasa de la membrana interna mitocondrial
Tiol	Tiolasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
tNT	Transportador de nucleótidos
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of Flight</i>) (MS)
Tom	Translocasa de la membrana externa mitocondrial
Topo II	ADN topoisomerasa II
TOR	Proteína de unión a nucleósidos tóxicos de purina nupm1
TPI	Triosa fosfato isomerasa
TPP	Tiamina pirofosfato
tPRPP	Fosfatasa permeasa reprimible por fosfato
TR	Tripanotión reductasa
tRE	RE transicional
Tris	<i>Tris</i> -hidroximetilaminometano
TRL	Translocón

TXNPx	Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa
u	Sobre-expresión
UBC2	Enzima conjugante de ubiquitina E2
<i>ubq</i>	Ubiquitina
UCH-C12	Cisteína peptidasa, clan CA, familia C12
UDO	Unidad de densidad óptica
UDP-NAGDPT	UDP-N-acetilglucosaminildoliquilfosfato GlcNAc 1-fosfotransferasa
UF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UMSBP	Proteína de unión a la secuencia universal de los minicírculos
UTR	Región no traducida
vamp	Proteína de membrana asociada a vesículas
vH ⁺ -PPasa	Pirofosfatasa traslocadora de protones de tipo vacuolar.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VL	Leishmaniasis visceral
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
Zn·M14	Carboxipeptidasa de zinc de la familia M14
ZnT	Transportador de zinc

1

Introducción

1.1. LA LEISHMANIASIS.

Se denomina leishmaniasis a un conjunto de enfermedades que afectan al ser humano y a otros mamíferos en regiones tropicales y subtropicales cuyos agentes etiológicos son protozoos parásitos del género *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae). Existen tres formas clínicas fundamentales, dependiendo de la especie que la produzca y del estado de salud del hospedador: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. El ciclo biológico de *Leishmania* spp. es digenético y dimórfico porque se desarrolla en dos hospedadores diferentes con la alternancia de dos estadios fundamentales. El promastigote es el estadio extracelular que se desarrolla en el interior del tubo digestivo del vector invertebrado, denominado flebotomo (orden Diptera, familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae), mientras que el amastigote se multiplica en células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador mamífero (clase Mammalia). Algunas leishmaniasis son zoonosis por la presencia de mamíferos reservorios en el entorno natural o el doméstico, como sucede con la infección del perro por *L. infantum* en la cuenca mediterránea, que son contraídas eventualmente por el hombre; otras, como la causada por *L. donovani*, son antroponosis, ya que el reservorio es el ser humano.

1.1.1. Epidemiología.

1.1.1.1. *Leishmaniasis humana.*

Existen al menos treinta especies del género *Leishmania*, de las cuales 21 son patógenas para el ser humano. La prevalencia a nivel mundial es de aproximadamente 12 millones de personas distribuidas en 88 países, 16 de los cuales son desarrollados y 72 subdesarrollados. La incidencia mundial estimada es de 2 millones de casos anuales, de los cuales 0,5 millones corresponden a la leishmaniasis visceral; sólo unos 0,6 millones de infecciones anuales son oficialmente registradas y la mortalidad anual aproximada por leishmaniasis visceral es de 60.000 personas. La población en riesgo de contraer algún tipo de leishmaniasis se eleva a unos 350 millones de personas y la morbilidad asociada constituye un problema añadido a la precaria situación socioeconómica de los países subdesarrollados afectados (Desjeux, 1996; OMS, 2000). Es una enfermedad de declaración obligatoria en 32 de los 88 países afectados, por lo que se estima que las cifras epidemiológicas reales son muy superiores (Guerin y col., 2002; Murray y col., 2005). El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea aparece en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria, el 90% de los de leishmaniasis mucocutánea se concentran en Bolivia, Brasil y Perú y el 90% de los de leishmaniasis visceral en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán (Figura 1) (Desjeux, 1992; OMS, 2000). Desde 1993 se ha observado un progresivo aumento de la incidencia y del número de países afectados.

La distribución geográfica de la leishmaniasis está condicionada por la del insecto vector, que desarrolla su ciclo biológico en regiones tropicales y subtropicales (sección 1.2.1.). 70 de las 600 especies y subespecies de flebotomos son capaces de transmitir el parásito (Killick-Kendrick, 1990), existiendo cierto grado de especificidad entre las especies del parásito y del vector (revisado por Sacks, 2001). En el incremento global del número de casos de leishmaniasis han tenido influencia numerosos factores, como la penetración en la selva y el retorno al medio rural, el escaso control en las áreas de transmisión activa, la deforestación y el cambio en la humedad ambiental, las migraciones y la proximidad y abundancia de reservorios en ambientes domésticos, entre los que destaca por su importancia epidemiológica el perro

Introducción

como reservorio de los agentes etiológicos de leishmaniasis visceral causada por *L. infantum* y *L. chagasi* (Alvar y col., 1997; Desjeux, 2001).

El calentamiento global está propiciando la propagación de las leishmaniasis a áreas en las que nunca se habían detectado casos. Por ejemplo, la leishmaniasis visceral endémica en el área Mediterránea está avanzando hacia el norte (Desjeux, 2001).

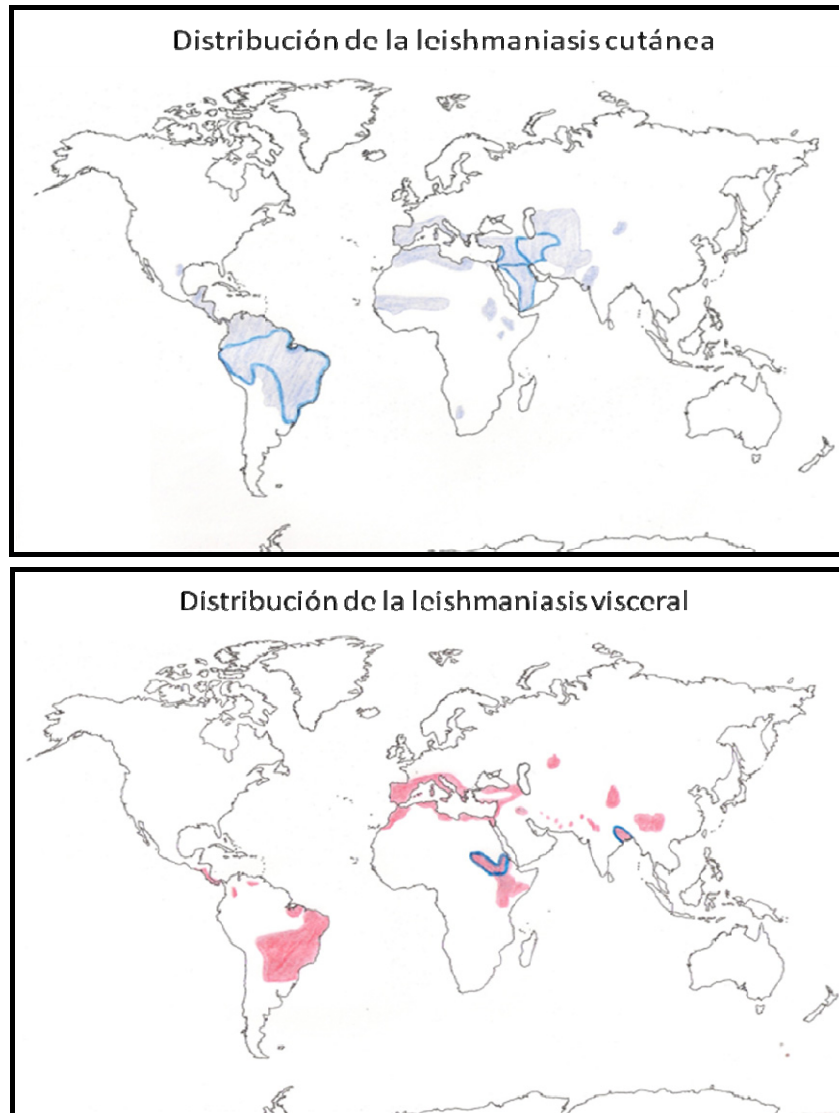


Figura 1. Distribución de la leishmaniasis. Las zonas de elevada prevalencia aparecen delimitadas con trazo azul. El área de distribución de la leishmaniasis mucocutánea está incluida en la de la cutánea (adaptado de OMS, 2000).

Las coinfecciones con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) contribuyen de manera especial al aumento de la prevalencia (Desjeux, 1995; Alvar y col., 1997; Desjeux, 2001). *L. infantum* y *L. chagasi* actúan como patógenos oportunistas en individuos inmunodeprimidos (Pasquau y col., 2005). Este problema se ha registrado en 34 países en Asia, África, Europa y Sudamérica, si bien la mayor parte de los mismos se han producido en el suroeste europeo. En concreto, en el año 2001 fueron notificados 1.627 casos correspondientes a España, Francia, Italia y Portugal (Desjeux y col., 2001). Se estima que el 40% de los enfermos de VL causada por *L. infantum* resulta estar coinfectado con el VIH a nivel mundial

(Dereure y col., 1995) y en España el 20% (Medrano y col., 1992). Las jeringuillas compartidas constituyen un mecanismo importante para la transmisión de *L. infantum*, dada la elevada drogadicción de los pacientes de VL estudiados (Alvar y Jimenez, 1994)

1.1.1.2. Leishmaniasis canina: el perro como reservorio de *L. infantum*.

Los cánidos son reservorios de *L. infantum* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) y de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo (América del Sur y Central). Muchos de ellos, como los lobos (*Canis lupus*) o los chacales (*Canis aureus*), apenas interaccionan con el hombre y carecen de importancia como reservorios (Alvar y col., 2004). Sin embargo, el zorro (*Vulpes vulpes*) mantiene el ciclo salvaje de transmisión en España (Martin Luengo y Quiles Mora, 1982) y Portugal (Abranches y col., 1984), entre otros países. El perro (*Canis familiaris*) es el reservorio que mantiene el ciclo doméstico de *L. infantum* en el Viejo Mundo, cuyos vectores pertenecen al género *Phlebotomus*, y de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo, transmitida por vectores del género *Lutzomyia*. La prevalencia de la enfermedad por grupo de edad tiene una distribución bimodal, con un máximo del 80% correspondiente a los tres primeros años de vida, y con otro menos importante a la edad de 8-10 años (Amela y col., 1995; Acedo Sanchez y col., 1996). Se ha descrito que en áreas rurales se infecta el 3% de los perros durante la transmisión estacional, mientras que el riesgo de contraer la enfermedad es del 70% en el entorno doméstico, en el que los animales permanecen en microclimas ideales para el desarrollo de los flebotomos (fundamentalmente, casas con jardines, materia orgánica en descomposición y proximidad a otros reservorios). Asimismo, la susceptibilidad a la enfermedad está influenciada por la predisposición genética del animal y por la cepa del parásito potencialmente infectiva (Alvar y col., 2004).

1.1.2. Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas de las leishmaniasis dependen de la especie del parásito, así como del estado de salud y las características genéticas del individuo infectado (Bogdan y col., 1996). Según los órganos afectados, las leishmaniasis se clasifican en tres grupos fundamentales: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral (Figura 2). En el caso de la leishmaniasis canina aparecen lesiones cutáneas y viscerales simultáneas con la progresión de la enfermedad (Figura 3) (Ferrer, 1989).

1.1.2.1. Leishmaniasis humana en el Viejo Mundo.

La leishmaniasis cutánea (CL) o botón de Oriente consiste generalmente en una única lesión o leishmanioma en el lugar de cada picadura producida por el flebotomo. Las especies causantes de esta afección son *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, algunas cepas de *L. infantum* (Rioux y Lanotte, 1990) y rara vez *L. donovani*, siendo las ocasionadas por *L. tropica* y *L. aethiopica* más secas y menos necróticas que las de *L. major*. La CL producida por *L. major* y *L. aethiopica* es una zoonosis, mientras que la causada por *L. tropica* es una antroponosis. La leishmaniasis cutánea difusa (DCL), producida por *L. aethiopica*, es menos frecuente y se caracteriza por la aparición de lesiones hinchadas relativamente grandes con forma de placa o nódulo por amplias superficies de la piel, lo cual recuerda a la lepra lepromatosa (revisado por Zuckerman y Lainson, 1977; Griffiths, 1987).

La leishmaniasis visceral (VL) humana, que también recibe la denominación de *Kala-azar* o fiebre de Dum-dum, es una enfermedad crónica de curso gradual característica de las infecciones producidas por especies del complejo *L. donovani*. *L. infantum* y *L. donovani* producen patologías similares, si bien *L. infantum* afecta principalmente a niños e individuos inmunodeprimidos, produciendo

Introducción

frecuentemente inflamación de los nódulos linfáticos (Rab y Evans, 1995; Rab y col., 1995). Además, *L. tropica* es capaz de producir leishmaniasis viscerotrópica, ya que fue diagnosticada en soldados americanos en el conflicto del Golfo Pérsico de los años 1990 (Magill y col., 1993). La infección por *L. donovani* es antroponótica, mientras que la VL ocasionada por *L. infantum* es zoonótica, siendo el reservorio principal el perro. Tras un periodo de incubación de 2 a 6 meses, se manifiesta la enfermedad visceral acompañada por fiebre baja y persistente. El establecimiento de la infección puede llegar a durar años y el curso de la enfermedad es variable. Las principales patologías asociadas son esplenomegalia y hepatomegalia, siendo generalmente la primera la más acusada. La VL está asociada a un amplio espectro de síntomas: fiebre irregular, pérdida de peso considerable, pancitopenia (anemia, trombocitopenia, leucopenia y neutropenia, además de linfocitosis y monocitosis relativa) asociada a hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia (revisado por Herwaldt, 1999). Los enfermos de VL actúan como reservorios y la falta de tratamiento conduce normalmente a la muerte (Rees y Kager, 1987).

La leishmaniasis dérmica Post *Kala-azar* (PKDL) se produce frecuentemente como secuela tras la curación clínica de los pacientes con VL causada por *L. donovani*, aunque también puede aparecer en pacientes que no han sufrido anteriormente VL. La PKDL aparece fundamentalmente en la India y en África, concretamente en Sudán y Kenia (Hashim y col., 1995). El desarrollo de la PKDL es muy variable: desde lesiones puntiformes a pápulas o nódulos en zonas faciales, lo que recuerda a la lepra, hasta lesiones más graves como ceguera (Hashim y col., 1995; Ramesh y Mukherjee, 1995).

1.1.2.2. *Leishmaniasis humana en el Nuevo Mundo.*

Los conquistadores e historiadores españoles escribieron acerca de lesiones de muy mal aspecto que afectaban a los amerindios. De hecho, han sido hallados restos arqueológicos que datan de entre 500 y 1000 años de antigüedad de figuras de rostros humanos con lesiones típicas de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Figura 2) (Pessôa y Barretto, 1944). La CL neotropical está causada por 12 de las 14 especies neotropicales que infectan a seres humanos (Figura 5). El aspecto general de las lesiones es un cráter con ulceración en el centro. La leishmaniasis cutánea difusa anérgica, causada por *L. mexicana*, *L. pifanoi* y *L. amazonensis* (Convit y Lapenta, 1946), es infrecuente y se caracteriza por lesiones nodulares dispersas y anergia total o parcial.

La leishmaniasis mucocutánea (MCL) está causada principalmente por *L. braziliensis* y en menor medida por *L. guyanensis* y *L. panamensis*. En otros casos, estas especies se limitan a producir CL (Walton, 1987) o DCL (Turetz y col., 2002; Couppie y col., 2004) y también pueden aparecer ambos tipos de manifestaciones clínicas simultáneamente. En la MCL, el parásito puede permanecer en estado latente durante años y la lesión se inicia en la mucosa nasal profunda con focos inflamatorios que avanzan hacia la mucosa superficial, donde se produce necrosis y endarteritis, provocando la deformación del septo nasal y a veces lesiones palatales, laríngeas y traqueales (Marsden, 1986; Ridley, 1987; Walton, 1987).

En el Nuevo Mundo, la VL es producida por *L. chagasi*, que afecta también principalmente a niños con síntomas muy similares a los de la VL causada por *L. infantum* en el Viejo Mundo. De hecho, la hipótesis más aceptada sobre el origen de *L. chagasi* es la evolución de formas de *L. infantum* transportadas por el hombre al nuevo continente durante la época de los colonizadores europeos a comienzos de la Edad Moderna (Mauricio y col., 2000) y se considera en general que *L. infantum* y *L. chagasi* son sinónimos. En escasas ocasiones se han detectado lesiones cutáneas causadas por *L. chagasi* (Oliveira Neto y col., 1986).

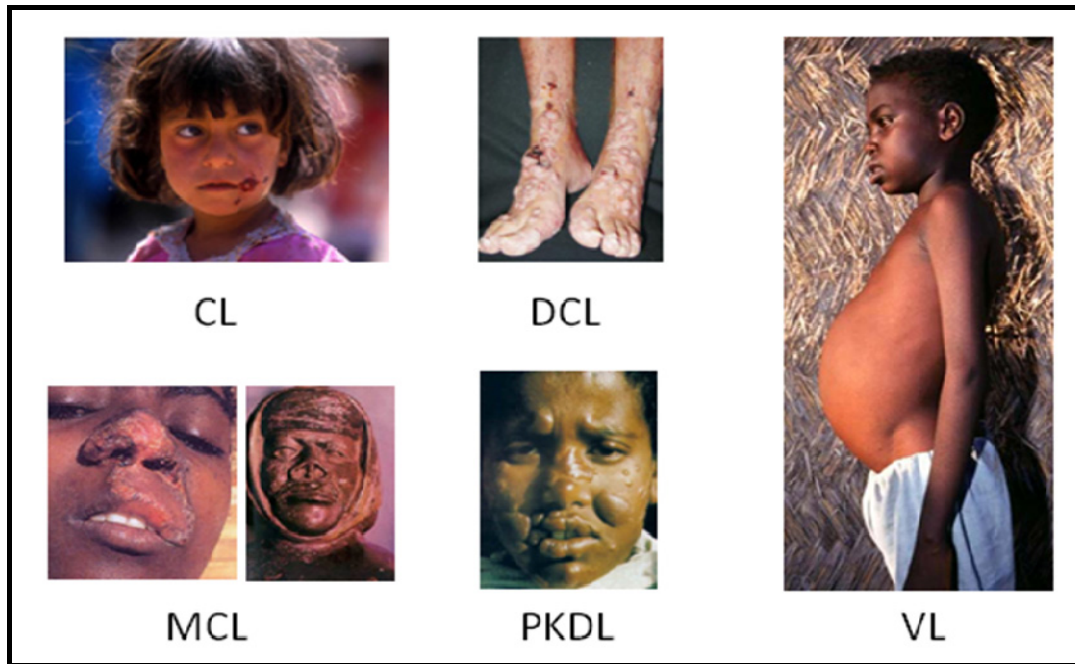


Figura 2. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana. CL, leishmaniasis cutánea o botón de Oriente; DCL, leishmaniasis cutánea diseminada; MCL; leishmaniasis mucocutánea; PKDL, leishmaniasis dérmica post-*Kala-azar*; VL, leishmaniasis visceral o *Kala-azar*.

1.1.2.3. *Leishmaniasis canina.*

A diferencia de la leishmaniasis humana, no existen distintos tipos de leishmaniasis canina, sino que aparecen simultáneamente síntomas cutáneos y viscerales (Ferrer, 1989). Los síntomas clínicos y el tiempo de aparición de la leishmaniasis visceral en perros varían considerablemente, desde la ausencia total de síntomas hasta un cuadro clínico severo (Figura 3). El periodo de incubación es variable y se ha observado que su duración oscila desde dos meses hasta varios años desde el contacto del animal con el parásito en una determinada zona endémica (revisado por Alvar y col., 2004). La sintomatología en la etapa temprana no está descrita de forma precisa, si bien se observa pérdida de peso, astenia y apatía. Los síntomas más frecuentes en el periodo de patencia son: hepatomegalia, esplenomegalia (Slappendel, 1988), linfadenopatía (Abranches y col., 1991), onicogriposis, lesiones cutáneas, pérdida de peso, caquexia, anormalidades locomotoras, somnolencia, conjuntivitis y anorexia (Semiao-Santos y col., 1995). En la fase final de la enfermedad se produce frecuentemente caquexia y muerte del animal por fallo renal o hepático (Ferrer, 1989).



Figura 3. Leishmaniasis canina.

1.1.3. Respuesta inmunitaria.

Una vez que el flebotomo inocula los promastigotes en las vénulas de la dermis del hospedador mamífero, se produce la opsonización y la fagocitosis. Los amastigotes residen en fagocitos mononucleares, polimorfonucleares y células de Langerhans de la dermis. Los promastigotes de algunas especies del género *Leishmania* también infectan a células dendríticas. Dentro del fagolisosoma, los promastigotes se transforman en amastigotes, proliferan y colonizan los macrófagos, estableciendo de este modo la infección. La primera interacción entre el parásito y el hospedador tras la inoculación no parece producirse con las células mononucleares (revisado por Handman, 1999). Tras pocos segundos de contacto con suero sanguíneo humano, se activa la respuesta inmunitaria innata: los promastigotes son opsonizados por los anticuerpos naturales (IgM) del hospedador, que activan la vía clásica del sistema del complemento, la fagocitosis y la inmunoadherencia por deposición de C3 sobre la superficie del parásito. La inmunoadherencia induce la fagocitosis y participa en la solubilización de inmunocomplejos y la eliminación de microorganismos de la sangre para prevenir el daño en los tejidos, actuando así como nexo entre la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa, ya que induce la presentación de antígenos en los centros germinales (Dominguez y Toraño, 2001).

En la respuesta inmunitaria adaptativa, los antígenos de *Leishmania* pueden desencadenar respuestas celulares (Th1) o humorales (Th2). En la respuesta celular de tipo Th1, la interacción de CD40 de las células presentadoras de antígeno con CD40L de los linfocitos T CD4⁺ activados induce la producción de IL-12 (Yamane y col., 1999), que estimula la síntesis de interferón- γ (IFN- γ) en las células NK, linfocitos T CD8⁺ y T $\gamma\delta$. IFN- γ activa al fagocito para la eliminación del parásito al inducir la transcripción del gen de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La acción de IL-4, IL-7 e IL-18 es sinérgica a la de IL-12, y TNF- α y favorece la biosíntesis de iNOS. En la respuesta inmunitaria humoral de tipo Th2, los linfocitos T CD4⁺ secretan citoquinas como IL-4 e IL-10, que estimulan a los linfocitos B para la secreción de IgG e IgE (Awasthi y col., 2004).

El paradigma Th1/Th2 de resistencia/susceptibilidad se limita actualmente a la infección de *L. major* en ratón (Sacks y Noben-Trauth, 2002). La citoquina que está más directamente relacionada con la susceptibilidad es IL-10, capaz de inhibir la producción de IFN- γ e IL-12 (Ribeiro-de-Jesus y col., 1998).

En CL y VL humana no se produce la dicotomía anterior, sino una respuesta mixta Th1/Th2, con elevación de los niveles de IL-10 e IL-4 (Ajadary y col., 2000; Bottrel y col., 2001). En la infección temprana con especies que producen CL se produce una disminución de los niveles de IFN- γ (Carvalho y col., 1995), pero con el tiempo se van ajustando los niveles de estas citoquinas de manera que se puede producir la curación espontánea con un aumento de los niveles de IFN- γ y TNF- α (Ribeiro-de-Jesus y col., 1998). También se ha descrito que IL-10 está relacionada con la progresión de la leishmaniasis hacia la enfermedad visceral (Bacellar y col., 1996).

En la leishmaniasis canina, la respuesta inmunológica protectora está asociada a la elevación de los niveles de IFN- γ y TNF- α para activar los macrófagos y producir así un efecto citotóxico sobre el parásito (Vouldoukis y col., 1996; Pinelli y col., 2000; Ramos y col., 2008). No obstante, tampoco se produce una clara dicotomía entre las respuestas Th1 y Th2 (Alvar y col., 2004; Ramos y col., 2008).

1.1.4. Diagnóstico.

Los casos de leishmaniasis se detectan mediante métodos de diagnóstico etiológico e inmunodiagnóstico. Las muestras se obtienen por biopsia de lesiones cutáneas y aspirado de médula ósea en la zona del esternón en adultos o la cresta ilíaca en niños. En perros se realiza la toma de muestras por biopsias cutáneas y centesis de ganglios linfáticos y médula ósea en la unión costo-condral.

En el diagnóstico etiológico se emplean técnicas directas, como la tinción de Giemsa, la inmunofluorescencia directa (detección directa o indirecta), el cultivo *in vitro* en un tipo de medio agar-sangre (sangre de conejo al 15%) denominado NNN (Novy-Nicolle-McNeal) y la inoculación en animales de experimentación. Además, en el caso de la leishmaniasis canina se ha desarrollado un procedimiento para el xenodiagnóstico utilizando vectores del género *Phlebotomus* (Molina y col., 1994a) y en la coinfección *L. infantum*-HIV se ha descrito el xenodiagnóstico indirecto (Molina y col., 1994b). También se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación con sondas de ADN (Dot blot) para la detección de secuencias específicas del ADN mitocondrial en el diagnóstico etiológico.

En cuanto al inmunodiagnóstico, en las CL y MCL es muy empleado el test de Montenegro, que consiste en la inyección de leishmanina para la detección de la intradermorreacción provocada por la hipersensibilidad celular inducida por el parásito. Para el diagnóstico de la VL es frecuente el uso de técnicas serológicas, como las técnicas de aglutinación (hemaglutinación indirecta, aglutinación en látex y aglutinación directa o DAT), el ensayo de inmunoenzimas (ELISA) con antígenos recombinantes, la inmunofluorescencia indirecta, la contraelectroforesis y el *Western Blot*.

1.1.5. Tratamiento.

En las leishmaniasis humanas, se emplean fundamentalmente los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B, la paromomicina y la miltefosina. Ante los efectos secundarios que presentan, especialmente los dos primeros, el aumento de resistencias y la escasez de nuevos principios activos que puedan ser ensayados clínicamente, se están desarrollando estrategias de terapia combinada (Alvar y col., 2006). Los principios activos leishmanicidas o leishmaniostáticos potencialmente eficaces para el tratamiento de la leishmaniasis canina son más numerosos, siendo los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y el alopurinol los más utilizados (Baneth y Shaw, 2002).

Los antimoniales pentavalentes que se usan en el tratamiento de la leishmaniasis son el antimonio de meglumina (*Glucantime*[®]) y el estibogluconato sódico (*Pentostam*[®]), que reaccionan con los grupos sulfhidrilo bloqueando la fosfofructoquinasa, la β -oxidación de los ácidos grasos y las topoisomerasas.

La anfotericina B es un antibiótico poliénico que se une a los esteroides, alterando la permeabilidad de la membrana. Se comercializa como *Fungizone*[®] para el tratamiento de la leishmaniasis canina, disminuyendo su nefrotoxicidad por calentamiento a 75 °C antes de su administración (Lamothe, 2005). En las leishmaniasis humanas, se tolera mejor el principio activo con formulaciones liposomales (Sundar y Murray, 1996) como *AmBisome*[®], con las que se retarda la liberación y se dirige de modo más específico a los macrófagos (Bern y col., 2006). La anfotericina B desoxicolato o las formulaciones liposomales se utilizan en terapia combinada con paromomicina o miltefosina (Alvar y col., 2006). La paromomicina es un antibiótico aminoglicósido que inhibe la síntesis proteica citosólica y mitocondrial e induce la disminución del potencial de membrana en *L. donovani* (Jhingran y col., 2009).

La miltefosina (hexadecilfosfolina), un alquilfosfolípido comercializado como *Impavido*[®] (leishmaniasis humana) y *Milteforan*[®] (leishmaniasis canina) que se administra por vía oral, inhibe la

Introducción

síntesis de fosfolípidos, glucolípidos y glucoproteínas (Lux y col., 2000). Al igual que la miltefosina (Paris y col., 2004), la edelfosina (octadecilmetilglicerofosfocolina) induce procesos apoptóticos en *L. infantum* (Alzate y col., 2008).

El alopurinol es un fármaco leishmanioestático que se comercializa como Zyloric[®] y se utiliza para el tratamiento de la leishmaniasis canina, pero no en medicina humana. Es un isómero de la hipoxantina con acción leishmanioestática que inhibe de forma competitiva a la xantina oxidasa y, por lo tanto, la síntesis de purinas *de novo*. Su utilización conjunta con los antimoniales prolonga los periodos de remisión clínica espaciando las recidivas (Baneth y Shaw, 2002).

Las diamidinas inhiben la síntesis de proteínas y fosfolípidos, pudiendo producir daños irreversibles en la mitocondria. Además, interfieren en la captación de poliaminas, para las cuales estos parásitos son auxotrofos, e inhiben la fosforilación oxidativa. La pentamidina (*Lomidine*[®]) se utiliza como fármaco de segunda elección en VL (Rees y col., 1985).

Por último, se han descrito otras drogas leishmanicidas o leishmanioestáticas, como derivados de imidazol, 8-aminoquinoleínas, D-L- α -difluorometilornitina, domperidona, hidroxinaftoquinonas (buparvaquona), etc. (Baneth y Shaw, 2002).

Para el tratamiento de las CL se suelen emplear agentes físicos (calor, crioterapia, resección de la lesión) y/o algunos de los fármacos citados por la vía tópica (por ejemplo, pomadas de paromomicina).

1.1.6. Control y profilaxis.

Las medidas de control que se deben adoptar contra los vectores son fundamentalmente (Alvar, 2001a): tratamiento de los criaderos potenciales, como madrigueras y zonas del entorno doméstico mediante nebulización de malatión o lindano; aplicación de deltametrina en los lugares de reposo, como contornos de ventanas, perreras, porches, etc.; y aislamiento de las ventanas con telas metálicas de malla fina impregnadas de insecticidas no residuales de acción inmediata como los piretroides.

Se deben adoptar medidas de control de los reservorios para disminuir la incidencia tanto de las leishmaniasis zoonóticas como antroponóticas. En el caso de las CL zoonóticas se ha considerado la posibilidad de utilizar raticidas, aunque se desconoce si tienen consecuencias negativas, como la migración de estos reservorios a otras zonas. En cuanto a las VL zoonóticas, se sacrifica a los perros vagabundos e incontrolados en las zonas endémicas como España y en el caso de los perros domésticos se realizan encuestas seroepidemiológicas y seguimiento del tratamiento. En las leishmaniasis antroponóticas, el diagnóstico precoz y el uso de mosquiteras instaladas en las camas de los enfermos son importantes medidas de control (revisado por Alvar, 2001a; Alvar y col., 2004).

Ante las limitaciones existentes para el tratamiento de las leishmaniasis debido a las resistencias, recidivas y efectos secundarios, el desarrollo y la implementación de vacunas eficaces puede llegar a contribuir de forma decisiva en el control de la enfermedad. Frente a la leishmaniasis canina se han estudiado un considerable número de candidatos, que se detallan a continuación. Se han desarrollado vacunas de primera generación, como una preparación de extractos proteicos totales de *L. braziliensis* con saponinas como adyuvante, que induce una respuesta inmune citotóxica y la elevación de los niveles de IgG1 e IgG2 en perros (Giunchetti y col., 2007). Ha sido descrita la inmunogenicidad de algunos antígenos como candidatos para el desarrollo de vacunas de segunda generación, como el ligando de fucosa manosa, la proteína de choque térmico hsp70 (Quijada y col., 1996; Carrillo y col., 2008), la proteína hidrofílica de superficie HASPB1 y la histona H1 (Moreno y col., 2007), entre otras. En cuanto a las vacunas de tercera generación (de ADN), se han ensayado varios genes candidatos para vacunas frente

a *Leishmania* en modelos animales. Por ejemplo, se ha desarrollado una estrategia de vacunación de tercera generación frente a *L. major* en modelo de ratón con genes de histonas (Iborra y col., 2004) y otra frente a infecciones experimentales y naturales con *L. infantum* en perros con el gen LACK (análogo de la proteína quinasa C activada) (Ramiro y col., 2003; Ramos y col., 2008; Ramos y col., 2009).

1.2. EL VECTOR.

1.2.1. Biología y ecología.

Los flebotomos o moscas de la arena (*sand flies*) son artrópodos que pertenecen al orden Diptera, familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae y se clasifican del siguiente modo:

Dominio	Eukaryota (Whittaker y Margulis 1978)
Reino	Animalia (Linnaeus 1758)
Subreino	Bilateria (Hatschek 1888)
Rama	Protostomia (Groben, 1908)
Infrarreino	Ecdysozoa (Aguinaldo y col. 1997)
Filo	Arthropoda (Latreille 1829)
Subfilo	Mandibulata (Snodgras 1938)
Infrafilo	Atelocerata (Heymons 1901)
Superclase	Hexapoda (Latreille 1825)
Clase	Insecta (Linnaeus 1758)
Subclase	Pterygota (Lang 1888)
Infraclase	Neoptera (Martynov 1923)
Superorden	Endopterygota (Sharp 1898)
Orden	Diptera (Linnaeus 1758)
Suborden	Nematocera (Berthold 1827)
Infraorden	Psychodomorpha (Hennig 1960)
Superfamilia	Psychodoidea (Crampton 1924)
Familia	Psychodidae (Bigot 1854)
Subfamilia	Phlebotominae (Walker 1851)
Género	<i>Phlebotomus</i> (Loew 1845) <i>Lutzomyia</i> (França 1924) <i>Sergentomyia</i> (França y Parrot 1920)

Alrededor de 70 de las aproximadamente 600 especies descritas de la subfamilia de los flebotómicos actúan como hospedadores vectores de los protozoos del género *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990; Bates, 2008). Estas especies pertenecen al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, mientras que las sauroleishmanias tienen afinidad por los flebotómicos del género *Sergentomyia*.

Los dípteros de la subfamilia de los flebotómicos son insectos holometábolos. Sólo las hembras pueden actuar como vectores en el ciclo biológico del parásito, pues son hematófagas, a diferencia de los machos, que se alimentan sólo de jugos de plantas. La metamorfosis es compleja, ya que el ciclo vital

Introducción

consta de las cuatro fases: el huevo, la larva, la ninfa y el adulto o imago. Los huevos son ovalados y su tamaño aproximado es de 100 x 350 μm (Killick Kendrick, 1979). La ovoposición es de 50-100 huevos (Ward, 1985) y se estimula a través de feromonas (Dougherty y col., 1994). El tiempo de incubación depende de factores higrótérmicos (Theodor, 1936); por ejemplo, el de *P. perniciosus* es de unos 15 días (Molina, 1991). A continuación, se desarrollan en total cuatro estadios larvarios ápodos y de forma cilíndrica (0,5-1,0 mm), y después de unas tres semanas, se alcanza la forma de pupa. La ninfa o pupa sésil tiene una longitud de aproximadamente 3 mm, dando lugar al adulto tras 8 ó 9 días (Theodor, 1936). El adulto es de color pardo-amarillento y su tamaño varía entre 2 y 3 mm. La longitud de las patas es elevada en relación con el tamaño del tórax. Las alas son lanceoladas y están dispuestas en ángulo de 45° con el eje corporal. La implantación de la cabeza en el tórax es inferior, lo que le confiere un aspecto giboso por el cual recibe el nombre de “beatilla” (Figura 4A). El estomodeo está constituido básicamente por el estoma o cibario y la faringe, conectada al cibario por la válvula cibarial. El mesenterio ocupa la región media del tubo digestivo y está conectado a la faringe por la válvula estomodeal (Figura 4 B y C).

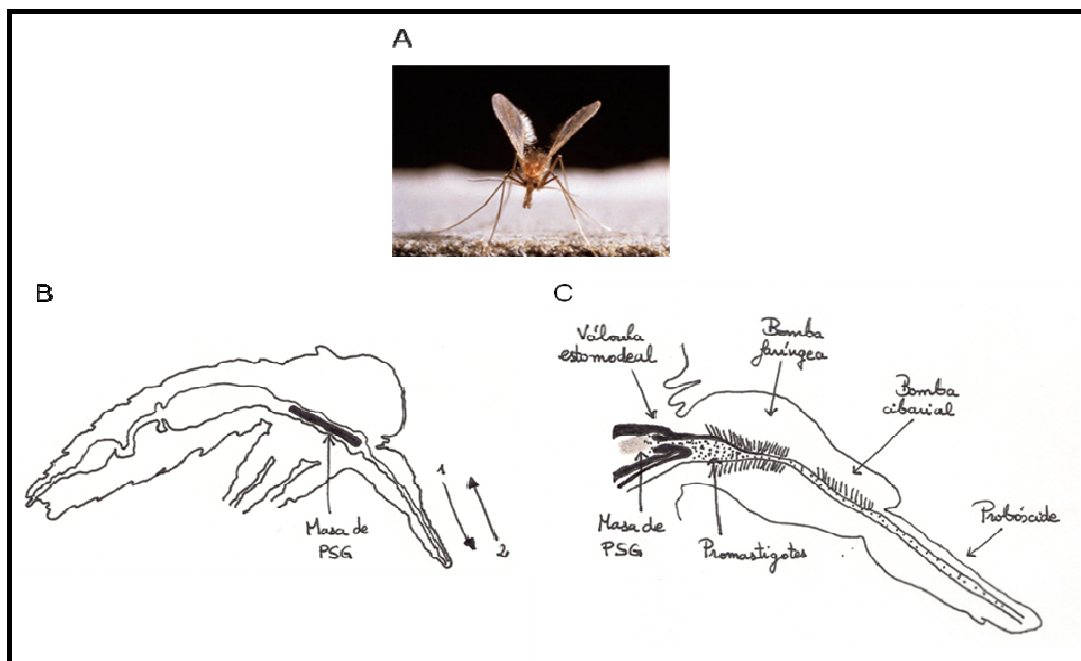


Figura 4. Esquema del corte sagital de una hembra de flebotomo infectada con promastigotes. (A) Flebotomo adulto hembra. (B) Esquema completo del corte sagital. Se muestra la posición de la masa de gel de secreción de los promastigotes (PSG) (sección 1.2.4.). (1) La masa de PSG tiene que ser expulsada para posibilitar (2) la ingesta de sangre. (C) Detalle del tubo digestivo anterior. Adaptado de Bates, 2007.

Los flebotómicos se encuentran distribuidos ampliamente en muchas zonas del planeta. Realizan su ciclo vital completo durante todo el año en las zonas tropicales y de mayo a octubre en la región Paleártica. Resisten el invierno (diapausa) en estadio de larva IV (Ready y Croset, 1980). La ovoposición se realiza en lugares arenosos ricos en materia orgánica, en penumbra, con humedad relativa alta y temperatura constante como las madrigueras, los vertederos, las oquedades de los árboles viejos, etc. En ausencia de viento y a una temperatura superior a los 18 °C, tienen actividad crepuscular y nocturna (Killick-Kendrick, 1999). El ciclo gonotrófico es el periodo comprendido entre la ingesta y la puesta de

huevos y su duración es de 4 ó 5 días. En algunas especies sólo se realiza una ingesta por cada ovoposición (concordantes gonotróficos), mientras que en otras es necesario ingerir alimento regularmente, aunque sea más de una vez para cada ovoposición (discordantes gonotróficos). Una vez infectados, los flebotomos son capaces de transmitir los parásitos del género *Leishmania* durante toda su vida. Desde el punto de vista epidemiológico, hay que tener en cuenta que la mayor parte de las especies presentan fototropismo.

En España hay diez especies de flebotomos descritas. Sin embargo, sólo dos son consideradas como vectores principales de *L. infantum*, según sus características etológicas y el riesgo epidemiológico que presentan: *P. perniciosus* y *P. aiasi*. Ambas especies son zoo-antropófilas y presentan un ciclo gonotrófico concordante (revisado por Alvar, 2001b).

1.2.2. Interacción parásito-vector.

Las aproximadamente 20 especies de *Leishmania* relevantes desde el punto de vista sanitario son transmitidas en general por una o dos especies de flebotomos cada una, por lo que hay un cierto grado de especificidad en la interacción entre el parásito y el vector (Sacks, 2001). Durante el desarrollo de los promastigotes en el interior del tubo digestivo del vector, tiene un papel crucial la motilidad, por lo que se elonga el flagelo en el proceso de diferenciación de los amastigotes a promastigotes. Recientemente, se ha propuesto que este desplazamiento no se produce erráticamente, sino que es dirigido por taxis: quimiotaxis positiva ante ciertos azúcares y los componentes de la saliva del flebotomo y osmotaxis como respuesta a concentraciones crecientes de sales (Barros y col., 2006). Es posible que la presencia de dichos azúcares en el medio influya en la diferenciación del parásito, ya que se producen cambios en la composición del glicocálix. En cuanto a la osmotaxis, se ha sugerido que las acuagliceroporinas del parásito podrían participar en la regulación de la presión osmótica y del volumen celular (Figarella y col., 2007).

Algunos promastigotes se adhieren al tubo digestivo anterior y a la válvula estomodeal, ambas revestidas de cutícula. Esta interacción se produce mediante hemidesmosomas de la parte anterior del flagelo. Recientemente ha sido descrito otro tipo de unión de los promastigotes al epitelio del tubo digestivo medio de tipo receptor-ligando, en concreto una glectina que interacciona con el lipofosfoglicano (LPG) de *L. major* (Kamhawi y col., 2004). Gracias a este tipo de interacciones, los promastigotes son capaces de resistir al tránsito de la sangre ingerida a lo largo del tubo digestivo. Como posible mecanismo de liberación de los promastigotes de *L. major* del tubo digestivo de *P. papatasi*, se han descrito cambios en la composición química del LPG, coincidiendo con la diferenciación al estadio metacíclico (Sacks y Kamhawi, 2001).

Los promastigotes dañan la válvula estomodeal por la acción de quitinasas para finalizar su migración hacia el tubo digestivo anterior. Para que la transmisión al hospedador mamífero por la picadura del vector tenga éxito, debe existir una proporción suficiente de promastigotes metacíclicos en el momento de la ingesta (Rogers y Bates, 2007). Uno de los mecanismos propuestos para explicarlo consiste en la síntesis del gel de secreción de los promastigotes (PSG) o proteofosfoglicano filamentoso (fPPG), que obstruye el canal alimentario y aumenta así el tiempo de succión de sangre y de inoculación de saliva, en la que se encuentran los promastigotes (Figura 4B y 4C) (Rogers y col., 2004).

1.3. EL GÉNERO *Leishmania*.

1.3.1. Taxonomía y filogenia.

Los protozoos responsables de la leishmaniasis pertenecen al género *Leishmania* y son quimioorganoheterótrofos. Fueron descritos por primera vez por Leishman en 1900 y por Donovan en 1903 (revisado por Handman, 1999) y se clasifican del siguiente modo (revisado por Chang y col., 1985; Rioux y col., 1990):

Dominio	Eukaryota (Whittaker y Margulis 1978)
Reino	Protista (Haeckel 1866)
Subreino	Protozoa (Goldfuss 1817)
Filo	Sarcomastigophora (Honigberg-Balamuth 1963)
Subfilo	Mastigophora (Deising 1866)
Clase	Zoomastigophorea (Calkins 1909)
Orden	Kinetoplastida (Honigberg 1963)
Suborden	Trypanosomatina (Kent 1880)
Familia	Trypanosomatidae (Döflein 1901)
Género	<i>Leishmania</i> (Ross 1903)

Sin embargo, la clasificación de los protistas ha ido cambiando constantemente con la aparición de nuevos criterios taxonómicos ultraestructurales (Cavalier-Smith, 1981) y moleculares (Hausmann y Hülsmann, 1996), por lo que la clasificación de los tripanosomátidos se puede plantear como sigue:

Reino	Excavata (Cavalier-Smith 1981) Mastigota (Hausman y Hülsmann 1996)
Superfilo	Discicristata (Cavalier-Smith 1993)
Filo	Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981)
Subfilo	Saccostoma (Cavalier-Smith 1998)
Clase	Kinetoplastea (Honigberg 1963 <i>stat. nov.</i> Margulis 1974)
Orden	Trypanosomatida (Kent, 1880 <i>stat. nov.</i> Hollande 1952)

El género *Leishmania* apareció probablemente en el Mesozoico, antes de la separación de Gondwana, y es monofilético (Thomaz-Soccol y col., 1993b; Croan y col., 1997). Algunos autores consideran que el subgénero *L. (Viannia)* y el género *Endotrypanum* son los ancestros del subgénero *L. (Leishmania)*, habiéndose originado como consecuencia en la región Neártica (Thomaz-Soccol y col., 1993b; Noyes, 1998). La existencia de una mayor diversidad de especies de *Leishmania* en el Nuevo Mundo fue considerada como una evidencia del origen neártico del género (Croan y col., 1997). Sin embargo, Kerr (2000) consideró errónea la asunción de una tasa de especiación constante y revisó las evidencias a favor del origen paleártico del género y de la dispersión hacia la región neártica en el Cenozoico temprano de los reservorios y los vectores como origen de las especies del Nuevo Mundo, afirmando que en la base del árbol filogenético se sitúa el subgénero *L. (Leishmania)* y el género/subgénero *Sauroleishmania*.

GÉNERO	SUBGÉNERO	ESPECIE	PATOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA (VECTOR)	TIPO DE TRANSMISIÓN OTROS HOSPEDADORES VERTERADOS	GÉNERO DEL VECTOR
Phytomonas		<i>L. donovani</i> <i>L. enriksdali</i>	VL, PKDL; Bangladésh, Nepal, India (<i>P. (E.) argenteipes</i>), Norte África a China occidental (<i>P. (P.) alexanderi</i>), Kenia, Etiopía (<i>P. (S.) coliae</i>), <i>P. (S.) maritimi</i> , Etiopía, Sudán (<i>P. (L.) orientalis</i>), VL, Sudán	Antropoponosis. Antropoponosis. Roedores, carnívoros.	<i>Phlebotomus</i> (V. M.)
		<i>L. infantum</i>	VL; Albania, Bosnia-Herzegovina, Chipre, Malta (<i>P. (L.) neglectus</i>).	Zoonosis. Perro.	<i>Lutzomyia</i> (N. M.)
Trypanosoma		<i>L. chagasi</i> <i>L. tropica</i>	VL, CL; Oriente Medio (<i>P. (A.) brevis</i>), Argelia, Marruecos, (<i>P. (L.) perfluvio</i>), Egipto, Libia, Túnez, (<i>P. (L.) turcomeni</i>), España, Surde Francia, Portugal (<i>P. (L.) perniciosus</i>), <i>P. (L.) aransi</i> , Croacia, Italia, Grecia (<i>P. (L.) neglectus</i>).	Zoonosis. Cánidos.	
		<i>L. killicki</i>	VL; Argentina, Bolivia, Colombia, El Salvador, Guatemala, México, Nicaragua, Países Bajos, Venezuela, VL, CL; Brasil, Chile, Ecuador, Etiopía, India, Israel, Siria, Surde Asia, Oriente Medio (<i>P. (P.) sergenti</i>), Kenia (<i>P. (L.) aculeatus</i>), <i>P. (L.) guayanaensis</i> , Namibia (<i>P. (P.) nearcticus</i>)	Antropoponosis o zoonosis. Cánidos.	
Saurorleishmania		<i>L. major</i>	CL; Arabia Saudí, Argelia, Jordania, Kazajistán, India, Irán, Israel, Libia, Marruecos, Paquistán, Tajikistán, Túnez, Turkmenistán, Uzbekistán (<i>P. (P.) papatasi</i>), Kenia, Namibia, Senegal (<i>P. (P.) suboscip.</i>)	Antropoponosis. Zoonosis. Roedores, conejos, mustélidos, erizos.	<i>Phlebotomus</i> (V. M.)
		<i>L. ethiopia</i> <i>L. gerbilli</i>	CL, DCL; Etiopía, Kenia, Sudán, (<i>P. (L.) longipes</i>), <i>P. (L.) pediferi</i> .	Zoonosis. Damán. (Fam. Procyonidae) Cenizo (<i>Neotomastrogilicariatus</i>).	
Leishmania		<i>L. turanica</i>	CL; Bélgica, Costa Rica, (Lu, Lu) <i>olmeca olmeca</i> Ecuador, Perú (Lu, Lu) <i>ajacuahuensis</i> , El Salvador, Guatemala (Lu, Lu) <i>olmeca olmeca</i> , República Dominicana (Lu, Lu) <i>(C.) christopheli</i> ; CL, ADCL; Colombia (Lu, sp), Honduras, Méjico (Lu, Lu) <i>olmeca olmeca</i> , Estados Unidos (frentera Tejas-Méjico) (Lu, D) <i>antophora</i> , Lu, (Lu) <i>(Mabalia)</i> .	Zoonosis. Roedores.	
		<i>L. amazonensis</i> <i>L. antistasi</i> <i>L. ganhami</i> <i>L. fortini</i> <i>L. enneti</i>	CL; Bolivia, Brasil, Colombia, Guayana Francesa, Paraguay (Lu, Lu) <i>(N.) feiscuteletta</i> .	Zoonosis. Roedores.	
Blastocritidia		<i>L. braziliensis</i>	CL; Venezuela (Lu, Lu) <i>olmeca</i> .	Zoonosis. Roedores y marsupiales.	
		<i>L. peruviana</i>	CL; cordillera de los Andes.	Zoonosis. Equidos y felidos.	
Orithidia		<i>L. guyanensis</i>	CL; Argentina, Bélgica (Lu, sp), Guatemala (Lu, Lu) <i>(V.) ovalifera</i> ; CL, MCL; Brasil (Lu, Lu) <i>canerai</i> , Lu, (Ps) <i>compleva</i> , Lu, (Ps) <i>hellingeri</i> , Lu, (N) <i>whitmani</i> , Lu, (N) <i>(M.) mermosa</i> , Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana Francesa, Honduras, Surde Francia, Surde Italia, Surde Perú, Surde Uruguay, Surde Venezuela.	Zoonosis. Equidos y felidos.	
		<i>L. panamensis</i>	CL; Brasil (Lu, Lu) <i>peruviana</i> , Lu, (N) <i>(M.) venezuelana</i> .	Zoonosis. Zangüeyes (<i>Delphich marsupialis</i>)	
Herpetomonas		<i>L. shawi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. rufi</i>	CL; Colombia (Lu, Lu) <i>anduzi</i> , Guayana Francesa (CL, MCL; Brasil (Lu, Lu) <i>(N.) anduzi</i> , Lu, (N) <i>umbraffili</i>).	Zoonosis. Roedores y zangüeyes.	<i>Lutzomyia</i> (N. M.)
		<i>L. hoogstraali</i>	CL; Colombia (Lu, Lu) <i>trapido</i> , Costa Rica, Panamá, (Lu, Lu) <i>(N.) trapido</i> , Lu, (N) <i>(M.) yephelebra</i> , Venezuela (Lu, Lu) <i>(V.) ovalifera</i>).	Zoonosis. Roedores, cánidos, felidos, equidos.	
Leptomonas		<i>L. adleri</i> <i>L. gymnodactyl</i> <i>L. guilki</i>	CL, MCL; Honduras, Nicaragua (Lu, Lu) <i>trapido</i> .	Zoonosis. Roedores, cánidos, felidos, equidos.	
		<i>L. deanei</i> <i>L. heneri</i> <i>L. herfigi</i>	CL; Brasil (Lu, Lu) <i>(T.) tobiquialis</i> .	Zoonosis. Cánidos.	
Endotrypanum		<i>L. sauroleishmania</i>	CL, VL; Colombia, Venezuela (Lu, Lu) <i>(H.) hartmanni</i> .	Zoonosis. Roedores, xenarctos, xenarctos, prociomidos, xenarctos, roedores, cánidos, felidos, prociomidos.	<i>Sergentomyia</i>
		<i>L. colombiensis</i> <i>L. equatoriensis</i>		Zoonosis. Primates, xenarctos, prociomidos, roedores.	<i>Lutzomyia</i> (N. M.)

Figura 5. Árbol filogenético del género *Leishmania* y descripción de la distribución, la patología y los vectores de cada especie. Adaptado de Zuckerman y Lainson, 1977; Ward, 1985; Griffiths, 1987; Rees y Kager, 1987; Walton, 1987; Lainson y Shaw, 1988; Killick-Kendrick, 1990; Alvar, 2001b; Sacks, 2001; Sacks y col., 2008. *Saurorleishmania* es considerado como un género independiente que se halla en la base evolutiva del género *Leishmania* (Lysenko, 1971; Kerr, 2000) o bien como una subespecie del género *Leishmania* que derivó del subgénero *L. (Leishmania)* según los datos más recientes a nivel molecular (Croan y col., 1997; Noyes, 1998). Tampoco hay acuerdo sobre la división del género en las secciones *Euleishmania* y *Paraleishmania*, dos linajes polifiléticos (Cupolillo y col., 2000). Mientras que la primera contiene a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, la segunda incluye a *L. equatoriensis* y *L. colombiensis*, ambas sometidas a reclasificación.

Introducción

No obstante, las pruebas a favor del origen paleártico del género *Leishmania* no parecen adecuadas para explicar el origen del subgénero *L. (Viannia)* según otros autores (Safjanova, 1986; Thomaz-Soccol y col., 1993a; Cupolillo y col., 2000), que propusieron el origen neotropical por especiación alopátrida de la sección *Euleishmania* por la que se diferenciaron los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*, al igual que una divergencia más antigua de *Euleishmania* y *Paraleishmania* (Figura 5).

El origen del complejo *L. donovani*, comprendido por las especies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* y *L. archibaldi* se produjo en el Mioceno hace entre 14 y 24 millones de años y divergió en *L. infantum* alrededor de la cuenca mediterránea, *L. donovani* en África y más tarde (hace aproximadamente 1 millón de años) en Asia (Lukes y col., 2007). *L. chagasi* es considerada por muchos autores como sinónimo de *L. infantum*, al igual que *L. archibaldi* de *L. donovani*. De hecho, *L. chagasi* derivó de la introducción de *L. infantum* en la historia reciente en Sudamérica (Mauricio y col., 2000).

La clasificación del género *Leishmania* (Figura 5) está basada en el patrón isoenzimático y en criterios de taxonomía numérica (Dedet, 1993). Un zimodema es un patrón de isoenzimas identificado por electroforesis. En países de la cuenca mediterránea se han descrito 25 zimodemas de *L. infantum* en hospedadores principales o secundarios. También se emplean técnicas genotípicas: hibridación con sondas de ADN genómico y del kinetoplasto (ADNk), RFLP, y técnicas de PCR (RAPD y PCR-RFLP) (revisado por Alvar, 2001c). La divergencia entre las diferentes estirpes de *L. infantum* es mayor en África que en Europa. El zimodema MON-1 de *L. infantum* destaca por la abundancia de estirpes que lo presentan y está asociado a VL, aunque ha sido hallado también en algunos casos de CL. Algunas cepas han perdido la capacidad de visceralizar y producen CL, como las que presentan los zimodemas minoritarios MON-11 ó MON-29 (Rioux y col., 1986; Lukes y col., 2007).

1.3.2. Biología celular y aspectos básicos de la diferenciación.

El ciclo biológico de *Leishmania* es dimórfico y digenético porque en él se produce la alternancia de dos estadios en dos hospedadores diferentes. El promastigote es el estadio extracelular móvil con flagelo emergente en la parte anterior del cuerpo celular y morfología fusiforme y el amastigote es el estadio intracelular esférico u ovoide sin motilidad, debido a que el flagelo no emerge del cuerpo celular. Los promastigotes se desarrollan en el tubo digestivo del vector invertebrado de la familia Phlebotominae y migran simultáneamente hacia la probóscide. Los amastigotes, en cambio, son formas intracelulares, ya que infectan a células fagocíticas del hospedador definitivo mamífero.

Cuando un flebotomo ingurgita sangre, inocula con su saliva los promastigotes de la probóscide en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado. A continuación, los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, donde el parásito se transforma en la forma amastigote y se multiplica en el interior de la vacuola parasitófora o fagolisosoma. La progresión de la enfermedad depende fundamentalmente de la virulencia del parásito y de la eficacia de la respuesta inmunitaria del hospedador. Los amastigotes se liberan a la sangre cuando colapsan al fagocito infectado por su multiplicación, e inmediatamente infectan a otros fagocitos, aumentando la carga parasitaria en el hospedador. Cuando otro flebotomo ingiere sangre de un hospedador infectado, los amastigotes son liberados en el interior del tubo digestivo y se transforman de nuevo en promastigotes, cerrándose así el ciclo (Figura 6) (revisado por Moody, 1993).

En el ciclo biológico de *Leishmania* se producen tres procesos fundamentales de diferenciación: la diferenciación de los promastigotes en el interior del tubo digestivo del vector con la adquisición de mayor capacidad infectiva, la diferenciación de los promastigotes a amastigotes cuando son inoculados

por el vector en la dermis del hospedador mamífero y a la inversa cuando el vector se infecta del mamífero infectado (Figura 6).

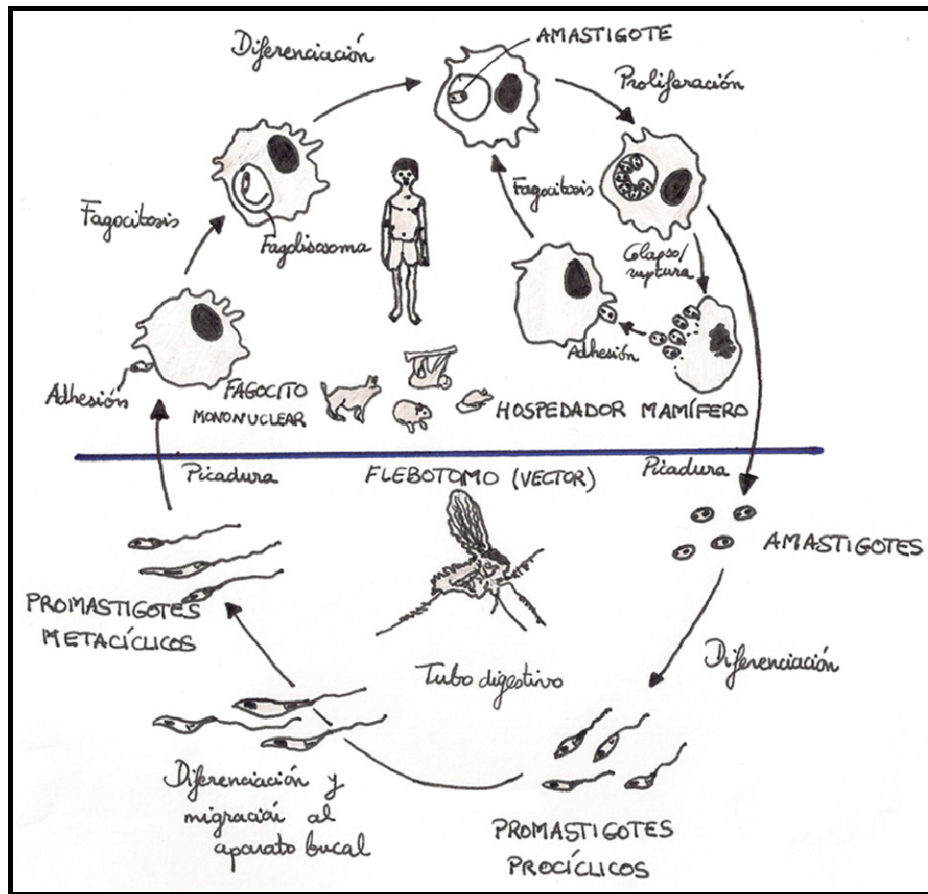


Figura 6. Ciclo biológico de *Leishmania*. Adaptado de Handman, 1999.

Tras la liberación de los amastigotes ingeridos por el flebotomo, se forma una membrana “no verdadera”, denominada membrana peritrófica, que está constituida por fibrillas de quitina, proteínas y glucoproteínas secretadas por el epitelio del tubo digestivo. A continuación se produce la transformación de los amastigotes en promastigotes procíclicos, que se multiplican en el interior de la membrana peritrófica, son ovoides y su longitud es de 6-8 μm (Killick Kendrick, 1979). Los promastigotes se desarrollan paralelamente a su migración hacia el tubo digestivo anterior del vector, con el cual interaccionan estrechamente (sección 1.2.2.). Hacia los diez días de la entrada en el vector, los promastigotes pierden la adherencia, al cambiar la composición del LPG, el flagelo se vuelve a alargar, el cuerpo celular se estrecha, se acumulan gran cantidad de vesículas exocíticas en las proximidades del bolsillo flagelar o blefaroplasto y se sitúan ya de manera libre en la hipofaringe. La denominación de los morfotipos procíclico y metacíclico de los promastigotes de *Leishmania* fue acuñada por Sacks (Sacks, 1989) por analogía con las formas completamente diferenciadas de *Trypanosoma brucei*, definiendo a los promastigotes procíclicos como las formas indiferenciadas en división y a los metacíclicos como el morfotipo diferenciado que es inoculado en el hospedador mamífero con la picadura del vector (Figura 6).

Los promastigotes metacíclicos que resisten la respuesta inmunitaria innata del hospedador mamífero (sección 1.1.3.) interaccionan con fagocitos mononucleares y, después de su internalización, se diferencian a amastigotes, formas esféricas o cuasi-esféricas de 2-4 μm cuyo flagelo no emerge del

Introducción

blefaroplasto. La diferenciación se produce en el interior de los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas, así como su posterior crecimiento y multiplicación. En el entorno del fagolisosoma, el amastigote tiene que hacer frente a las enzimas lisosómicas, al pH ácido (4,5-5,5) y a la temperatura fisiológica del mamífero (Chang y Dwyer, 1976).

Los protozoos del género *Leishmania* se reproducen por multiplicación asexual o agamogonia. Los promastigotes se dividen por bipartición longitudinal desde la zona anterior a la posterior, exceptuando los promastigotes metacíclicos, que no se dividen. La división celular de los amastigotes se realiza por fisión binaria simple. La reproducción sexual o el intercambio genético no está completamente demostrado, si bien han sido documentadas algunas evidencias: el aislamiento de un híbrido natural de *L. major* y *L. arabica* según un patrón isoenzimático característico o la necesidad de inactivar los dos alelos de un gen a la hora de obtener un mutante nulo homocigoto (*knockout*) de estos organismos diploides (Cruz y col., 1993). Sin embargo, también hay otras pruebas que favorecen la hipótesis contraria, pues no hay una elevada divergencia en el cariotipo, de manera que éste está formado por un conjunto de cromosomas muy conservados y otro más variable. La clonalidad no conlleva necesariamente ausencia de recombinación, sino que ésta no es lo suficientemente frecuente como para romper la estructura de la población clonal (Tibayrenc, 1992).

La ultraestructura de los promastigotes y los amastigotes está detallada en la Figura 7. La parte externa de la membrana plasmática consta de un glicocálix o cubierta de glicoconjugados fundamentales para la supervivencia del parásito, siendo más abundante en el blefaroplasto. Por debajo de la membrana plasmática se disponen en espiral haces de microtúbulos subpeliculares que confieren mayor estabilidad morfológica y cierto movimiento contráctil a la célula (Hommel, 1978). La base del flagelo está embebida en el blefaroplasto, al que se une mediante hemidesmosomas. El flagelo se halla recubierto también por la membrana plasmática y en paralelo al axonema se dispone el vástago paraflagelar (*paraflagellar rod*) (Bastin y col., 1996).

Cada célula de *Leishmania* contiene una única mitocondria que presenta un área denominada kinetoplasto que contiene el ADN mitocondrial o del kinetoplasto (ADNk), el cual se diferencia del ADN mitocondrial de otros eucariotas en la presencia de decenas de copias de moléculas circulares de hasta 40 Kpb aproximadamente llamadas maxicírculos. Éstos contienen los genes mitocondriales codificantes para algunos de los componentes de la cadena respiratoria. Otra diferencia fundamental es la presencia de miles de copias de decenas de clases de minicírculos, moléculas con un tamaño inferior a 1Kpb, cada una de las cuales contiene un pequeño gen que codifica para un ARN guía (ARNg) que participa en un proceso de modificación del ARN de algunos genes mitocondriales específico de los tripanosomátidos que consiste en la inserción o la delección de uridinas (Brennicke y col., 1999).

El núcleo contiene los elementos característicos propios de los organismos eucariotas. Los ribosomas se disponen en cadenas arrosariadas generalmente liberadas del retículo endoplásmico (RE) (Chatterjee y Gupta, 1970). Además, de vacuolas, la célula contiene cuerpos amorfos, gránulos de Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} , acantosomas, megasomas que contienen proteasas en promastigotes metacíclicos y, por último, el glicosoma, orgánulo propio de los tripanosomátidos similar al peroxisoma en el que se llevan a cabo procesos como la β -oxidación (β -ox) de los ácidos grasos (AG), la mayor parte de las etapas del metabolismo de los glúcidos (vía de las pentosas fosfato y parte de la glucólisis) y la síntesis de isoprenoides, además de las funciones propias del peroxisoma (Hannaert y col., 1992; Hannaert y col., 2003).

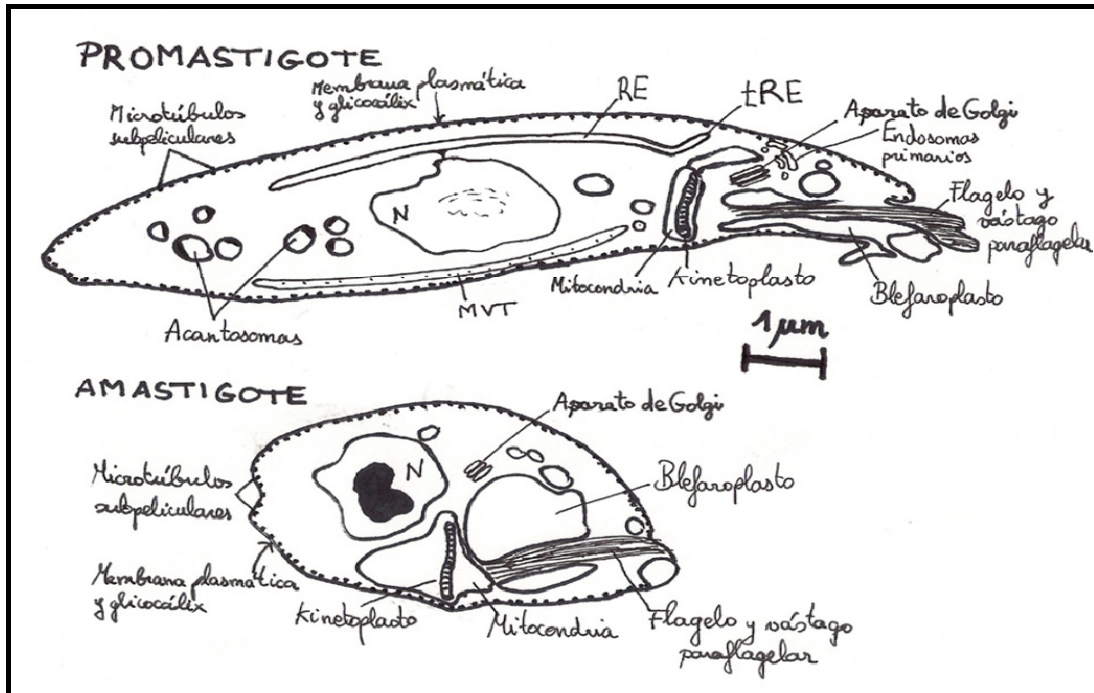


Figura 7. Morfología y ultraestructura del promastigote y el amastigote de *Leishmania*. MVT, túbulo multivesicular; RE, retículo endoplásmico; tRE, RE transicional; Adaptado de McConville y col., 2002; Handman y col., 2008.

El RE se extiende a lo largo del cuerpo celular y presenta una cisterna a modo de extensión en las proximidades del aparato de Golgi en formas en división (promastigotes procíclicos o en fase logarítmica de cultivo) denominada RE transicional especializado (tRE), desde el cual hay una intensa actividad de transporte de lípidos y proteínas al aparato de Golgi (Pimenta y De Souza, 1985; Mullin y col., 2001). Hasta ahora, no hay evidencias de que el citoesqueleto participe en este proceso de transporte, aunque se ha descrito que uno o dos microtúbulos mantienen unidos al tRE y al aparato de Golgi, y no se sabe si se puede producir transporte desde otras zonas del RE (revisado por McConville y col., 2002). En tripanosomátidos tiene mucha importancia el mecanismo de movimiento de las cisternas del aparato de Golgi hacia la cara *trans*, que se requiere sobre todo para la maduración de complejos macromoleculares muy grandes, como el fPPG de los promastigotes y los amastigotes de *Leishmania* (Stierhof y col., 1994). Además de los lisosomas convencionales, los parásitos del género *Leishmania* poseen un tipo especial de lisosoma, el túbulo multivesicular (MVT), que se extiende a lo largo de buena parte del cuerpo celular. A él están destinadas para su degradación algunas proteínas del RE, como la doliquilmanosa fosfato sintasa (Mullin y col., 2001). Otros tripanosomátidos de los géneros *Trypanosoma* y *Crithidia* disponen también de vesículas de tipo MVT (revisado por McConville y col., 2002). Los acantosomas constituyen otro tipo de vacuolas cuyo lumen se encuentra acidificado en tripanosomátidos. A diferencia de los lisosomas, los acantosomas carecen de proteasas y son orgánulos de almacenamiento, ya que contienen reservas de polifosfato, calcio, sodio, zinc y magnesio (Docampo y Moreno, 1999; Docampo y Moreno, 2001).

A diferencia de lo que ocurre en células animales, el aparato de Golgi, el corpúsculo basal, el flagelo, el kinetoplasto y la mitocondria no se dividen durante la progresión del ciclo celular en tripanosomátidos y se produce la fisión medial de los mismos durante la mitosis (Weise y col., 2000).

1.3.3. Metabolismo.

En todos los estadios de *Leishmania* se expresan las enzimas de la glucólisis y de la vía de las pentosas fosfato, muchas de las cuales son glicosomales (Opperdoes y Coombs, 2007). La sacarosa y otros disacáridos también pueden ser usados como principal fuente de carbono y energía en los promastigotes. Parece que la membrana del glicosoma es impermeable al ATP y al NADH, por lo que han de ser regenerados en el interior del glicosoma, en cuyo lumen se ha detectado una malato deshidrogenada dependiente de NADH y una fumarato reductasa. No se han detectado hasta ahora transportadores en la membrana del glicosoma (revisado por McConville y col., 2008).

Los AG sintetizados *de novo* o adquiridos del entorno extracelular pueden ser incorporados en los triacilglicéridos (TAG), que son empaquetados en cuerpos lipídicos relacionados probablemente con la membrana del RE. Se han anotado algunas TAG lipasas (TGL) en los genomas de *L. major* y *L. infantum*. Estas enzimas son las encargadas de movilizar estas reservas lipídicas durante periodos de privación de nutrientes (revisado por McConville y col., 2008). El glicerol que resulta liberado en estas reacciones podría constituir una fuente importante de carbono en los amastigotes, mientras que los AG liberados en estas reacciones son utilizados para la obtención de energía a partir de la β -ox glicosomal y mitocondrial, ya que se produce acetyl-CoA, que puede ser integrado en el ciclo de Krebs y en la vía gluconeogénica. En estos parásitos no se ha definido aún la mayor parte de las enzimas relacionadas con este proceso catabólico (Berriman y col., 2005). La glucólisis es más activa en los promastigotes y la β -ox en los amastigotes (Opperdoes y Coombs, 2007).

En el género *Leishmania* se sintetizan esfingolípidos *de novo* a partir de la reacción de la serina palmitoiltransferasa, que se expresa sólo en los promastigotes. Los amastigotes, por su parte, obtienen los esfingolípidos que necesitan a partir del hospedador. Esta vía anabólica conduce a la síntesis de ceramida, la cual es modificada con inositol para formar inositolfosfoceramida (IPC), que es el esfingolípido mayoritario de estos parásitos (Singh y col., 1988; Ralton y McConville, 1998). La IPC de *L. mexicana* se localiza en el aparato de Golgi, al igual que en levaduras. La síntesis de isoprenoides y esteroides se realiza en el glicosoma, ya que es en este orgánulo donde se han hallado las enzimas responsables de la misma. El precursor de estos derivados es el hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA), que se genera en la mitocondria a partir de leucina en vez de acetato (Ginger y col., 1999; Ginger y col., 2001).

En ausencia de glúcidos, en el género *Leishmania* se pueden utilizar aminoácidos como fuente principal de carbono y energía (Burchmore y col., 2003). Los amastigotes presentan una alta tasa de incorporación de aminoácidos y expresan aminoácido permeasas específicas de manera concomitante con el decremento de la adquisición de hexosas (Hart y Coombs, 1982; Mazareb y col., 1999). La mayor parte de los aminoácidos pueden ser catabolizados por estos parásitos en todos sus estadios (Hart y Coombs, 1982), con la excepción del triptófano, la lisina y la histidina (Berriman y col., 2005). Sin embargo, son auxotrofos para arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, triptófano, tirosina, valina y metionina (revisado por McConville y col., 2008), por lo que su capacidad de síntesis de aminoácidos es similar a la de los metazoos. La metionina se transforma en S-adenosil-metionina (SAM), que es el donador de metilo en todas las reacciones de transmetilación excepto en aquellas que participan en la regeneración de metionina a partir de homocisteína (Reguera y col., 2007).

L. major contiene todas las enzimas del ciclo de la urea excepto la arginina-succinato liasa (Berriman y col., 2005; Ivens y col., 2005), por lo que también es auxotrofo para arginina. Este aminoácido puede ser transformado en otro no proteínogénico precursor de las poliaminas, la ornitina. La

conversión de la ornitina a putrescina y a continuación a espermidina se realiza mediante la catálisis de la ornitina decarboxilasa y la espermidina sintasa. Estas poliaminas son fundamentales en estos parásitos, puesto que la principal molécula portadora de grupos tiol del sistema tiol-redox celular no es el glutatión, sino el tripanotión, que consiste en dos moléculas de glutatión acopladas a una de espermidina. El sistema tiol-redox de estos parásitos comprende cuatro tioles de bajo peso molecular: glutatión, glutationilespermidina, tripanotión (N^1, N^8 -bis(glutationil)espermidina) y ovotiol A (N-metil-4-mercaptohistidina). Los niveles de tripanotión se mantienen constantes a lo largo del ciclo biológico del parásito, mientras que los niveles de ovotiol descienden considerablemente en amastigotes de *L. donovani*, si bien esta variación no se produce en *L. major* (Ariyanayagam y Fairlamb, 2001). La glutationilespermidina sintasa cataliza la síntesis de tripanotión, al unir el glutatión a la espermidina. Esta reacción es reversible y, en condiciones de deficiencia de poliaminas, se puede disponer de la espermidina de las moléculas de tripanotión. Éste participa de manera directa o indirecta (vía triparredoxina) en varias reacciones enzimáticas, entre las que se encuentra la de la ribonucleótido reductasa (RNR) (Dormeyer y col., 2001) y el sistema de detoxificación de la glioxilasa (Ariza y col., 2006). A diferencia del tripanotión, el ovotiol se encuentra en otros protistas y en invertebrados marinos.

El grupo hemo se sintetiza en metazoos a partir del succinil-CoA, pero en el género *Leishmania* no están presentes las cuatro primeras enzimas de esta ruta anabólica (δ -aminolevulinato sintasa, porfobilinógeno sintasa, porfobilinógeno deaminasa y uroporfirinógeno decarboxilasa), a pesar de que poseen las tres restantes, que parecen derivar de transferencia lateral a partir de bacterias (Berriman y col., 2005). Parece que el amastigote obtiene la hemoglobina por endocitosis a través de un receptor de hemoglobina de 46 KDa que tiene similitud de secuencia con la hexosa quinasa (Chang y Chang, 1985; Krishnamurthy y col., 2005).

A pesar de la importancia de la percepción y la transmisión de los estímulos en la diferenciación, hasta ahora no se han realizado esfuerzos concretos para dilucidar las vías de señalización intracelular en estos parásitos. En los proyectos genoma de diferentes especies de *Leishmania* aparecen anotados varios genes que codifican para proteína kinasas, incluyendo las activadas por mitógeno (MAPK), proteína fosfatasa, calmodulina y otras proteasas que probablemente intervienen, como algunas cisteína proteasas y algunos receptores que activan nucleótidos cíclicos (cAMP, cGMP), pero no se han concretado las relaciones funcionales existentes entre ellas. En algunos casos han sido descritas funciones concretas de algunos de estos genes. Así, el gen de *L. mexicana* LmxMPK4 parece ser esencial para la proliferación de los amastigotes en el interior de macrófagos de ratón (Kuhn y Wiese, 2005) y otros miembros de la familia MAPK parecen ser los responsables de la inducción de la síntesis del flagelo y, por lo tanto, tendrían considerable importancia en los promastigotes (Bengs y col., 2005; Erdmann y col., 2006).

1.3.4. El glicocálix y la organización de las vías endocíticas y de secreción.

Gran parte de las proteínas destinadas a la superficie celular o los lisosomas de los tripanosomátidos se ensamblan en el RE inicialmente, donde también se sintetizan muchos de los fosfolípidos y glicolípidos. En el RE tiene lugar también el ensamblaje de los oligosacáridos anclados a dolicol y la síntesis de los precursores del glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las proteínas son modificadas en el RE y se exportan desde el tRE al aparato de Golgi. El transporte desde el aparato de Golgi al bolsillo flagelar puede ocurrir mediante una población pleiomórfica de vesículas y vacuolas procedentes de las cisternas. Una vez liberado su contenido al blefaroplasto, las proteínas de membrana pueden ser dirigidas al cuerpo celular o al flagelo. Las proteínas lisosomales y las procedentes de la membrana del RE

Introducción

destinadas a su degradación pueden ser transportadas a los lisosomas bien por vía directa interna desde el aparato de Golgi o bien por vía endocítica tras su liberación al blefaroplasto. Ambas vías suponen generalmente la internalización de proteínas de membrana, ya que las vesículas endocíticas se forman por invaginación de la membrana. Por la vía retrógrada o por fusión directa con la membrana del blefaroplasto, puede producirse la exocitosis. Existen evidencias de que la red subpelicular de microtúbulos limitan la accesibilidad del tráfico vesicular a todos los dominios de la membrana plasmática, por lo que imponen la polarización de la célula en la disposición de las rutas secretoras y endocíticas, de manera que, al igual que la pinocitosis, la endocitosis y la exocitosis se producen a través de la membrana del blefaroplasto (revisado por McConville y col., 2002).

En el año 2000 se conocían sólo dos proteínas de tipo receptor de proteínas de anclaje al factor sensible a N-etilmaleimida (NTF), conocidas como proteínas SNARE, en tripanosomátidos (McConville y col., 2002). Sin embargo, en el genoma de *L. infantum* hay anotadas 30 proteínas que poseen dominios SNARE, entre las cuales hay proteínas SNARE, sintaxinas (Sx), una proteína de membrana asociada a vesículas (vamp) y varias proteínas hipotéticas. Los tripanosomátidos también poseen clatrina (para el transporte del aparato de Golgi a la membrana plasmática), proteínas de los complejos adaptadores 1 y 2 (del aparato de Golgi a endosomas primarios), COPI (del aparato de Golgi al RE y transporte intra-Golgi) y COPII (del RE al aparato de Golgi). Además, poseen otras proteínas que revisten vesículas de transporte de vesículas de la red trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática y de transporte retrógrado desde los endosomas a la TGN.

Las moléculas de superficie mayoritarias de los promastigotes de *Leishmania* son el LPG, que se encuentra anclado a la membrana mediante el GPI, las glicoproteínas ancladas a GPI, las moléculas de PPGs y una familia de glucolípidos anclados por GPI denominados glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) (revisado por McConville y col., 2002; Naderer y col., 2004). Todas las etapas de la síntesis del anclaje lipídico (GPI) ocurren en el RE.

El LPG forma un denso glicocálix en toda la superficie de los promastigotes, incluyendo el flagelo. Está compuesto por un eje de fosfoglicano al que se unen cadenas laterales de glicanos que suelen ser específicas de especie y estadio (McConville y Ferguson, 1993; McConville y col., 1995; Mengeling y col., 1997). Concretamente, tiene cuatro regiones conservadas en todas las especies que se han examinado: un anclaje de 1-alkil-2-lisofosfatidilinositol, un núcleo de glicano y un eje de unidades de disacáridos Gal(β 1-4)Man(α 1-)-PO₄ unidas mediante enlaces fosfodiéster que termina en una caperuza de disacáridos neutros (Turco y Descoteaux, 1992; McConville y col., 1995) (Figura 8). Se ha calculado que el número de moléculas de LPG que se expresan en la superficie de las especies patógenas en seres humanos es de aproximadamente 5×10^6 por célula (Pimenta y col., 1991). Es posible que la cubierta de LPG participe en la protección frente a la vía alternativa del sistema del complemento (Puentes y col., 1990) y a hidrolasas extracelulares (Sacks, 2001) y que sea un ligando en el tubo digestivo del vector y en la interacción con los fagocitos del mamífero (Mengeling y col., 1997; Sacks y col., 2000). Los polimorfismos en la estructura del LPG podrían contribuir al tropismo de diferentes especies de *Leishmania* por el vector (Sacks, 2001). El LPG es esencial en la infectividad de los promastigotes de *L. major* (Sacks y col., 2000; Späth y col., 2000), pero no es imprescindible para la infectividad de *L. mexicana* en ratones (Ilg, 2000b). El LPG más simple de los estudiados es el de *L. donovani*, que tiene sólo el eje de disacáridos y no cadenas laterales. Además de los polimorfismos de LPG intra- e interespecíficos, se produce una regulación diferencial con el desarrollo de la estructura del LPG (revisado por Handman, 1999).

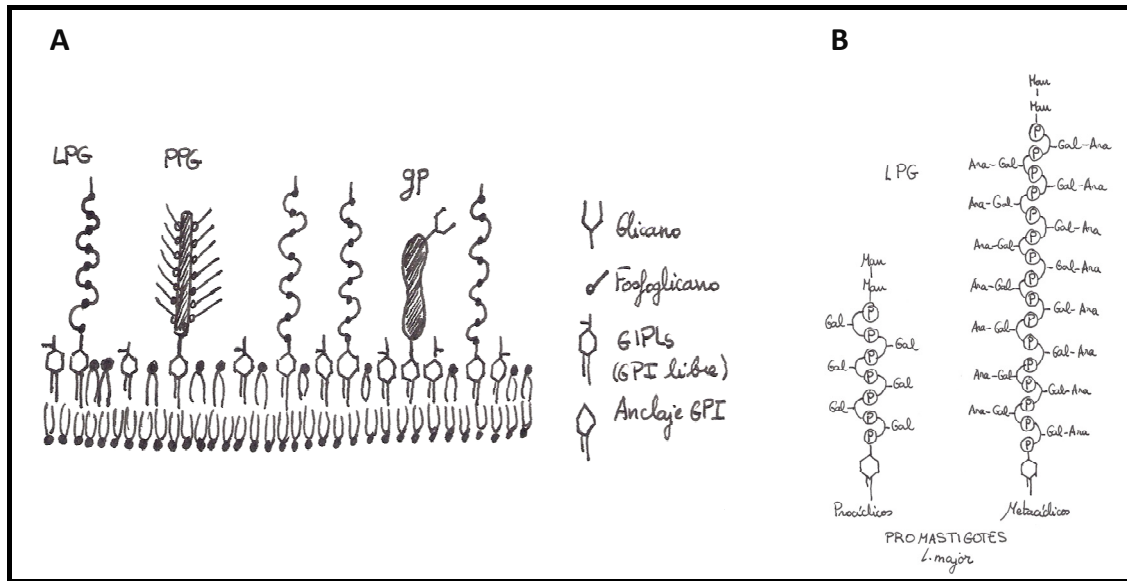


Figura 8. El glicocáliz de *Leishmania*. (A) Principales componentes del glicocáliz. Adaptado de McConville y col., 2002. El LPG y muchas glicoproteínas (gp), como gp63, están ancladas a GPI. En amastigotes, el glicocáliz carece de LPG, PPG. (B) Composición del LPG de *L. major* en promastigotes procíclicos y metacíclicos. Ara, arabinosa; Gal, galactosa; Man, manosa; P, fosfato. Adaptado de Späth y Beverley, 2001.

En la cubierta superficial del parásito están presentes diversas proteínas ancladas a GPI, que también se hallan en menor proporción que el LPG. La función de la mayor parte de ellas es desconocida. La proteasa de superficie del promastigote gp63, también denominada leishmanolisina, parece contribuir en la resistencia a la lisis por el sistema del complemento en *L. donovani* (Joshi y col., 1998). Los glicolípidos GPI libres son las moléculas más abundantes de la cubierta, ya que el número de copias por célula es de aproximadamente 5×10^7 , aunque se desconoce su función precisa. Estas moléculas aparecen tanto en los promastigotes como en los amastigotes. Sin embargo, los amastigotes carecen de un glicocáliz prominente de proteínas y otras moléculas ancladas a GPI, fundamentalmente LPG y PPG. Aunque es posible que no hayan sido localizadas moléculas de superficie específicas de los amastigotes, muy pocas proteínas han podido ser biotiniladas o yodadas, por lo que se sospecha que existe menos cantidad y variedad de estas moléculas en la superficie en este estadio. Sin embargo, sí aparece gran cantidad de GPI libres y los GIPLs. Se ha sugerido que estas moléculas protegen a las proteínas de la membrana plasmática frente a las enzimas líticas de la vacuola parasitófora (revisado por McConville y col., 2002).

1.3.5. El cultivo *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* spp. y la metacicloogénesis.

Los cultivos axénicos de *Leishmania* en medio líquido se desarrollaron en la década de 1960 y 1970 tratando de reproducir *in vitro* las condiciones que permiten el crecimiento de los promastigotes en el interior del tubo digestivo del insecto vector (Neal y Miles, 1963; Lemma y Schiller, 1964; Steiger y Steiger, 1976; Berens y Marr, 1978). Además, se han desarrollado medios sólidos en agar con el mismo principio para el cultivo de promastigotes, como el NNN. Los medios de cultivo que se utilizan son indefinidos, ya que contienen sangre o suero inactivados. El suero es una fuente de gran cantidad de macromoléculas, proteínas, sustancias lipoides, elementos traza y nutrientes de bajo peso molecular.

Introducción

Además, la temperatura media en el tubo digestivo del vector se encuentra en torno a los 26 °C, por lo que en cultivos axénicos se mantienen a temperaturas cercanas (revisado por Zuckerman y Lainson, 1977; Zilberstein, 2008). Los promastigotes en cultivo se mantienen en fase logarítmica durante unos días (aproximadamente una semana), después de la cual se alcanza la fase estacionaria y, finalmente, la fase de muerte. No obstante, algunos promastigotes pueden sobrevivir durante varias semanas.

Se ha comprobado que los cultivos axénicos de promastigotes son estables y reproducibles, presentando características morfológicas similares a los derivados del vector y capacidad infectiva, por lo que se utilizan de forma generalizada para el estudio de la biología de *Leishmania* en distintos niveles. Se usan de manera tan rutinaria que no se suele tener en cuenta que son axénicos, de manera que si se realizan numerosos pases, se atenúa la capacidad infectiva y la virulencia, y presentan propiedades con diferencias cada vez más acusadas con los obtenidos de su medio natural. Para que los parásitos mantengan sus propiedades originales, se han de infectar animales de experimentación y establecer de nuevo el cultivo (revisado por Zilberstein, 2008).

Se observó mediante experimentos con ratones que los promastigotes procíclicos de *L. major* en el día 3 de su desarrollo en el interior del tubo digestivo del vector y en cultivo axénico no eran infectivos, mientras que los metacíclicos obtenidos en los días 7 y 8 sí tenían capacidad infectiva (Sacks y Perkins, 1984). Los términos procíclico y metacíclico fueron aplicados posteriormente (Sacks, 1989). El proceso por el cual los promastigotes procíclicos se diferencian a metacíclicos con la adquisición de capacidad infectiva se ha denominado metacicloogénesis (da Silva y Sacks, 1987). En este proceso, se producen cambios ultraestructurales y bioquímicos en el parásito, especialmente en la superficie. Uno de los cambios más importantes es el engrosamiento del glicocálix, debido a las modificaciones estructurales del LPG (revisado por Handman, 1999).

El proceso secuencial de la metacicloogénesis también ocurre en cultivo axénico (Sacks y col., 1985; McConville y col., 1992), pudiendo separarse la subpoblación de promastigotes metacíclicos de *L. major* de la subpoblación de procíclicos en la población de promastigotes en fase estacionaria mediante centrifugación diferencial tras la aglutinación selectiva de los promastigotes procíclicos con una lectina, la aglutinina de cacahuete (*Arachys hypogaea*) (PNA). Dicha aglutinación selectiva se debe a que el LPG presenta en promastigotes procíclicos (PNA⁺) residuos de D-galactosa libres, a diferencia del de los metacíclicos (PNA⁻), en el que estos residuos están bloqueados por D-arabinosa (McConville y col., 1992; McConville y Ferguson, 1993). La proporción de promastigotes PNA⁻ de *L. major* en la población en fase estacionaria de cultivo axénico está comprendida entre el 1 y el 10% (Sacks y col., 1985; Sacks, 1989; McConville y col., 1992; Späth y Beverley, 2001).

1.3.6. La influencia del pH y la temperatura en la diferenciación de los promastigotes a amastigotes.

El medio natural en el que se desarrollan los promastigotes es el tubo digestivo del flebotomo (sección 1.3.1.), que es un entorno hidrolítico en el que la temperatura aproximada es de 26 °C y el pH es neutro o relativamente básico (alrededor de 7,2). Los promastigotes se van diferenciando a formas metacíclicas, no proliferantes, a medida que van migrando hacia el tubo digestivo anterior (Chang y Dwyer, 1976). El interior del fagolisosoma del fagocito del hospedador mamífero es también un ambiente hidrolítico, si bien es ácido (pH 4,5-5,5) y con una temperatura unos 10 °C superior a la del vector (35-37 °C). La temperatura precisa varía de la infección cutánea a la visceral (32 y 37 °C respectivamente) (Antoine y col., 1998).

Las condiciones fagolisosómicas pueden ser mimetizadas *in vitro* para el cultivo axénico de amastigotes. Sin embargo, la equivalencia de los amastigotes axénicos a los intracelulares no está tan clara como en el caso de los promastigotes. De hecho, algunos autores denominan a los amastigotes en cultivo formas de tipo amastigote o *amastigote-like* (AL) (Somanna y col., 2002; Pral y col., 2003), ya que muestran características diferentes a los amastigotes derivados de células hospedadoras, es decir, de su medio natural; por ejemplo, algunos amastigotes axénicos muestran una pequeña fracción de flagelo emergente del blefaroplasto. Se realizaron estudios *in vitro* en los que se concluyó que la acidificación y el aumento de temperatura aplicados simultáneamente al cultivo conduce a los promastigotes a la diferenciación a amastigotes, según diversos estudios en los que se aplicaron las siguientes condiciones: pH 5,5 y 37 °C (Saar y col., 1998; Debrabant y col., 2004) en presencia de CO₂ al 5-7% (Debrabant y col., 2004) y pH 4,5 a 37 °C (Antoine y col., 1998).

Se ha propuesto que la diferenciación de los promastigotes a amastigotes se realiza en cuatro etapas: (1) señal de diferenciación de 0 a 4 horas; (2) cese del movimiento, arresto del ciclo celular en G1 y agregación de la hora 5 a la 9; (3) cambio de morfología entre las 10 y las 24 horas; y (4) culminación del proceso de maduración entre las 25 y las 120 horas. En la primera etapa (1) comienzan a aumentar los niveles de expresión del gen A2 y la célula comienza a desprenderse del LPG. A partir de los días 2 y 3 se producen otros cambios, como la expresión del transportador de prolina específico de los amastigotes y el aumento de la susceptibilidad a los antimoniales pentavalentes (Ephros y col., 1999; Mazareb y col., 1999).

La resistencia del parásito al aumento de la temperatura sugiere que en este fenómeno participan las proteínas de choque térmico hsp. En concreto, se han detectado niveles constitutivamente elevados de hsp70 y hsp83 a lo largo del ciclo biológico, lo que sugiere que estos organismos están preparados en todo momento para responder a dichos cambios bruscos de temperatura (Zilberstein y Shapira, 1994; Wiesigil y Clos, 2001).

Los promastigotes también son capaces de resistir el aumento de temperatura en ausencia de acidificación y viceversa. En especies del Nuevo Mundo (*L. mexicana*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*), se observaron cambios morfológicos y de expresión de algunos genes al elevar la temperatura a la del mamífero (33-37 °C), tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado por Zilberstein y Shapira, 1994).

A pesar de que el pH extracelular varía en aproximadamente dos unidades entre el promastigote y el amastigote, el pH intracelular permanece inalterado. Por lo tanto, estos parásitos han desarrollado mecanismos de adaptación al entorno ácido que han de detectar y corregir dicha variación, como una ATPasa de tipo P que se encarga de bombear protones para tal fin (Zilberstein y Dwyer, 1988; Liveanu y col., 1991). El tiempo de generación no varía cuando el pH desciende de 7 a 6. Sin embargo, a valores más ácidos disminuye, siendo aproximadamente 1,6 veces menor en promastigotes adaptados a crecer a pH 4,5 (Zilberstein y col., 1991; Zilberstein y Gepstein, 1993). Estos promastigotes adaptados a pH 4,5 sufrían transformaciones, y podían revertir a su situación original a las pocas horas al elevar el pH a 7, volviendo a ser el tiempo de generación el que presentaban inicialmente.

Se ha sugerido que el descenso de pH induce la metacicloogénesis en poblaciones de *L. mexicana* que alcanzan la fase estacionaria en cultivo axénico, mientras que en ausencia de este factor, sólo una pequeña proporción de la misma constituye la subpoblación metacíclica (Bates y Tetley, 1993). Posteriormente, se describió que la inducción de la metacicloogénesis es una respuesta conservada al pH ácido entre las diferentes especies de *Leishmania* (Handman y col., 1995; Zakai y col., 1998). El tiempo de generación aumenta y una proteína específica del amastigote se expresa en estas condiciones

(Zilberstein y col., 1991). Además, se ha descrito que la acidificación por sí misma conduce a la diferenciación de los promastigotes procíclicos a metacíclicos en 48 h, diferenciándose estas células a amastigotes sólo cuando aumenta la temperatura (Abou el Naga y el Moneim Sharaf, 2000).

1.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA, EXPRESIÓN GÉNICA Y MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL GÉNERO *Leishmania*.

1.4.1. El genoma de *Leishmania* spp.

Los genomas de las diferentes especies de *Leishmania* y en general de los tripanosomátidos son diploides y el número haploide es $n = 36$ en *L.(L.) major* y *L. (L.) infantum*, $n = 35$ en *L.(V.) braziliensis* y $n = 34$ en *L. mexicana* y *L. amazonensis* (por fusión de los cromosomas 8 y 29 en *L. mexicana* y 20 y 36 en *L. amazonensis*). Es difícil observar los cromosomas de los tripanosomátidos al microscopio óptico, pues no se condensan completamente a lo largo del ciclo biológico y se han podido identificar mediante electroforesis en campo pulsado. En *Leishmania* se han observado polimorfismos en el tamaño de los cromosomas entre diferentes cepas y especies, pero el cariotipo molecular se conserva. En *L. major* se ha descrito que el tamaño de los cromosomas oscila entre 0,3 y 2,5 Mpb (Ivens y col., 2005). En estos parásitos se aprecian varios niveles de aneuploidía, como sucede con tres cromosomas 1 homólogos en la estirpe *Friedlin* de *L. major* (LmjF), cuyo genoma ha sido secuenciado, y moléculas de ADN fragmentadas del genoma en situaciones de estrés nutricional o por la presencia de drogas (revisado por Myler, 2008). Además, los cromosomas 1, 2 y 27 presentan diferencias alélicas de número entre homólogos, concretamente en el número de copias de genes ARNr y ARN-SL. No obstante, las diferencias alélicas entre cromosomas homólogos son muy escasas, suponiendo menos del 0,1% en todo el genoma. El contenido en G + C del genoma de *L. major* completo es del 59.7%, y del 62.5% en las regiones codificantes. En *L. infantum*, las cifras son muy similares, 59.3% y 62.45% respectivamente, y en *L. braziliensis* ligeramente menores, 57,76% y 60,38% respectivamente (Peacock y col., 2007). Los telómeros son relativamente pequeños y constan de diferentes secuencias repetidas. Los genomas de *L. major* y *L. infantum* contienen pocos elementos móviles DIRE de tipo L1Tc que están inactivados. Sin embargo, en *L. braziliensis* existen elementos asociados a telómeros (TATE) y retroelementos asociados al *spliced leader* (SL) (SLAC) activos (Peacock y col., 2007; Smith y col., 2007).

El primer genoma que fue secuenciado completamente del género *Leishmania* es el de *L. major*, con un tamaño haploide de 32,8 Mpb (Ivens y col., 2005). Los genomas de *L. infantum* (32,6 Mpb) y de *L. braziliensis* (32,0 Mpb) están secuenciados prácticamente en su totalidad, aunque algunos ensamblajes no están bien definidos, ya que en algunos casos hay indeterminaciones en el ensamblaje, de modo que se concatenan algunas secuencias con series de 50 caracteres "N". El genoma de *L. mexicana* está siendo secuenciado actualmente y el resto de los genomas del género *Leishmania* no han sido secuenciados. También han sido secuenciados los genomas de *T. brucei* (agente etiológico de la tripanosomiasis africana) y *T. cruzi* (causante de la enfermedad de Chagas). La comparación de estos dos genomas con el de *L. major* sugiere la preservación de una sintenia a gran escala durante 200-500 millones de años (El-Sayed y col., 2005) en los tripanosomátidos. A pesar de que existe un conjunto de unos 6200 genes comunes en estos organismos, se han hallado más de 1000 genes específicos de *Leishmania*, la mayoría de los cuales no se ha caracterizado. La comparación de los cinco genomas de tripanosomátidos

secuenciados confirma este hecho y apunta a que la pérdida de genes y la formación de pseudogenes son los principales factores que han configurado los genomas de *Leishmania* (Peacock y col., 2007).

Para anotar los genes en la secuencia genómica de *L. major*, se utilizó una combinación de algoritmos (revisado por Myler, 2008). Dichas predicciones fueron refinadas con análisis manual y comparaciones con los proyectos genoma de otros tripanosomátidos. Posteriormente, se secuenciaron los genomas de *L. infantum* y *L. braziliensis*, se llevaron a cabo los mismos procedimientos de anotación de genes y se compararon dichos genomas entre sí (Peacock y col., 2007). La información genómica está siendo actualizada permanentemente en el sitio <http://www.genedb.org/Homepage/Linfantum> (The GeneDB team y col., 2002). Aproximadamente el 65% de los genes anotados en el genoma de *Leishmania* spp. no tienen asignada ninguna función.

Se han anotado 8395 genes en la secuencia genómica de *L. major*, de los cuales 97 son pseudogenes, 8195 genes en el genoma de *L. infantum*, con 41 pseudogenes y 8153 genes en *L. braziliensis*, de los que 161 son pseudogenes (Peacock y col., 2007). Considerando conjuntamente los genomas de *L. major* y *L. infantum*, el tamaño medio de los genes que codifican proteínas es de 1901 pb, con una densidad media de 252 genes/Mpb, siendo el tamaño medio de las regiones intergénicas de 2045 pb. La distribución de los genes en los cromosomas indica que aquellos que están relacionados funcionalmente no están agrupados a modo de operones procariotas, con algunas excepciones, como un *locus* de 16 genes en tándem relacionados con la biosíntesis de las pirimidinas (Ivens y col., 2005). Sólo se ha podido asignar función al 35% de los genes, según los datos de caracterización experimental, de similitud de secuencia con otros organismos y de anotación de términos de funciones incluidos en bases de datos con nomenclatura controlada. El resto de los genes codifican para proteínas hipotéticas o desconocidas, de modo que el 5,7% del total presenta similitud de secuencia con otros genes desconocidos de otros organismos que no pertenecen a la familia de los tripanosomátidos y el 50,7% con genes de la familia de los tripanosomátidos, mientras que el 8,3% es exclusivo de *Leishmania* (revisado por (Myler, 2008)). En cuanto a los genes ARN, se han identificado más de 1000 estructurales, incluyendo los genes ARNr, 83 genes ARNt, 6 ARNsn (que participan en el corte y empalme o *splicing* del ARN) 7 ARN-SL y algunos ARNsno (2'-O-metilación y pseudouridilación de ARNr, ARN-SL y ARNsn). La subunidad pequeña del ARNr tiene un coeficiente de sedimentación de Svedberg 18S y la mayor de 24S y sus correspondientes genes están separados por un espaciador de ADNr 5,8S. Mediante separación electroforética en gel de agarosa, desnaturizante o no, se pueden observar tres bandas de similar intensidad y grosor, que por orden decreciente de movilidad electroforética corresponden al ARNr 18S, 24S α y 24S β (Leon y col., 1978; Perez y col., 1999). La existencia de dos subunidades 24S del ARNr se debe a que están codificadas por el mismo gen pero entre ellas hay una región sensible a ARNasas. Al separar el ARN total en gel de agarosa no desnaturizante se pueden observar también en la parte inferior los ARN de bajo peso molecular, fundamentalmente el ARNt (Vedel y Robert-Gero, 1987).

Algunos genes específicos del género *Leishmania* codifican para peptidasas, transportadores y genes relacionados con la biosíntesis de glicoconjugados, siendo desconocida la función de la mayor parte de los mismos. Los análisis filogenéticos sugieren que algunos genes fueron adquiridos por *Leishmania* mediante transferencia horizontal desde bacterias. Tal es el caso del factor de inhibición de la migración de los macrófagos. También hay genes específicos de especie (revisado por Myler, 2008). De los 224 genes específicos de especie de *Leishmania*, sólo 48 tienen función conocida. Por ejemplo, el gen *argonaute* (LbrMII_V2.0360) y *dicer* (LbrMII_V2.0390), y el gen LbrMII_V2.1020, todos ellos con motivos ARNasa III, que probablemente permitan la actividad de interferencia de ARN (ARNi) en *L.*

Introducción

braziliensis, a diferencia de *L. major* y *L. infantum*, que carecen de los mismos o son pseudogenes (Robinson y Beverley, 2003). Se detallan los 7 genes de función conocida de los 26 genes específicos de *L. infantum* en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes de función conocida específicos de *L. infantum*. Revisado por Myler, 2008.

Anotación	Gen
LinJ14_V3.0020	Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)
LinJ22_V3.0220	Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa, putativa
LinJ25_V3.2500	Glutacionilperimidina sintasa, putativa
LinJ24_V3.1510	Proteína de resistencia a múltiples drogas (MRP)
LinJ31_V3.1140	N-acil-L-aminoácido aminohidrolasa
LinJ31_V3.2420	<i>p</i> -nitrofenilfosfatasa, putativa
LinJ36_V3.0640	Proteína de transferencia de fosfatidilinositol-fosfatidilcolina

1.4.2. Epigenética.

Los tripanosomátidos contienen múltiples copias de los genes de histonas en el genoma, tanto las del núcleo o *core* (H2A, H2B, H3 y H4) como las del espaciador o *linker* (H1). Las secuencias de estas histonas son muy divergentes con las del resto de los eucariotas (Hecker y col., 1994; Soto y col., 1994; Soto y col., 1995; Espinoza y col., 1996; Soto y col., 1997). Muchos de estos genes se encuentran distribuidos en tándem en *Trypanosoma* spp., mientras que en *Leishmania* spp. se hallan en dos o más *loci* separados, aunque existen variantes de copia única que se pueden hallar en todos ellos. El grado de condensación de la cromatina es considerablemente menor en tripanosomátidos que en otros eucariotas durante la mitosis (Hecker y Gander, 1985). Las modificaciones post-traduccionales de las histonas desempeñan un papel muy importante en la remodelación de la cromatina. La acetilación promueve la desestabilización del nucleosoma y, por tanto, la unión de factores de transcripción, mientras que la metilación está relacionada tanto con la activación como con la represión de la transcripción (Kouzarides, 2007). Los tripanosomátidos cuyos genomas se han secuenciado contienen dos familias de acetiltransferasas y tres de histona deacetilasas (Ivens y col., 2005).

El 5-(β-D-glucopiranosiloxi)-metiluracilo, denominado base J, es una base modificada que reemplaza a una fracción de los desoxinucleótidos de timina en el ADN de los kinetoplástidos. Ha sido identificada en los géneros *Leishmania* y *Crithidia* y tiene un papel importante en el silenciamiento de los genes. Hay diversas hipótesis propuestas para explicar este fenómeno, como la posibilidad de que la base J reprima la unión al ADN de las polimerasas o los factores de transcripción, o de que favorezca el reclutamiento de proteínas que favorezcan el silenciamiento de los genes (revisado por Belli, 2000).

1.4.3. Transcripción y regulación post-transcripcional de la expresión génica.

La transcripción tiene lugar en grupos o *clusters* direccionales de genes (DGC) en los tripanosomátidos. Todos los genes que codifican para proteínas están organizados en los DGC, que son unidades de transcripción policistrónicas que contienen decenas o centenas de genes con funciones que no están generalmente relacionados entre sí (Johnson y col., 1987; Mottram y col., 1989). La organización de estas unidades en el cromosoma puede ser convergente (cabeza-cabeza), como ocurre en el cromosoma 1 de *L. major*, o divergente (cola-cola), como en el cromosoma 3, estando en este caso ambos DGCs separados por genes ARNt, ARNr y/o ARNsn. La ARN polimerasa II (Pol II) inicia la transcripción bidireccional según el sentido de cada DGC en el cromosoma. Las regiones terminales de cada DGC

suelen contener genes de ARNt, ARNr y ARNsn (Figura 9) (Myler y col., 2001; Martínez-Calvillo y col., 2003).

La transcripción se inicia en el extremo 5' de cada DGC, dando lugar a un ARN policistrónico precursor que es procesado para dar lugar a ARNm monocistrónicos mediante el mecanismo de corte y empalme en *trans* (*trans-splicing*) y la poliadenilación (Figura 9) (Liang y col., 2003). El *trans-splicing* consiste en la adición de una secuencia denominada miniexón o *spliced leader* (SL) al extremo 5' de la unidad monocistrónica mediante una reacción de *trans*-esterificación, al igual que en el *cis*-splicing, aunque implica la formación de un intermedio con forma de Y en lugar de lazo. El sitio aceptor es un dinucleótido AG conservado en posición inmediatamente posterior (*downstream*) de una secuencia de nucleótidos polipirimidínicos del ARNm precursor. El SL tiene un tamaño de 39 nucleótidos y posee una caperuza (*cap*) trimetilada (Liang y col., 2003; Benz y col., 2005). En el extremo 3' se produce la poliadenilación nuevamente mediante *trans-splicing*, dando lugar al transcrito maduro. En general, el sitio de poliadenilación está situado 100-300 nucleótidos antes (*upstream*) del sitio de *trans-splicing* del siguiente gen, lo que en muchos casos determina que los genes adyacentes presenten la misma regulación en el nivel de transcrito, además de que se coordine la regulación de la expresión en repeticiones de genes en tándem. Sin embargo, al menos un cuarto de los genes presenta regulación independiente de los genes adyacentes, en muchos casos por el mayor tamaño de las regiones intergénicas. Además de las señales de *splicing* al principio y al final de los genes, también hay algunas señales en regiones intergénicas, dando lugar a ARN no traducibles (Benz y col., 2005). En tripanosomátidos no hay intrones en los genes y sólo se ha detectado *cis-splicing* en cuatro casos (cuatro excepciones), que en el caso de *L. major* son: ARN helicasa LmjF07.0340; poli(A) polimerasa LmjF29.2600; proteína hipotética conservada LmjF29.2000; y proteína hipotética conservada LmjF32.0850 (revisado por Myler, 2008).

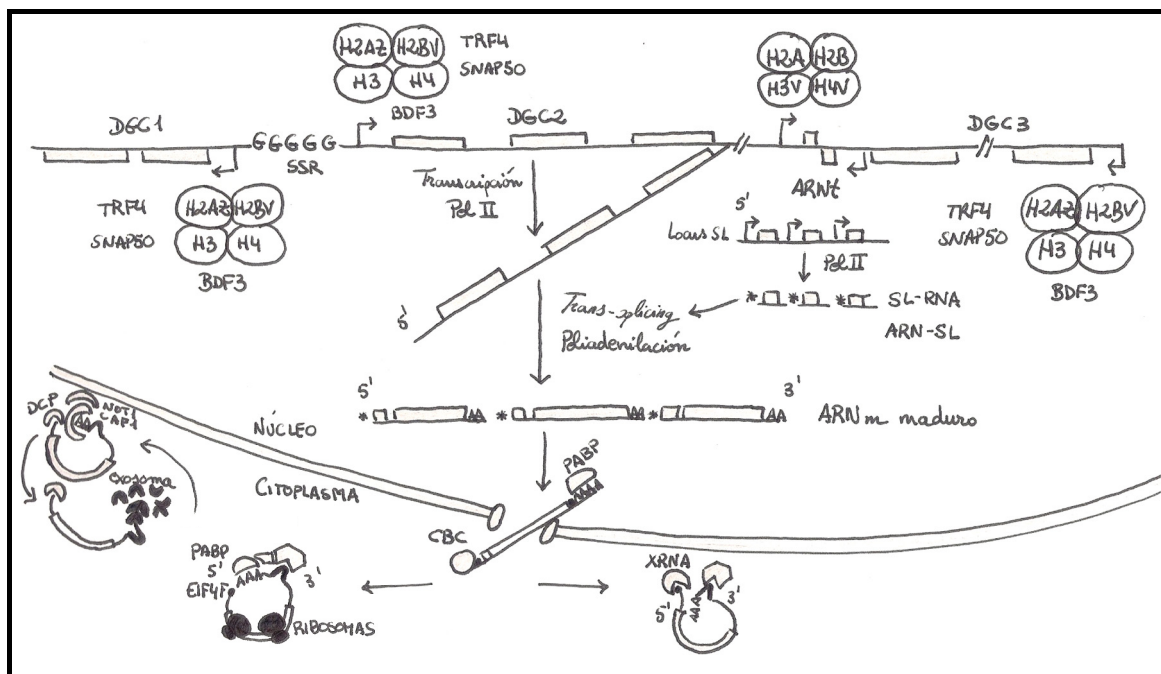


Figura 9. La expresión génica y su regulación en el género *Leishmania*. Adaptado de Clayton y Shapira, 2007; Martínez-Calvillo y col., 2010.

Introducción

En los tripanosomátidos se han hallado todos los dominios comunes a las tres ARN polimerasas, así como muchos de los dominios homólogos entre ellas (por ejemplo, los dominios AC40 y AC19 son comunes a las Pol I y Pol III y sus homólogos en la Pol II son B44 y B12.5 respectivamente). Sin embargo, hay considerables diferencias, ya que algunas de las subunidades específicas de cada polimerasa no han sido halladas en tripanosomátidos, que además presentan considerables divergencias en los genes ABC10 β , ABC23 y ABC27, comunes a las tres ARN polimerasas (Ivens y col., 2005).

Además de participar en la transcripción de genes codificantes para proteínas, la Pol II conduce la síntesis del ARN-SL. Estos organismos tienen menos factores de transcripción basales que otros eucariotas. El factor de transcripción TRF4, asociado al complejo de la Pol II en tripanosomátidos, es un ortólogo muy divergente de TFIIB, TFIIA y TFIIF. El factor de transcripción TFIIB está asociado a la Pol III y no se han hallado los factores TFIIIA y TFIIC. El factor de transcripción TIF-IA asociado a la Pol I no se ha hallado en tripanosomátidos, pero recientemente se ha caracterizado en *T. brucei* el denominado factor de transcripción de clase I (CITFA), que contiene polipéptidos conservados sólo entre los tripanosomátidos (Brandenburg y col., 2007). TRF4 y SNAP50 también se unen a regiones codificantes de todos los genes ARNt y también a las de genes ARNsn, ARNr 5S y otros ARNr; a pesar de ello, no se unen a los promotores (Thomas y col., 2009).

Todos los genes son transcritos basalmente en los tripanosomátidos, pero la abundancia de cada ARNm es distinta según el estadio del ciclo biológico. Por lo tanto, el primer punto importante de regulación está en el nivel post-transcripcional y se realiza a través del control del *trans-splicing*, la poliadenilación y la estabilidad del transcrito, aunque se desconoce por el momento el mecanismo de esta regulación. En estos organismos se han detectado alrededor de 40 proteínas con dedos de zinc (CCCH-Zn) de unión a ARN, lo que sugiere que un punto de control de la expresión génica se encuentra en el nivel post-transcripcional. Los tripanosomátidos poseen dos proteínas de unión a poli(A) (PABP) para la deadenilación y no parecen tener una proteína que degrade la caperuza, pero sí una helicasa que participa en el proceso y varias exonucleasas necesarias para degradar el ARN. Dichas exonucleasas están conservadas y tienen seis dominios homólogos a plextrinas (PH) y tres dominios S1 del núcleo del exosoma (revisado por Ivens y col., 2005; Clayton y Shapira, 2007). La vía de degradación rápida del ARN, en la que no se produce la deadenilación del ARNm, es la de la exonucleasa 5'-3' XRNA, que se produce una vez que el ARN es transportado del nucleoplasma al citoplasma (Figura 9) (Clayton y Shapira, 2007). La otra vía de degradación hallada en tripanosomátidos se describe en la siguiente sección. La regulación post-transcripcional depende fundamentalmente de la eficiencia del *trans-splicing* y de la degradación del ARN. La eficiencia del *trans-splicing* está determinada por la composición de la secuencia polipirimidínica en posición *upstream* al sitio de poliadenilación y de otras secuencias localizadas en la región 5' no traducida (5'-UTR) (Siegel y col., 2005).

1.4.4. Traducción.

En las levaduras, como modelo de la mayor parte de los eucariotas, la caperuza del ARNm se une al complejo de unión a la caperuza (*cap*) antes de ser exportado. Al salir del núcleo, el *cap* se une al factor de iniciación 4E (eIF4E), que es parte del complejo eIF4F junto con eIF4G y la helicasa eIF4A. La subunidad pequeña del ribosoma acopla la región 5'UTR situando en la posición correcta el codón de iniciación AUG en la subunidad ribosómica mayor y comienza entonces la traducción (Gingras y col., 1999). El ARN se circulariza uniéndose las regiones 5'UTR y 3'UTR mediante la interacción del complejo eIF4F y PABP (Preiss y Hentze, 1999). Para reprimir la expresión de proteínas, se pueden unir

represores a la región 5'UTR, aunque éstos compiten con eIF4G para unirse a eIF4E. Otro mecanismo alternativo es la unión de represores a eIF4E que impiden la unión a eIF4G (Richter y Sonenberg, 2005). En tripanosomátidos, el eIF4F presenta modificaciones con respecto al de otros eucariotas por las diferencias que presentan los extremos 5' y la caperuza del ARNm. Los genomas de *Leishmania* y *Trypanosoma* codifican cuatro homólogos eIF4E que se diferencian en sus afinidades por diferentes estructuras del *cap* y en su asociación con complejos de alto peso molecular (Dhalia y col., 2005; Yoffe y col., 2006).

La regulación de la traducción está relacionada con la región 3'-UTR en *Leishmania* spp. y en *T. brucei* al menos en algunos transcritos, según han mostrado diversos estudios en los que se emplearon genes indicadores bajo el control de los elementos 5'- y 3'-UTR (Lee, 1998; Quijada y col., 2000; Zilka y col., 2001). La estructura secundaria de la región 3'-UTR influye en la regulación de algunos transcritos (revisado por Clayton y Shapira, 2007). Estos datos se pueden concretar en un modelo de degradación del ARN (Figura 9). Antes de salir del núcleo, se acopla el complejo de unión al *cap*, la PABP y, posiblemente, algunas moléculas reguladoras específicas. Después de una ronda de traducción, eIF4E permanece unido al *cap* y, a continuación, se une a eIF4G para formar un complejo de iniciación funcional, que puede ser reprimido por proteínas de unión a ARN. En el caso de que tuviera que proseguir la traducción, el ARN sería estabilizado con proteínas adicionales, pero después del tiempo que se requiere para la síntesis de unos niveles determinados de la correspondiente proteína, el ARN es deadenilado por el complejo CAF1/NOT y el *cap* es eliminado por proteínas DCP. Finalmente, el ARN es degradado por el exosoma (revisado por Clayton y Shapira, 2007). Estos mecanismos de regulación traduccional ocasionan que, en algunos casos, no se correspondan las variaciones en los niveles de transcritos de algunos genes con las variaciones de sus correspondientes proteínas (revisado por Martínez-Calvillo y col., 2010).

1.4.5. Modificación de proteínas.

Las modificaciones post-traduccionales detectadas en el género *Leishmania* son: glicosilación, fosfoglicosilación, lipidación, fosforilación, metilación y acetilación. Un reciente análisis proteómico ha determinado los residuos específicos en los que se producen algunas de estas modificaciones (Rosenzweig y col., 2008a). Así, la metilación se puede producir en residuos de arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina e histidina; la acetilación se da en residuos de serina, metionina, alanina y treonina si se encuentran en la región N-terminal; y la fosforilación se produce sólo en residuos de serina y treonina.

1.4.5.1. *Glicosilación.*

La mayor parte de las proteínas que siguen las vías de secreción son modificadas con la adición de glicanos N-unidos en tripanosomátidos. Al igual que en otros eucariotas, estos glicanos son ensamblados sobre una molécula de dolicol en la membrana interna del RE y son transferidos en bloque a la proteína correspondiente, que se halla en el lumen. Las etapas biosintéticas del oligosacárido anclado al dolicol son las mismas que en la mayor parte de los organismos eucariotas (Parodi, 1993). La primera reacción es la transferencia de un residuo de N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-PO₄) procedente de una molécula de UDP-GlcNAc al dolicol-fosfato (Dol-P) y está catalizada por la GlcNAc-1-fosfotransferasa. Esta enzima es esencial para el crecimiento en *Leishmania* (Chen y col., 1999). La siguiente reacción es la adición de un segundo residuo de GlcNAc gracias a la enzima N-

Introducción

acetilglucosaminildoliquilfosfato N-GlcNAc-1-fosfotransferasa (NAGDPT). A continuación, se producen de 6 a 10 adiciones de residuos de manosa (Man). Sin embargo, una diferencia encontrada en la síntesis de los oligosacáridos N-unidos en tripanosomátidos es la ausencia de glucosilación en posiciones terminales, dada la ausencia de moléculas donadoras de dolicol-fosfato-glucosa (Dol-P-Glc). Una vez que se ha producido la transferencia del oligosacárido a la proteína, se producen en el lumen del RE glucosilaciones terminales adicionales mediante la participación de una glucosiltransferasa soluble dependiente de UDP-Glc. Sin embargo, estos residuos terminales de glucosa son posteriormente retirados por la acción concertada de las glucosidasas I y II. El ciclo de glucosilación-deglucosilación fue identificado por primera vez en tripanosomátidos y posteriormente en muchos otros eucariotas. La glucosiltransferasa actúa sobre proteínas no plegadas adecuadamente y, una vez glicosiladas, son replegadas por las lectinas-chaperonas calreticulina y calnexina y pueden en su caso oligomerizar, tras lo que se produce la deglucosilación. No obstante, algunos residuos de glucosa pueden ser retenidos, al menos en los N-glicanos de la glicoproteína gp63 (Olafson y col., 1990) y los del PPG secretado (Ilg y col., 1994) de *L. mexicana*.

El procesamiento subsiguiente en el aparato de Golgi es mucho más variable entre los diferentes tripanosomátidos. En *T. cruzi*, *T. brucei* y el género *Leishmania*, se producen modificaciones mínimas, que en la mayor parte de los casos consisten en la eliminación de alguno de los residuos de manosa. Sin embargo, disponen de enzimas para la biosíntesis de glicanos más complejos. Las galactosil- y arabinosiltransferasas presentes en el aparato de Golgi actúan principalmente en el LPG, aunque se puede producir también arabinosilación en el PPG (revisado por McConville y col., 2002).

En tripanosomátidos se produce O-glicosilación con residuos de β -N-acetilglucosamina (β GlcNAc), en vez de N-acetilgalactosamina (GalNAc), como sucede en hongos y metazoos vertebrados. (revisado por McConville y col., 2002).

La fosfoglicosilación de proteínas es probablemente la modificación más abundante de las proteínas secretadas y destinadas a la membrana plasmática en *Leishmania* spp. en cuanto al número de modificaciones en un mismo tipo de molécula, no en cuanto a la diversidad de moléculas modificadas. Este tipo de modificación es característica de los tripanosomátidos y también se da en otros organismos unicelulares como *Dictyostelium discoideum* (Haynes, 1998) y *Entamoeba histolytica* (Moody-Haupt y col., 2000), pero no ha sido hallada en metazoos. La fosfoglicosilación se produce en regiones ricas en serina y treonina, iniciándose mediante la transferencia de un azúcar-fosfato a uno de estos residuos (Ilg y col., 1994). Los polipéptidos de la familia del PPG están abundantemente fosfoglicosilados. Esta familia incluye la fosfatasa ácida secretada (SAPP), el PPG anclado a la membrana (mPPG) mediante el, fPPG y el no filamentoso del amastigote (aPPG), siendo SAPP, mPPG y fPPG propios del promastigote (pPPG). Tanto el PPG de membrana como los solubles se caracterizan por contener largos ejes polipeptídicos modificados con fosfoglicanos similares a los del LPG (Ilg y col., 1994). Los ejes polipeptídicos del pPPG y el aPPG están codificados por el mismo gen (*ppg2*), según se ha descrito en *L. mexicana* (Gopfert y col., 1999), aunque son realmente glicoisofomas, ya que difieren precisamente en la composición y no en la abundancia de los fosfoglicanos unidos a dicho eje (Klein y col., 1999). El fPPG puede polimerizar en el exterior de la célula en el entorno del bolsillo flagelar, llegando a tener dimensiones del orden de 2 μ m de longitud (Ilg, 2000a). Las funciones específicas de las diferentes glicoisofomas del PPG parecen estar determinadas por las diferentes fosfoglicosilaciones y no por el eje polipeptídico. El fPPG participa en la formación del gel que obstruye el tracto digestivo del vector para la retención de los promastigotes (Rogers y col., 2004) y la sincronización que ha de producirse para su transmisión durante la ingestión de

sangre; de hecho, las moléculas de fPPG podrían facilitar la agregación de los promastigotes y su transmisión en grupos o *clusters* en el momento de la picadura del vector (Stierhof y col., 1999). Además, el PPG secretado depleciona probablemente los niveles de componentes líticos del sistema del complemento, al activarlo de forma no productiva (Peters y col., 1997).

1.4.5.2. Lipidación. Modificación de proteínas y glicoconjugados con GPI.

En el género *Leishmania*, además del LPG y de los GPI libres, muchas proteínas son ancladas a la membrana a través del GPI. La biosíntesis del GPI se inicia con la adición de un residuo de GlcNAc a una molécula de fosfatidilinositol (PI). A continuación, se añaden entre uno y tres residuos de Man para formar la estructura básica del GPI. Dependiendo de la molécula a la que vaya destinada esta modificación lipídica, el procesamiento posterior varía. Si la lipidación es en proteínas, se añade al tercer residuo de Man incorporado una molécula de etanolamina-fosfato (EtN-P) por el que se conjuga con la proteína, mientras que se puede producir una remodelación de uno de los ácidos grasos insaturados (posición *sn*-1 ó *sn*-2) del PI, generalmente con sustitución por miristato. Las moléculas de GPI libre pueden ser remodeladas en uno o en los dos ácidos grasos del fosfatidato e incorporan otro residuo de α Man al primero mediante enlace α 1 \rightarrow 3 con el primer residuo de Man del glicolípido Man₁-GlcNAc₁-PI. Por último, si están destinadas al LPG, se añade un residuo de Man (α 1 \rightarrow 3) al glicolípido Man₁-GlcNAc₁-PI y en el aparato de Golgi se elonga el oligosacárido con un residuo de galactofuranosa y a continuación varios residuos de galactopiranososa que fosfoglicosilan para dar lugar a ramas laterales, mientras que se hidroliza el grupo *sn*-2 acilo, dando lugar al lisofosfatidilinositol (LPI). Además, en la posición *sn*-1 aparece un grupo alquilo en vez de acilo con frecuencia en los GPI de *Leishmania*, independientemente de su destino (Ralton y McConville, 1998; Hilley y col., 2000; McConville y col., 2002).

Otras proteínas carecen de unión a GPI y son aciladas (fundamentalmente, N-miristoilación y N-palmitoilación). Por ejemplo, la proteína hidrofílica de superficie HASPB es N-miristoilada o N-palmitoilada para su anclaje a la monocapa externa de la membrana plasmática (Denny y col., 2000). Además, la prenilación de proteínas intracelulares para su anclaje a sistemas de endomembranas es también frecuente en estos organismos. Así, una metiltransferasa que participa a su vez en la modificación post-traduccional de proteínas de señalización intracelular está prenilada, pudiendo actuar también sobre sustratos farnesilados y de manera menos eficaz sobre geranilgeranilados (Hasne y Lawrence, 1999). La acilación y la prenilación pueden participar también en la interacción proteína-proteína. En los proteomas de estos organismos hay muchos sitios de N-miristoilación y prenilación, lo que sugiere que las enzimas que catalizan estos procesos podrían ser buenas dianas farmacológicas (Ivens y col., 2005).

1.5. EL ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA Y DEL PROTEOMA DE *Leishmania* spp.

La estabilidad de los transcritos en tripanosomátidos está controlada por mecanismos análogos a los de organismos eucariotas modelo como las levaduras, a pesar de sus mecanismos de regulación de la expresión génica (sección 1.4.3.) (revisado por Clayton y Shapira, 2007). Por lo tanto, se han caracterizado los perfiles de expresión de diversos genes de forma individual mediante las técnicas de hibridación de Northern blot y Western blot. Las técnicas de análisis de la expresión génica simultánea de

Introducción

un gran número de genes, como la hibridación de *microarrays* de ADN, plantearon el estudio de la expresión diferencial global en *Leishmania* spp. (Beverley y col., 2002).

Los *microarrays* son matrices de material biológico ordenado sobre un soporte caracterizadas por una alta densidad de integración. Estas herramientas permiten la cuantificación de miles de biomoléculas o entidades biológicas simultáneamente. Dependiendo de la naturaleza de las mismas, las matrices se clasifican en *microarrays* de ADN, de ARN (por ejemplo, de ARN de interferencia), de proteínas (por ejemplo, de anticuerpos), de glúcidos, de células y de tejidos. A finales de la década de 1980, se desarrollaron los primeros *microarrays*, que consistían en matrices de ADN inmovilizado (Fodor y col., 1991). Los *microarrays* de ADN pueden ser concretamente de ADN fragmentado al azar o genómicos, de ADNc y de oligonucleótidos. Entre sus aplicaciones destaca el análisis de la expresión génica diferencial a nivel global, que consiste en la hibridación de dos poblaciones distintas de ARN o de ADNc marcados con fluoróforos diferentes con la matriz de ADN inmovilizado para cuantificar sus niveles de expresión de modo relativo entre dos muestras biológicas determinadas. En el caso de los *microarrays* de oligonucleótidos destinados al estudio de la expresión génica, es necesario conocer la secuencia de los genes del organismo con anterioridad a su fabricación, que se realiza mediante síntesis de la colección de oligonucleótidos *in situ*, a diferencia de los *microarrays* genómicos o de ADNc, que se construyen a partir de genotecas o bancos génicos. Dependiendo del grado de representación de la secuencia genómica completa o de los genes que contiene el genoma del organismo en cuestión, los *microarrays* pueden ser totales (completos) o parciales, al igual que las genotecas de las que proceden.

Saxena y colaboradores (2003) utilizaron *microarrays* de ADN parciales contruidos por fragmentación al azar (amplificación por PCR de secuencias GSS de una genoteca parcial de *L. major* cuya construcción fue descrita por (Akopyants y col., 2001)) por primera vez en el género *Leishmania* para analizar la variación del transcriptoma de *L. major* en la diferenciación de los promastigotes. Dicho estudio fue publicado dos años antes de la finalización del proyecto genoma de *L. major* (Ivens y col., 2005), por lo que hubo que anotar los genes con programas informáticos para identificar o predecir los diferencialmente expresados. Además, se describió en promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico frente a la logarítmica la sobre-expresión de genes relacionados con el metabolismo, la expresión génica, la síntesis y la maduración de las proteínas, la transducción de señales y los relacionados con la síntesis de moléculas antigénicas y la sub-expresión de genes relacionados con la organización celular y el transporte. Los datos que se obtuvieron presentaban una alta correlación con los obtenidos por la técnica de Northern blot en la validación. Los mismos *microarrays* genómicos parciales de *L. major* fueron utilizados un año después para analizar el transcriptoma de forma comparativa entre los promastigotes procíclicos, los metacíclicos y los amastigotes (Akopyants y col., 2004), habiendo sido separadas las subpoblaciones procíclica y metacíclica mediante el método de la aglutinación con PNA (sección 1.3.5.) (da Silva y Sacks, 1987). En ninguno de estos dos primeros estudios con *microarrays* fue posible incluir las anotaciones del proyecto genoma de *L. major*, por lo que no se pueden extrapolar algunos datos de expresión diferencial con los de estudios posteriores.

En otro estudio publicado consecutivamente, se describió el análisis transcriptómico parcial comparativo entre promastigotes logarítmicos, estacionarios y amastigotes derivados de lesión de *L. major* mediante ensayos de hibridación con *microarrays* de ADNc que representaban el 22% de los genes aproximadamente (Almeida y col., 2004). Éste es el primer estudio en el que se utilizaron las anotaciones génicas de la secuencia del proyecto genoma, debido a que algunos de sus autores participaron en el mismo.

Como alternativa al uso de *microarrays* para el análisis de la expresión génica diferencial en *Leishmania*, se describió la utilización de *macroarrays* de ADN, que consisten en la inmovilización ordenada de fragmentos de ADN en un soporte con menor densidad de integración. Concretamente, se inmovilizaron los fragmentos en membranas de *nylon* y se realizó la hibridación con sondas marcadas radiactivamente de manera análoga a la hibridación de Southern blot. Aunque esta estrategia permite el análisis de un menor número de genes, se pueden inmovilizar de manera selectiva colecciones de fragmentos de interés y realizar análisis de expresión génica con menores costes y sin que sea necesario disponer de equipos específicos de análisis. Los resultados del estudio de la diferenciación de los promastigotes a amastigotes mediante hibridación con *macroarrays* fueron también validados mediante Northern blot (Quijada y col., 2005).

Una vez completada la secuenciación del genoma de *L. major*, Holzer y colaboradores (2006) describieron en *L. major* y *L. mexicana* un análisis transcriptómico comparativo de promastigotes en fase logarítmica y amastigotes de cultivo axénico e intracelulares mediante *microarrays* de oligonucleótidos que representaban los genes anotados en el genoma de *L. major*. Fue, por lo tanto, la primera estrategia global de análisis del transcriptoma de *Leishmania* spp. basada en *microarrays*. En este análisis se validó la hibridación interespecífica mediante el contraste con hibridaciones intraespecíficas. Sorprendentemente, tan sólo el 3% aproximadamente de los genes anotados en el genoma de *L. major* mostraban expresión constitutiva a pesar de utilizar por primera vez una estrategia global de análisis de la expresión génica. También se encontraron notables diferencias entre el transcriptoma de los amastigotes axénicos e intracelulares, que se visualiza claramente en diagramas de Venn (Holzer y col., 2006). La expresión constitutiva del genoma de *L. major*, es decir, la regulación diferencial de una reducida proporción de genes fue constatada un año después mediante análisis de hibridación con los mismos *microarrays* (Leifso y col., 2007). Concretamente, sólo un 2,9% de los 8160 genes anotados en el genoma de *L. major* presentaban expresión diferencial entre amastigotes axénicos y promastigotes en fase logarítmica. Los estudios parciales comparativos del proteoma entre promastigotes y amastigotes (El Fakhry y col., 2002; McNicoll y col., 2006) también mostraban bajas frecuencias relativas de proteínas diferencialmente expresadas en comparación con el número total de genes anotados en el genoma de *L. infantum*. Se describió también un análisis proteómico comparativo de los mismos estadios en *L. infantum* mediante la técnica ICAT a mayor escala (*Isotope-coded affinity tag*, etiqueta de afinidad codificada por isótopos) para detectar genes diferencialmente expresados, hallándose también bajas tasas de expresión diferencial (Leifso y col., 2007). A partir de entonces, se realizaron diversos análisis transcriptómicos con *microarrays* parciales (Saxena y col., 2007; Srividya y col., 2007) y totales –representación de todos los genes anotados en el proyecto genoma- (Rochette y col., 2008; Rochette y col., 2009) para la comparación de los amastigotes axénicos y/o intracelulares con los promastigotes. También se realizó un análisis proteómico de la diferenciación de los promastigotes a amastigotes mediante la técnica cromatográfica de marcadores isobáricos para cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ) con un alto grado de representatividad (Rosenzweig y col., 2008b) y un análisis transcriptómico con *microarrays* de muy baja representatividad en *L. braziliensis* (Depledge y col., 2009).

Como consecuencia de todos estos estudios, se ha descrito la regulación diferencial de una considerable cantidad de genes en los procesos de diferenciación de los promastigotes a amastigotes. Sin embargo, los perfiles de expresión génica en la diferenciación del promastigote no han sido apenas explorados a pesar de que se dispone de la información genómica de tres especies de *Leishmania* muy representativas: *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. Concretamente, tan sólo se han hallado 207 genes

Introducción

(con redundancia) en tres estudios de expresión diferencial entre promastigotes logarítmicos y estacionarios (Saxena y col., 2003; Akopyants y col., 2004; Almeida y col., 2004). Además, todos estos estudios se han basado en la comparación transcriptómica entre estadios del ciclo biológico del parásito, por lo que en ningún caso se han podido establecer hasta el momento relaciones causales directas entre un factor concreto que participe en un proceso de diferenciación de *Leishmania* y la expresión diferencial de los genes, excepto algunos genes analizados individualmente.

En esta memoria se describe la construcción de *microarrays* genómicos completos de *L. infantum* para el análisis transcriptómico global de los tres procesos fundamentales de diferenciación del ciclo biológico, así como de factores clave que participan en los mismos. El proceso de diferenciación de los promastigotes en cultivo axénico también ha sido estudiado mediante una aproximación proteómica parcial. También se describe la respuesta del parásito en el nivel post-traducciona l frente a situaciones ambientales anómalas: la presencia de acetato de cadmio y la depleción de nutrientes. Por último, se cuestiona la equivalencia de los promastigotes en cultivo axénico y los obtenidos directamente del tubo digestivo del vector en el nivel transcriptómico y se comparan los promastigotes extraídos de su medio natural con los amastigotes y con los promastigotes metacíclicos PNA⁻ aislados de cultivos axénicos. Todos estos análisis tienen como objetivo fundamental la profundización en el conocimiento de la diferenciación del parásito en el nivel de la expresión génica diferencial global, especialmente en la diferenciación del promastigote. Por primera vez, se describe la influencia de factores concretos en dichos procesos y se cuestiona el modelo de cultivo *in vitro* de los promastigotes.

2

Objetivos

El objetivo fundamental de los estudios descritos en esta memoria es el análisis de la expresión génica diferencial global asociada a los procesos de diferenciación de *Leishmania infantum*, la especie causante de leishmaniasis visceral en la cuenca mediterránea. Este objetivo general consta de seis objetivos concretos que fueron desarrollados en dos etapas: la obtención de los *microarrays* genómicos completos de ADN y los análisis de la expresión génica diferencial con esta herramienta de trabajo.

Primero. Construcción de *microarrays* de ADN con representación completa del genoma de *L. infantum* a partir de una genoteca obtenida por fragmentación al azar.

Segundo. Estudio de los perfiles de expresión génica diferencial de los estadios fundamentales del ciclo biológico de *L. infantum*: promastigotes en fase logarítmica y estacionaria de cultivo axénico y amastigotes intracelulares.

Tercero. Análisis transcriptómico comparativo de las subpoblaciones de promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico no aglutinante y aglutinante con lectina de cacahuete (PNA).

Cuarto. Estudio de la influencia independiente y simultánea de la acidificación y la elevación de la temperatura en la variación del transcriptoma en el proceso de diferenciación de los promastigotes a amastigotes.

Quinto. Análisis de los perfiles de expresión génica diferencial de los promastigotes en cultivo axénico con modificaciones en el medio de cultivo: presencia de acetato de cadmio y depleción de suero bovino fetal.

Sexto. Comparación del transcriptoma de los promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico, de la subpoblación no aglutinante con lectina de cacahuete y de los amastigotes derivados de infección de macrófagos *in vitro* con los promastigotes procedentes del medio natural, en concreto de la porción de tubo digestivo anterior a la válvula estomodeal de *Phlebotomus perniciosus*.

3

Materiales y métodos

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

En primer lugar, se lleva a cabo la construcción de una genoteca completa de *L. infantum* por fragmentación enzimática al azar de ADN genómico y su clonaje en un vector plasmídico. A continuación, se cultiva en placas de 96 pocillos un número suficiente de clones para representar el genoma completo del parásito y se lisan alícuotas de todos ellos de forma simplificada (a 95 °C durante 3 min), conservando el resto del volumen (99,5%) a -80 °C (se añade previamente glicerol al 20% para la criopreservación). A partir de estos lisados bacterianos, se amplifican los insertos por PCR con un único par de oligonucleótidos cebadores que flanquean el sitio de clonaje múltiple (MCS), se purifican y se imprimen de forma ordenada con un sistema robotizado en soportes de vidrio recubiertos con grupos epóxido. Al realizar hibridaciones conjuntas de mezclas de ADNc de dos muestras biológicas que se desea comparar marcadas con fluoróforos diferentes (cianinas Cy3 y Cy5) y adquirir las imágenes y sus correspondientes datos de intensidad de fluorescencia y diferentes estadísticos, se seleccionan las medianas de intensidad de fluorescencia con el fondo o *background* local sustraído y se normalizan considerando las variaciones locales. Se llevan a cabo tres réplicas biológico-técnicas del experimento para realizar el contraste de hipótesis con el test de la t de Student pareado (hibridación conjunta en el mismo soporte) de la hipótesis nula de ausencia de expresión diferencial para cada uno de los fragmentos de la genoteca representados en los *microarrays*. Aquellos clones seleccionados en el análisis de expresión por contener alguna secuencia propia de un gen diferencialmente expresado, son secuenciados e identificados, siempre que sea posible, mediante el alineamiento con la secuencia del proyecto genoma de *L. infantum* (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/L_infantum). En algunos casos, es conveniente realizar meta-análisis, como *clustering* jerárquico para comparar perfiles globales de expresión génica. Los datos obtenidos mediante análisis transcriptómicos pueden entonces ser comparados con los proporcionados por técnicas de proteómica (Figura 10). El estudio de la diferenciación de *L. infantum* descrito en esta memoria está basado en análisis transcriptómicos con *microarrays* de ADN propios.

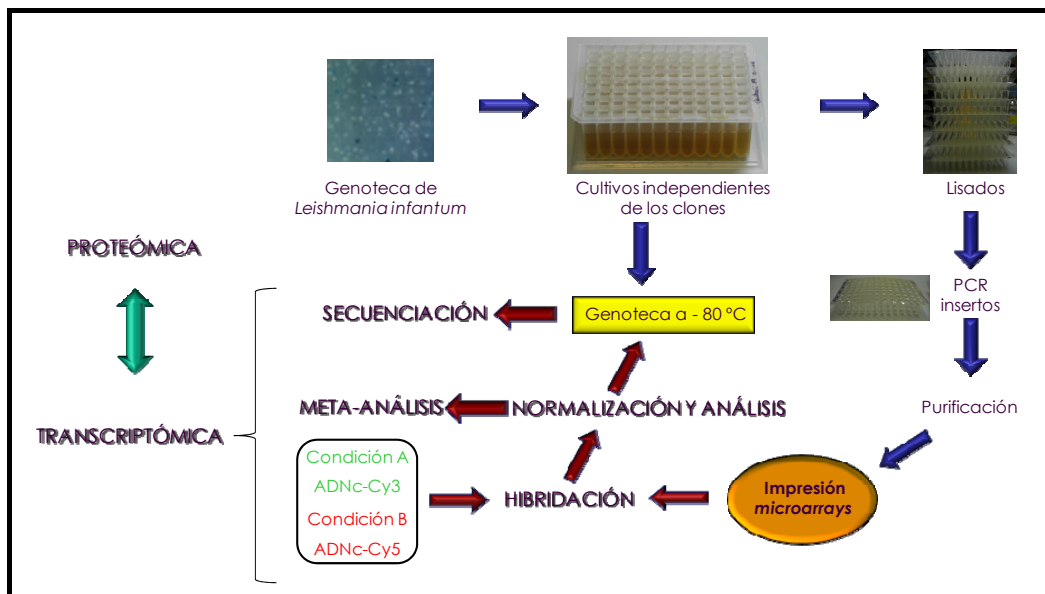


Figura 10. Estrategia para la construcción de *microarrays* genómicos y los análisis de expresión génica global de *L. infantum*.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

3.2.1. Parásitos.

En todos los experimentos que comprende este estudio se utilizó el aislado de *L. infantum* M/CAN/ES/98/10445 (zimodema MON-1). Para los experimentos de expresión génica, se purificó el ARN total a partir de cultivos correspondientes a pases comprendidos entre el quinto y el vigésimo quinto después de la extracción del tubo digestivo del flebotomo y el subsiguiente establecimiento del cultivo axénico. Para la amplificación de diversos genes control, se aisló ADN genómico del anterior aislado y también de *L. donovani* Khartoum 1246 (MHOM/SD/43/124), *L. major* NIH 173 (MHOM/IR/-/173) y *L. amazonensis* María (MHOM/Br/79/Maria). Este material fue cedido por el Dr. Alfredo Toraño y la Dra. Mercedes Domínguez (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda).

3.2.2. Bacterias.

Para construir la genoteca de *L. infantum* M/CAN/ES/98/10445 se emplearon células electrocompetentes de *Escherichia coli* de la estirpe DH10B *-Electro MAX™ DH10B™ Cells* (Invitrogen)-, con genotipo F⁻ mcrA Δ(mrr-hsd RMS-mcr-BC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galkλ⁻ rpsL nipG.

La estirpe DH5α de *E. coli* con genotipo F⁻ φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA⁻argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻, fue empleada para la amplificación y la conservación del vector plasmídico pUC18. Además, los clones recombinantes de *E. coli* DH5α de una genoteca de un aislado ambiental de la bacteria acidófila oxidadora de hierro *Leptospirillum ferrooxidans* fueron cedidos por el Dr. Víctor Parro y la Dra. Mercedes Moreno (Centro de Astrobiología, Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Torrejón de Ardoz) para el aislamiento de los plásmidos recombinantes del regulón *nif* de fijación de nitrógeno, como conjunto de genes de control negativo de los *microarrays* de *L. infantum*.

Para obtener tres de los genes control para los *microarrays* de ADN de *L. infantum* cuyo perfil de expresión génica en las diferentes fases del ciclo biológico se estudió previamente en el laboratorio (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1999; Taladriz y col., 2001; Hanke y col., 2003), se utilizaron los plásmidos recombinantes correspondientes de la estirpe BL21 (DE3), genotipo F⁻ ompT hsdS (rB- mB-) dcm gal (DE3) o de la estirpe M15 [pREP4], genotipo lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺, [pREP4, lacI, kan^R], ambas de *E. coli*.

3.2.3. Insecto vector.

A partir de cultivos de células estimuladas de la línea U937 infectados *in vitro* con promastigotes del aislado M/CAN/ES/98/10445 de *L. infantum*, se realizaron infecciones de hembras de una colonia de *P. perniciosus* por el Dr. Ricardo Molina (Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda) para extraer posteriormente promastigotes y aislar el ARN para utilizarlo en experimentos de hibridación con *microarrays* de *L. infantum*. La colonia de flebotomos del Servicio de Parasitología fue mantenida a 28 °C y 95-100% de humedad relativa con un fotoperiodo 17:7 (luz:oscuridad) (Molina, 1991).

3.2.4. Línea celular humana.

En los ensayos de infección *in vitro* y para la obtención de amastigotes de *L. infantum* se utilizó la línea celular humana U937 (estimulada con 5-forbol-1-miristato-3-acetato o PMA como se detalla en la sección 3.4.6.), derivada de efusiones pleurales de un paciente con linfoma histiocítico, cuyo estado de diferenciación corresponde al de células pluripotenciales mielomonocíticas (Sundstrom y Nilsson, 1976). Esta línea celular fue cedida por el Dr. Alfredo Toraño y la Dra. Mercedes Domínguez (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, ISCIII, Majadahonda).

3.3. COMPUESTOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES.

3.3.1. Compuestos orgánicos e inorgánicos, ácidos nucleicos y proteínas.

Los compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados en este estudio y la composición de las soluciones empleadas se detallan en el Anexo I.

Se aisló ADN genómico de *L. infantum* (sección 3.6.2.) para construir la genoteca completa (sección 3.8.1) y de la línea celular U937 para un ensayo de control de la hibridación cruzada con *L. infantum* (secciones 3.6.4., 3.6.5. y 3.10.1.). Además, se realizaron extracciones de ARN total del parásito en diferentes estadios y bajo diferentes condiciones experimentales (sección 3.6.3.). También se realizaron extracciones de ADN genómico de *L. donovani*, *L. major* y *L. amazonensis* para amplificar algunos genes e incluirlos en los *microarrays* como controles internos.

La genoteca de *L. infantum* M/CAN/ES/98/10445 fue construida con el vector plasmídico pUC18 (Vieira y Messing, 1982), que contiene el gen *bla* –que confiere resistencia a ampicilina- como marcador de selección, y parte del gen *lacZ* –que codifica la β -galactosidasa del operón *lac*, cuya expresión se induce con isopropiltio- β -D-galactopiranosido (IPTG)- como marcador de recombinación, de tal manera que la proteína completa se obtiene por complementación α con la estirpe receptora y, en presencia del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (XGal), se produce un precipitado de color azul en caso de que el plásmido no sea recombinante, puesto que el MCS está incluido en la región 5' del gen *lacZ*. Se usa IPTG como inductor del operon *lac* para mejorar la expresión del gen *lacZ* truncado.

El gen p36 o LACK –análogo de la proteína kinasa C activada- de *L. infantum* fue clonado anteriormente en el laboratorio (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1999) en el vector de expresión pRSET B, utilizando bacterias competentes de la estirpe BL21 (DE3), que contiene el gen *bla* como marcador de selección. Los genes de la topoisomerasa II y ADN polimerasa β de *L. infantum* fueron clonados también en el laboratorio (Taladriz y col., 2001; Hanke y col., 2003) en los vectores de expresión pQE30 y pQE32 respectivamente; en estos casos, el marcador de selección es también el gen *bla*. Los plásmidos recombinantes pRSET B-LACK, pQE30-TopoII y pQE32-Pol β , fueron utilizados para amplificar los insertos e incluirlos como controles positivos en los *microarrays* de *L. infantum*. Los genes del regulón *nif* de fijación de nitrógeno fueron incluidos en los *microarrays* de ADN de *L. infantum* como controles negativos mediante la amplificación de los insertos de los plásmidos recombinantes pENTR1 de una genoteca de *Le. ferrooxidans* (sección 3.2.2.) (Parro y Moreno-Paz, 2003).

Los marcadores de tamaño y masa molecular para electroforesis de ácidos nucleicos, los oligonucleótidos utilizados en reacciones de síntesis y amplificación y el ADN de espermatozoos de arenque

Materiales y métodos

(*Clupea harengus*) han sido detallados en las secciones posteriores (secciones 3.6.4., 3.6.5., 3.6.6, 3.9.1., 3.10.1. y 3.12.) y en el Anexo I.

Se utilizaron extractos totales de proteínas de promastigotes de *L. infantum* en las fases logarítmica y estacionaria de cultivo axénico para su posterior comparación proteómica (sección 3.7.). Se utilizaron enzimas y otras proteínas en diferentes procedimientos experimentales, como se detallará a lo largo de la sección 3 (Anexo I). El anticuerpo monoclonal IgG anti-gp46 purificado, el anticuerpo monoclonal IgG anti-gp63 SIM 6.11.2.1. (no purificado, sobrenadante), el anticuerpo monoclonal IgG anti-factor H de conejo (no purificado, sobrenadante), todos ellos generados en ratón, y los anticuerpos monoclonales SIM110 y SIM113 que reconocen el antígeno soluble de *L. infantum* (SLA) fueron cedidos por el Dr. Alfredo Toraño y la Dra. Mercedes Domínguez (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, ISCIII, Majadahonda). Estos anticuerpos fueron utilizados como primarios en experimentos de inmunofluorescencia directa con detección indirecta (IFI). Como anticuerpo secundario se utilizó en todos los casos anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Serotec, Raleigh, NC).

3.3.2. Purificación de la aglutinina de cacahuete (PNA).

Para la obtención de la lectina de cacahuete (PNA), se sumergieron 100 g de cacahuetes sin tostar en 300 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche. Después se homogenizaron con una batidora y se filtraron a través de una gasa, obteniendo la mayor cantidad de líquido posible. A continuación, se centrifugó el extracto a 8000 rpm durante 10 min en una centrífuga Sorvall RC-5B ó 5C con un rotor GSA. Se recuperó el sobrenadante, se filtró con papel de filtro y se precipitó con sulfato amónico al 40% (proteínas que precipitan en el intervalo de concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 40%). Para la correcta preparación de las disoluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hay que tener en cuenta el aumento de volumen. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se añadió lenta y progresivamente para su completa disolución. Se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 6000 rpm durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó del mismo modo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 75% (la PNA está incluida en la fracción que precipita en el intervalo de concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-75%). Nuevamente, se añadió poco a poco el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se dejó reposar durante 30 min y se centrifugó. Se descartó seguidamente el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 50 ml de PBS. Se dializó frente a PBS toda la noche, realizando al menos tres cambios. Se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min en tubos Corex de 30 ml en el rotor SS34 para la eliminación de grasas y otras impurezas. Se realizó una filtración con papel de filtro y otra con un prefiltro de fibra de borosilicato de 47 mm de diámetro y 2 μm de tamaño del poro (Millipore, Billerica, Estados Unidos) para retener impurezas que pudieran disminuir la durabilidad del lecho de la columna cromatográfica.

Para proceder a la purificación cromatográfica, se pasó primero todo el volumen de muestra a través de una precolumna de *BioGel*[®] A2 (BioRad) con el fin de retener impurezas que pudieran suponer una barrera física para la correcta separación y deteriorar por tanto el lecho de la columna de cromatografía de afinidad de melibiosa inmovilizada en agarosa (descatalogado, Sigma Aldrich, Buchs, Suiza), por la cual se pasó a continuación todo el extracto dos veces lentamente. Se lavó con PBS y, por último, se eluyó con D-galactosa 50 mM (Sigma), recogiendo fracciones de 1 ml. La concentración de proteínas fue estimada por el método de Warburg y Christian (1941): $[\text{Proteínas}] = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$.

3.3.3. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo sólidos y líquidos empleados en el cultivo de bacterias fueron LB, LB-agar, TB, ϕ y SOC estériles (Anexo I). El medio TB se utilizó para el cultivo de los clones recombinantes de la genoteca de *L. infantum* (secciones 3.8 y 3.9.1.), ya que permite obtener un rendimiento muy alto de plásmidos de alto número de copias (Tartoff y Hobbs, 1987), como es el pUC18. Esto favorece la estrategia empleada de aislamiento de plásmidos simplificada (sección 3.6.1.), facilitando el proceso de amplificación por PCR de miles de insertos (sección 3.9.1.).

El medio utilizado para el cultivo de los promastigotes de *L. infantum* y de la línea celular U937, en adelante medio completo, se esterilizó por filtración (0,22 μ m) y estaba compuesto por RPMI 1640 suplementado con L-glutamina a 300 mg/l y tamponado con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 25 mM (Cambrex, BioWhittakerTM, Karlskoga, Suecia), con un 10% de suero bovino fetal (Cambrex, BioWhittakerTM), inactivado a 56 °C durante 60 min (HIFBS) y con la mezcla antibiótica de penicilina 100 UI/ml – estreptomycin 100 μ g/ml (Cambrex, BioWhittakerTM).

3.4. CULTIVOS CELULARES Y TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.

3.4.1. Cultivo de bacterias.

Las células bacterianas de *E. coli* fueron sembradas a 37 °C durante 16-18 horas, bien en suspensión y con agitación en medio líquido LB, TB o ϕ o bien en medio sólido LB-agar (Anexo I), en presencia de ampicilina 100 μ g/ml o kanamicina 50 μ g/ml en los casos en los que estaban transformadas con plásmidos que contenían genes de resistencia a estos antibióticos (*bla^R* y *kan^R*). Se conservaron a -80 °C en medio líquido LB o TB con glicerol al 20%. El medio TB fue utilizado en los cultivos de los clones recombinantes de la genoteca de *L. infantum*, los cuales fueron realizados en un volumen de 1 ml cada uno en placas de 96 pocillos de 2 ml con sus correspondientes tapas estériles, 96 *Deepwell Plates* y 96 *Deepwell Mats* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.4.2. Transformación de bacterias competentes.

La preparación de bacterias competentes de *E. coli* para transformación por choque térmico se realizó según un procedimiento descrito previamente (Hanahan y Meselson, 1983). Se dejó crecer un cultivo de *E. coli* a 37 °C en 10 ml de medio ϕ (Anexo I) durante 16 horas, se diluyó a 1/40 y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0,5 UDO_{550nm}. Se enfrió el cultivo a 0 °C durante 15 minutos y se centrifugó a 1.800g durante 10 minutos a 4 °C. Se resuspendió suavemente en 120 ml de solución Tfb I (Anexo I), se dejó enfriar en hielo durante 15 minutos, se volvió a centrifugar, se resuspendió en 16 ml de solución Tfb II (Anexo I) y, por último, se congelaron rápidamente en nieve carbónica en alícuotas de 100 μ l y se conservaron a -80 °C.

Para la transformación por choque térmico, se mezcló en primer lugar una alícuota de 100 μ l de bacterias competentes para choque térmico con 10 μ l (100-200 ng) de ADN recombinante a 4 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 30 minutos. A continuación, se incubó la mezcla a 37 °C durante 45-60 s y se llevó rápidamente a hielo, donde permaneció durante 2-3 min. Se añadió 1ml de medio LB, SOC o ϕ y se incubó a 37 °C durante 1 h para la expresión del gen de resistencia a ampicilina. Por último, se sembraron 25-100 μ l en placas LB-agar con el antibiótico a la concentración adecuada (ampicilina 100

Materiales y métodos

µg/ml), X-Gal 70 µg/ml e IPTG 80 µM y se incubó a 16 °C durante 16 h. La mezcla de transformación sobrante se conservó a -80 °C, habiendo añadido previamente glicerol estéril al 20%.

Para llevar a cabo la transformación por electroporación, se mezcló inicialmente a 4 °C una alícuota de 20 µl de bacterias competentes para electroporación con 2 µl (100 ng) de ADN recombinante y se llevó a una cubeta de electroporación estéril de 1 mm de separación entre los electrodos (Cell Projects, Harrietsham, Reino Unido) enfriada a 4 °C. En un electroporador *MicropulserTM* (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos), se aplicó un pulso de 1,8 KV durante 5,4-5,8 ms, se añadió rápidamente 1 ml de medio SOC y se incubó a 37 °C durante una hora con agitación orbital de 220 rpm. Por último, se sembraron las células en placas de LB-agar con ampicilina 100 µg/ml, X-Gal 70 µg/ml e IPTG 80 µM y se incubaron a 37 °C durante 16 h. Se conservó a -80 °C la mezcla de transformación restante, habiendo añadido previamente glicerol estéril al 20%.

3.4.3. Cultivo de promastigotes de *Leishmania* spp.

Los promastigotes de *Leishmania* spp. se cultivaron en medio completo (sección 3.3.3) en frascos Roux a 27 °C, a una densidad celular inicial de $1-4 \times 10^6$ /ml. En ocasiones, fue necesario modificar el medio de cultivo para el establecimiento de ciertas condiciones experimentales (pH ácido, depleción de HIFBS o presencia de acetato de cadmio 1mM). Los cultivos fueron realizados en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 con una cabina de flujo laminar de tipo II. La sedimentación de las células se realizó mediante centrifugación a 2.000g durante 10 min. Estas condiciones de centrifugación fueron aplicadas también a los lavados, cuyo número dependía del procedimiento experimental, como se detallará en las secciones posteriores. Se realizaron seguimientos de los cultivos representando las curvas logísticas de crecimiento para la obtención de los promastigotes en las fases exponencial y estacionaria. Los recuentos fueron realizados con cámaras de *Neubauer* (Brand, Wertheim, Alemania) cada 24 horas.

El almacenamiento de los promastigotes por congelación en nitrógeno líquido se realizó a una concentración de 10^8 células/ml en una solución de congelación de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% en HIFBS. El descenso de temperatura fue gradual (-1 °C/min) en un recipiente para congelación lenta *Cryo 1 °C Freezing Container* (Nalgene, Nueva York, Estados Unidos).

3.4.4. Aglutinación de promastigotes con PNA y selección negativa.

Se centrifugaron los promastigotes en fase estacionaria a 2.000g durante 10 min, se resuspendieron en medio completo a una densidad celular de 2×10^8 células/ml y se incubaron con 50 µg/ml de PNA (Sigma) a temperatura ambiente durante 30 min. La aglutinación y la sedimentación de los promastigotes fue controlada visualmente. El sedimento fue resuspendido en 2 ml de sobrenadante remanente y se llevó de nuevo al volumen inicial con más medio completo fresco con la misma concentración de PNA y fue centrifugado a 200g durante 10 min. El procedimiento de centrifugación fue repetido para la recuperación de los promastigotes PNA⁺. Finalmente, el último sobrenadante fue centrifugado a 2.000g para recuperar los promastigotes PNA⁻ (Figura 11). La separación fue comprobada mediante tinción con Giemsa modificado en preparaciones de citocentrífuga *Citospin* (sección 3.4.8.).

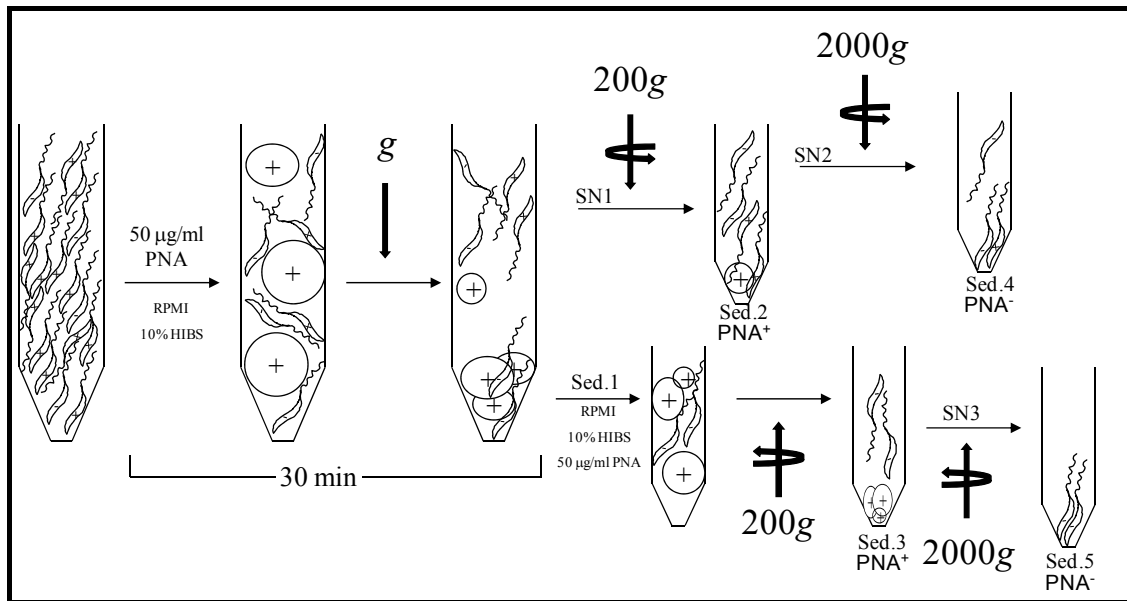


Figura 11. Procedimiento de separación de los promastigotes procíclicos y metacíclicos por el procedimiento de selección negativa con PNA.

3.4.5. Cultivo de la línea celular U937 y estimulación con ésteres de forbol.

La manipulación de la línea celular humana U937 se realizó en una cabina de bioseguridad de tipo II. Las células no diferenciadas fueron cultivadas en frascos Roux a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ en medio completo y se recuperaron a 250g durante 10 minutos. La conservación por congelación se realizó como se ha descrito en la sección 3.4.3., pero con una densidad celular de 2×10^7 células/ml.

Para inducir la diferenciación de la línea celular humana U937, se incubaron con PMA 20 ng/ml (Sigma) las células no diferenciadas durante 72 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ a una densidad celular de 10^6 /ml (Minta y Pambrun, 1985). Las células estimuladas con PMA se cultivaron del mismo modo que las no diferenciadas, aunque son adherentes y para su recuperación es necesario, en primer lugar, lavar el cultivo agitando lentamente con RPMI 1640 (Cambrex, Biowhittaker™) para retirar las células no adheridas mecánicamente y, en segundo lugar, desprenderlas mecánicamente (golpes secos manuales) en presencia de tripsina-verseno (Cambrex, Biowhittaker™) (Anexo I), dada su adherencia, deteniendo la acción de la tripsina mediante la adición de un volumen de medio completo.

3.4.6. Obtención de amastigotes intracelulares de *L. infantum* por infección *in vitro* de células U937 estimuladas.

Para realizar la infección, en primer lugar se centrifugaron por un lado las células estimuladas con PMA a 250g durante 10 minutos y, por otro, los promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria a 1.500g durante 10 minutos. Se ajustó el volumen con medio completo de tal manera que la relación de densidad celular fuera de 20×10^6 promastigotes/ 10^6 macrófagos/ml (20:1) en el caso de la infección *in vitro* preparativa para la obtención de amastigotes y de 5:1 en el caso de los ensayos de infección *in vitro* para comparar la capacidad infectiva. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 2 horas agitando por inversión a intervalos de 5 min y, seguidamente, se centrifugó a 250g durante 10 minutos y se resuspendió en medio completo. Se incubó durante 16 h a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ y, al día siguiente, se volvió a centrifugar del mismo modo para retirar los promastigotes libres y se incubó durante 48 horas en las mismas condiciones.

Materiales y métodos

Para recuperar los amastigotes, se desprendieron las células, se centrifugaron a 250g durante 10 min y se resuspendieron en un volumen adecuado para realizar el recuento. Seguidamente, se retiraron las alícuotas necesarias para las preparaciones microscópicas y el resto de las células fueron centrifugadas de nuevo y resuspendidas en 100 μ l de solución de lisis (0,1% SDS en RPMI 1640) por cada 10^6 macrófagos, agitando vigorosamente durante 1 minuto y dejando reposar durante 30 segundos adicionales a temperatura ambiente. La lisis se detuvo rápidamente mediante la adición de 1 ml de medio completo. Se sedimentaron los amastigotes a 15.000g durante 2 min y se lavaron una vez con PBS. Por último, se realizó el recuento de los amastigotes (sección 3.4.3.) y se estimó la eficiencia de la infección.

3.4.7. Técnicas de microscopía óptica e inmunofluorescencia.

Para la observación de las células teñidas con Giemsa por microscopía óptica de campo claro, se sedimentaron 2×10^5 macrófagos infectados con *L. infantum* o bien 10^6 promastigotes sobre un área circular de 0,2 cm² de un portaobjetos con una centrífuga *Citospin* (ShandonTM, Pittsburgh, Estados Unidos) a 500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se fijaron las células con la solución *Citospin Collection Fluid* (ShandonTM), y se tiñeron primero con *Diff-Quick[®] Stain Solution I* y a continuación con *Diff-Quick[®] Stain Solution II* (Dade Behring, Marburg, Alemania). Se lavaron en agua destilada, se dejaron secar y se montaron las preparaciones con *PermOUNT[®]* (Fisher Scientific, Fair Lawn, Estados Unidos). Se utilizó un microscopio óptico convencional para realizar los recuentos del número de células U937 infectadas y el número de amastigotes por célula y un microscopio de epifluorescencia y luz transmitida *Axioplan Universal* (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con una cámara monocroma de alta resolución CCD C9100-02 (Hamamatsu, Shizuoka, Japón).

Para llevar a cabo la técnica de IFI se sedimentaron las células del mismo modo y se fijaron y permeabilizaron con acetona:metanol 1:1 a -20 °C durante 10 minutos y se dejaron secar al aire. A continuación, se incubó la preparación fijada y permeabilizada con 5 μ l del anticuerpo primario correspondiente (anti-gp46 purificado, SIM 6.11.2.1, SIM110 y SIM110 o sólo SIM110 (SLA), anti-factor H de conejo) o con PBS durante 30 minutos a 37 °C en una cámara húmeda. Se lavó tres veces con PBS en una jarra Couplin en agitación lenta durante 10 minutos y se incubó con 5 μ l de una solución de anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con FITC) y azul de Evans 0,02% (fluoróforo de contraste) en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos. Se lavó de nuevo tres veces con PBS durante 10 minutos en la jarra Couplin y una vez con agua destilada durante 30 segundos, se dejó secar al aire y se montó la preparación con glicerol 87% (v/v) en PBS. Se utilizó un microscopio FW 4000 (Leica, Wetzlar, Alemania) con cámara digital DFC 480 (Leica) (comprobación de la infección para la obtención de amastigotes intracelulares en el estudio del segundo objetivo, sección 2) y un equipo de microscopía multidimensional *in vivo* AF6000 LX (Leica) con una cámara digital DFC 350 FX (Leica) (análisis de la expresión de gp46 en el estudio del objetivo 2), éste último en el Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

3.5. INFECCIÓN DE *P. perniciosus* CON *L. infantum* Y AISLAMIENTO DE PROMASTIGOTES DEL TUBO DIGESTIVO.

Los promastigotes aislados del tubo digestivo del insecto vector fueron cedidos por el Dr. Ricardo Molina (Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, ISCIII, Majadahonda). A continuación se detalla la metodología por la que fueron preparadas. Se utilizaron como inóculo células U937 infectadas con *L. infantum* obtenidas a partir de infección *in vitro* (sección 3.4.5. y 3.4.6.) y resuspendidas a una densidad celular de 10^6 /ml en sangre de conejo defibrinada e inactivada por calor (56 °C, 1 h). Con este inóculo se alimentó a un grupo de 150-200 flebotomos, siendo aproximadamente un 30-40% machos, sobre una membrana estéril de piel de pollo de 3 días. Las hembras alimentadas (~70%) fueron mantenidas en una cámara climática a 27-28 °C con humedad relativa del 90-100% y fotoperiodo de 17 horas de iluminación y 7 de oscuridad en una solución de fructosa al 30% hasta el séptimo día, en el cual se realizó la disección y se extrajeron y examinaron por microscopía óptica los tubos digestivos de las hembras infectadas. Se obtuvieron los promastigotes de la parte anterior a la válvula estomodeal, disgregando suavemente el tubo digestivo por presión con un cubreobjetos. Se suspendieron los promastigotes en PBS y se procedió a la extracción del ARN. En dicho procedimiento se utilizó glucógeno como portador para mejorar el rendimiento (sección 3.7.3.).

3.6. AISLAMIENTO, AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

3.6.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

Las preparaciones simplificadas de plásmidos para la amplificación por PCR de los insertos de la genoteca de *L. infantum* se llevaron a cabo añadiendo 92 μ l de NaOH 10 mM a 5 μ l de cada cultivo de clones bacterianos recombinantes y calentando a 95 °C durante 3 minutos en placas de 96 pocillos *PCR 96-well plates* (MJ Research Inc., Waltham, Estados Unidos) selladas con tapas adhesivas *Adhesive Seal* (MJ Research) en un termociclador *Peltier Thermal Cycler 200* (MJ Research). A continuación se neutralizaron los lisados añadiendo 3 μ l de HCl 100 mM y se enfriaron a 4 °C durante 10 minutos.

Las preparaciones convencionales de plásmidos a pequeña escala (*miniprep*) – de hasta 10 μ g a partir de 3 ml de cultivo a 1,5 UDO₂₆₀/ml (unidades de densidad óptica/ml) aproximadamente- fueron realizadas con *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se llevó a cabo la lisis alcalina con una solución que contenía dodecil sulfato sódico (SDS), en presencia de ARNasa A, que se neutralizó a continuación con un tampón que contiene acetato potásico e hidrocloreuro de guanidina, sal caotrópica que favorece la unión de las moléculas del plásmido al lecho de fibras de vidrio de las columnas suministradas, previa centrifugación a 13.000g para retirar el SDS de la solución de neutralización y unión. A continuación, se purificó el ADN plasmídico lavando el lecho de la columna con etanol a baja concentración de sales y, por último, se eluyó en el tampón de elución, de baja fuerza iónica (Anexo I).

Una vez realizados los análisis de expresión génica con *microarrays*, se secuenció una gran cantidad de insertos para tratar de identificar secuencias génicas en los mismos, para lo cual fue necesario purificar previamente los plásmidos recombinantes. Se utilizó el kit *Perfectprep® Plasmid 96 Vac, Direct Bind* (Eppendorf) con un robot de manejo de líquidos *Ep Motion 5075 VAC* (Eppendorf). Para ello, se sedimentaron las bacterias a 1.900g durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se añadieron 150 μ l de

Materiales y métodos

solución 1 resuspendiendo las células y a continuación otro volumen de solución 2 (lisis) mezclando por agitación orbital lenta, se añadieron 150 µl de solución 3 (neutralización) y se mezclaron mediante diez movimientos de inversión. Se transfirieron los lisados a una placa de filtros A encima de una placa de filtros DB con un adaptador para un colector al vacío, que se aplicó durante 5 min. Se desechó la placa de filtros A y se situó la placa DB sobre la placa del cultivo, que se usó a continuación como placa colectora de los residuos líquidos. Se añadieron 300 µl de tampón de unión a cada pocillo de la placa DB y se aplicó el vacío durante 2 min; a continuación, se añadieron 400 µl de solución de purificación diluida y se aplicó el vacío durante 5 min. Después, se transfirió la base de la placa DB a un papel de filtro y se retiró la placa colectora de los residuos, situándose seguidamente bajo la placa DB una placa colectora de 350 µl/pocillo. La elución se realizó mediante la adición del tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, la incubación a temperatura ambiente durante 2 min y la aplicación de vacío durante 5 min (Anexo I).

Las preparaciones de ADN plasmídico a mediana escala –hasta 100 µg a partir de un cultivo de 15-25 ml a 1,5 UDO₂₆₀/ml aproximadamente- fueron llevadas a cabo con *JETSTAR 2.0 Plasmid Midiprep Kit* (Genomed GmbH, Löhne, Alemania), según lo indicado por el fabricante. El proceso es similar al de *miniprep*, si bien el lecho de la columna es una resina de intercambio aniónico y no contiene fibra de vidrio y, una vez eluido el plásmido, se concentró mediante precipitación con isopropanol (Anexo I).

3.6.2. Extracción de ADN genómico de *Leishmania* spp. y humano.

La purificación de ADN genómico se basó en el procedimiento descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Se estableció un cultivo de promastigotes hasta que alcanzó la fase estacionaria, y en el caso de las células U937 hasta que alcanzó el cultivo una densidad celular máxima de 10⁶/ml. Se centrifugó el cultivo a 2.000g durante 10 minutos a 4 °C y se lavó tres veces con PBS. A continuación se llevó a cabo la lisis a 55 °C durante 3 h de 2 x 10⁹ promastigotes o de 10⁷ células U937 en 10 ml de una solución Tris-HCl 10 mM pH 9,5, EDTA 0,1M pH 8,0, SDS al 2%, ARNasa A pancreática 20 µg/ml y proteinasa K 0,1 mg/ml.

Para extraer el ADN se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, se mezcló suavemente por inversión formando una emulsión durante 15 min y se centrifugó (2.000g, 15 min) para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa evitando contaminarla con la interfase y se repitió tantas veces como fuera necesario en cada caso hasta lograr la desaparición de la interfase blanca para desechar las proteínas, tras lo cual se repitió una vez más la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1.

A continuación se llevó a cabo la precipitación del ADN a –20 °C durante al menos 1 hora con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20 °C, tras lo cual se centrifugó durante 30 minutos a 8.500 rpm en una centrífuga *Sorvall RC-5B* ó *5C* con un rotor flotante HB-4 (Dupont, Wilmington, Estados Unidos), se realizó un lavado con etanol al 70% y, tras dejar secar el sedimento para evaporar los residuos de etanol, se resuspendió en agua *milliQ*.

3.6.3. Extracción de ARN total de *L. infantum*.

El aislamiento de ARN total de *L. infantum* fue realizado con *TRIzol® Reagent* (Invitrogen, La Jolla, Estados Unidos), una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, como mejora del método de aislamiento de ARN en una sola etapa desarrollado por (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Se lavaron las células una vez con PBS, se resuspendieron entre 1×10^6 y 2×10^8 en 1 ml de *TRIzol*[®] *Reagent* y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C según las indicaciones del fabricante) para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. A continuación se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 s y se mantuvo la emulsión a temperatura ambiente durante 2 minutos. Para separar completamente las fases, se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos a 20 °C. La fase acuosa (superior) contiene el ARN total, la interfase el ADN y la fase orgánica (inferior) las proteínas. Cuando la cantidad inicial de células era muy pequeña (del orden de 10^4 - 10^6) se añadieron 5 µg de glucógeno (1 µl a 5 µg/µl) por cada ml inicial de *TRIzol*[®] (Ambion Ltd., Huntingdon, Reino Unido) como portador en solución libre de ARNasas a la fase acuosa recuperada.

El ARN total fue precipitado mezclando la fase acuosa con 0,5 ml de isopropanol por ml inicial de *TRIzol*[®] *Reagent*, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 20 °C. A continuación, se realizó un lavado con etanol 75% en agua libre de ARNasas (tratada con dietilpirocarbonato, DEPC), se dejó secar y se resuspendió en agua libre de ARNasas.

Por último, y para mejorar el rendimiento de las reacciones enzimáticas posteriores, el ARN total fue purificado con *RNeasy*[®] *Mini Kit* (Qiagen, Valencia, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. En síntesis, se unió el ARN a una membrana de gel de sílice en una columna adecuada para centrifugación a 10.000g en un tampón de alta concentración de sales y etanol en presencia de isotiocianato de guanidina, que inactiva inmediatamente a las ARNasas, manteniendo la integridad del ARN. La elución se llevó a cabo con agua libre de ARNasas.

En caso de no utilizar inmediatamente el ARN total para aplicaciones posteriores, se interrumpió el proceso de extracción de ARN en la etapa de la precipitación y se conservó a -80 °C en isopropanol hasta el momento de su procesamiento para evitar cualquier riesgo de degradación con ARNasas.

3.6.4. Amplificación de ADN genómico y de ARNm.

Se trató con ARNasa A pancreática 0,5 µg/ml la muestra de ADN genómico de la línea celular U937 a 37 °C durante 30 min y se comprobó una alícuota del 5% mediante electroforesis en gel de agarosa. Se fragmentó el ADN mediante sonicación a máxima potencia en seis ciclos de 30 s cada uno y se comprobó de nuevo una alícuota (5%) en gel de agarosa. A continuación, se realizó la amplificación con *illustra Genomiphi V2 DNA Amplification Kit*: se mezcló 1 µl de ADN fragmentado a 10 ng/µl con 9 µl *Sample Buffer*, se desnaturalizó durante 3 min a 95 °C, se enfrió a 4 °C, se añadió a la mezcla 9 µl de *Reaction Buffer* y 1 µl de *Enzyme Mix*, se incubó a 30 °C durante 90 min y se inactivó por último la enzima a 65 °C durante 10 min y se enfrió a 4 °C (Anexo I).

Se amplificó el ARN mensajero a partir de las muestras purificadas de ARN total con *MessageAmp*[™] *II aRNA Amplification Kit* (Ambion), procedimiento basado en lo descrito por (Van Gelder y col., 1990). En primer lugar se desnaturalizó a 70 °C durante 10 min el ARN y el T7-oligo (dT) (oligonucleótido iniciador que contiene el promotor del fago T7 en 5') y se realizó una reacción de transcripción inversa con *Array Script*[™] durante 2 horas a 42 °C para sintetizar la primera hebra del ADNc. A continuación, se sintetizó la segunda hebra del ADNc con una ADN polimerasa durante 2 h a 16 °C en presencia de ARNasa H para la degradación del ARN molde y la iniciación simultánea de la síntesis. El ADNc de doble cadena con el promotor T7 incorporado se purificó en una columna

suministrada con el tampón de unión y por lavado con una solución con etanol. La elución se realizó con agua libre de nucleasas precalentada a 55 °C. En segundo lugar, se procedió a la transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa del fago T7 –a partir del promotor T7 incorporado en los pasos previos- durante 14 horas a 37 °C, de tal modo que se sintetizaron múltiples copias de los ARNc, siendo lineal el proceso de amplificación. Por último, se purificó el ARNa por unión específica a una resina en columna y por lavado con una solución con etanol. La elución se llevó a cabo con agua libre de nucleasas precalentada a 55 °C. En caso necesario, se realizó una segunda ronda de amplificación, que se diferencia de la primera en la utilización de 2 µl *Second Round Primers* (oligonucleótidos al azar) en la síntesis de la primera hebra de ADNc, degradación del ARNa con ARNasa H a 37 °C durante 30 min y desnaturalización de la primera hebra del ADNc y de T7-oligo (dT) a 70 °C durante 10 min con anterioridad a la síntesis de la segunda hebra del ADNc (Anexo I).

3.6.5. Síntesis y marcaje indirecto con cianinas de ADN genómico y ADNc.

El ADN genómico fragmentado y amplificado fue marcado con Cy5 mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*. Para ello, se desnaturalizaron 2 µg de dicho ADN con oligonucleótidos cebadores al azar (Invitrogen) durante 5 min a 95 °C, se enfriaron a 4 °C y se incubaron durante 2 h a 37 °C en tampón NEBuffer 2 1X en presencia de dATP, dGTP y dCTP 120 µM cada uno, dTTP y Cy5-dUTP 60 µM cada uno y 5 U de fragmento Klenow en un volumen total de 50 µl. Finalmente, se purificaron los productos con *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN), basado en la adsorción del ADN en presencia de alta concentración de sales a membranas de sílice de columnas aptas para centrifugación a 15.000g, de tal manera que una serie de lavados permitió eliminar las impurezas; por último, el ADN fue eluido con un tampón a baja concentración de sales.

Para la síntesis de ADNc marcado, se mezclaron en primer lugar 5-10 µg de ARNm con 5 µg de oligonucleótidos al azar (Invitrogen) en un volumen de 18,3 µl. Para desnaturalizar las estructuras secundarias, se calentó dicha mezcla a 70 °C durante 10 minutos, tras los cuales se enfrió a 4 °C rápidamente. Seguidamente, se añadió tampón de retrotranscripción *First-Strand Buffer* 1X, los deoxinucleótidos dATP 570 µM, dCTP 570 µM, dGTP 570 µM, dTTP 230 µM, aminoalil-dUTP 343 mM, ditiotreitól (DTT) 10 mM y transcriptasa inversa *SuperScript III® RT* (Invitrogen) 600 U y se incubó la mezcla de reacción a 46 °C durante 3 horas.

La degradación del ARN se llevó a cabo añadiendo 7 µl de una disolución de NaOH 0,5 M, EDTA 50 mM e incubando a 70 °C durante 30 minutos. A continuación, se neutralizó el pH alcalino mediante la adición de 3 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2, y se purificó el (aminoalil)_n-ADNc mediante *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN); en esta etapa previa al acoplamiento de los fluoróforos, la purificación se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante, si bien se empleó como solución de lavado K₂HPO₄ 4,75 mM, KH₂PO₄ 0,25 mM y etanol 80%, y como tampón de elución, K₂HPO₄ 3,8 mM y KH₂PO₄ 0,2 mM, pues las proporcionadas en el producto están tamponadas con Tris, capaz de bloquear los grupos amino libres de los radicales aminoalil incorporados en el ADNc. Antes de proceder al acoplamiento de los fluoróforos, se secó completamente la muestra en un concentrador de centrifugación a vacío *Universal Vacuum System UVS400A-Speed-Vac SPD11V* (Savant, Holbrook, Estados Unidos).

Una vez sintetizado y purificado el (aminoalil)_n-ADNc, se acopló el fluoróforo Cy3 ó Cy5 monofuncional –según procediera, dependiendo de la muestra- a los grupos amino libres de las cadenas de aminoalil incorporadas en el ADNc. La reacción de acoplamiento se realizó incubando en oscuridad a

temperatura ambiente durante 1 h en presencia de NaHCO₃ 70 mM, tras haber resuspendido el aminoalil-ADNc en 10 µl de NaHCO₃ 100 mM y haber añadido 5 µl de fluoróforo disuelto en DMSO. Por último, se purificó el ADNc marcado con *QIAquick*[®] *PCR Purification Kit* (QIAGEN) utilizando las disoluciones suministradas con el producto.

Para evaluar el rendimiento del marcaje, se calculó la razón de nucleótidos marcados con respecto al total mediante la Ecuación 1, expresándose las concentraciones en ng/µl y pmoles/µl respectivamente y considerando adecuados valores iguales o inferiores a 30.

$$\text{Rendimiento} = (1000[(\text{aminoalil})_n\text{-ADNc}]) / (333[\text{cianina}]) \quad \text{Ecuación 1}$$

La síntesis de ADNc de cadena sencilla no marcado que se requirió para el procedimiento de la sección 3.12., se realizó del mismo modo pero añadiendo en la mezcla de reacción dATP, dGTP, dCTP y dTTP a la misma concentración (570 µM) y finalizando con la purificación con *QIAquick*[®] *PCR Purification Kit* (QIAGEN) utilizando las disoluciones suministradas con el producto una vez realizada la degradación del ARN (Anexo I).

3.6.6. Electroforesis en gel de agarosa y análisis densitométrico de ácidos nucleicos.

Una vez preparadas las muestras en tampón de carga de ADN y ARN (Anexo I), la separación electroforética (en condiciones no desnaturizantes) se realizó en gel de agarosa 0,8-1% en tampón TAE (Anexo I) en células de electroforesis *Mini-SubCell GT*, *Wide Mini-Sub Cell GT* o *Sub-Cell GT* (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido), aplicando una corriente eléctrica de 5 V/cm (75 mA) durante 60-90 minutos con una fuente de alimentación MBP3000E 3000 V Power Supply (IBI Scientific, Peosta, Estados Unidos) ó *PowerPac 300* (Biorad, Hercules, Estados Unidos). A continuación, se procedió a la tinción de los ácidos nucleicos sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio (Pierce) 1 µg/ml durante 20 minutos y se irradió con luz ultravioleta (UV) con un transiluminador (Fotodyne[®], Hartland, Estados Unidos) y se tomó la imagen con una cámara fotográfica (Fotodyne[®]) en películas Polaroid 667 de 3,25 x 4,25 pulgadas (Sigma-Aldrich[®] Buchs, Suiza), o bien se utilizó el módulo de irradiación UV-visible y toma de imágenes *Gel Doc XR System, PC* con el programa informático *Quantity One 4.2.1.* (Bio-Rad) o *Gel Super 2/TC-312RF* (TDI, Madrid, España) con el programa informático *Scion Image 4.0.2.* En cada electroforesis de ADN se cargaron 200 ng de marcador *1Kb DNA Ladder* (Invitrogen) 0,1 µg/µl en tampón de carga de ácidos nucleicos.

Dado el gran número de electroforesis necesarias para comprobar los resultados de amplificación por PCR de los insertos de la genoteca de *L. infantum*, se usaron para este fin geles de 96 pocillos preteñidos con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio *Ready-To-Run™ 1,2% Agarose Gel-96 wells* (GE Healthcare, Elk Grove Village, Estados Unidos) en el 90% de los casos, aplicando una corriente de 90 V durante 5 minutos en una fuente de alimentación *Ready-To-Run™ Separation Unit* (GE Healthcare). El resto de electroforesis necesarias para comprobar las amplificaciones de los insertos se realizó con el sistema *Sub-Cell GT* (BioRad).

El análisis densitométrico de ADN se aplicó en el proceso de construcción de la genoteca de *L. infantum* para cuantificar con precisión las concentraciones de ADN, minimizando de este modo el error en la razón inserto:vector en la reacción de ligación. Para ello, se realizó la electroforesis del ADN en gel de agarosa, utilizando por duplicado como patrón de masa 200 ng de ADN del fago λ digerido con *Hind*

Materiales y métodos

III (New England BioLabs, Ipswich, Estados Unidos), que contiene 6 fragmentos (cuya masa conocida está, obviamente, en relación equimolar), habiendo sido precalentado previamente a 60 °C durante 3 minutos y enfriado acto seguido a 4 °C para lograr la separación de los extremos cohesivos de los fragmentos; se obtuvo la imagen en *Gel Doc XR System* y se analizó con el programa informático *Quantity One 4.2.1.* (Bio-Rad).

3.6.7. Análisis de ARN mediante electroforesis capilar de alta resolución.

Esta técnica se utilizó para la valoración de la calidad del ARN. Todo el material utilizado proviene de Agilent Technologies (Van Nuys, Estados Unidos). Tras descontaminar de ARNasas con *RNase ZAP* los electrodos del analizador, se prepara un *chip RNA 6000 Nano assay* con la ayuda del soporte *Chip Priming Station*, añadiendo una mezcla de *RNA 6000 Nano Gel Matrix* y *RNA 6000 Dye Concentrate*, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se carga cada muestra en un volumen de 1 µl en un *chip RNA Nano LabChip®* junto con el marcador *RNA 6000 Nano marker* y, en otro pocillo independiente, *RNA 6000 Ladder*. Finalmente, se realiza la electroforesis capilar en el analizador *Agilent 2100 Bioanalyzer* siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo I).

3.6.8. Análisis de ácidos nucleicos mediante espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.

La concentración de ADN de doble cadena, de ADN de cadena sencilla y de ARN de cadena sencilla se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm (ultravioleta) y multiplicando por los factores de conversión 50, 33 y 40 ng/µl/UDO_{260 nm} respectivamente con un espectrofotómetro DU® 530 (Beckman Coulter™) o bien con un espectrofotómetro para micro-volúmenes ND-1000 (NanoDrop®, Wilmington, Estados Unidos). Asimismo, se consideraron las razones $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ y $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ como indicadores de la pureza de los ácidos nucleicos. La concentración de las cianinas Cy3 y Cy5 incorporadas en el ADN de cadena sencilla se halló con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop®), midiendo la absorbancia a 532 y 635 nm (máximos de absorción) respectivamente; los valores máximos de emisión de fluorescencia se producen a 570 y 670 nm respectivamente; la concentración viene dada en pmol/µl y se calcula siguiendo la ley de Lambert-Beer,

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ecuación 2}$$

donde l es el paso óptico en cm –en este caso, 0,001–, c la concentración molar y ε el coeficiente de extinción molar –respectivamente, 150.000 y 250.000 l/mol·cm.

3.7. TÉCNICAS DE PROTEÓMICA.

3.7.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos totales de *L. infantum*.

Se resuspendieron los promastigotes a una densidad de 2×10^9 en 150 µl de tampón de lisis tras haber sido lavados tres veces con PBS (sección 3.4.4). El tampón de lisis contenía urea 8,4 M, tiourea 2,4 M, 1-propanosulfonato de 3-colamidopropildimetilamonio (CHAPS) al 5%, DTT 50 mM, Triton X-100 al 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1mM en metanol 0,1 M, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina 5 µg/ml y ADNasa 50 µg/ml. Las muestras fueron agitadas suavemente por inversión a

4 °C durante 30 min, se centrifugaron 10 min a 15.000g y después purificadas con *ReadyPrep 2-D Cleanup Kit* (BioRad) para eliminar sales y otras impurezas que pudieran dificultar el isoelectroenfoque (IEF) o bien dar lugar a la aparición de mayor fondo con la tinción. De este modo, la muestra tendría baja conductividad, siendo adecuada para el IEF, que constituye la primera dimensión, y para la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), que constituye la segunda dimensión. El uso de este kit disminuye la aparición de fondo en forma de rayado (*streaking*), el fondo debido a la tinción y otros artefactos del gel asociados con sustancias contaminantes. Además, su uso no supone la variación del punto isoelectrónico (pI) de las proteínas de la muestra. En primer lugar, se añadieron 300 µl de la solución de precipitación 1 a las muestras (hasta 500 µg en 100 µl), que se incubaron seguidamente durante 15 min a 4 °C. A continuación, se añadieron 300 µl de solución de precipitación 2, se mezcló vigorosamente, se centrifugó a 15.000g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a centrifugar el sedimento durante 30 s para eliminar los restos de sobrenadante, se añadieron 40 µl de tampón de lavado 1 y se centrifugó de nuevo durante 5 min, eliminando posteriormente el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 25 µl de agua de calidad adecuada para proteómica proporcionada en el kit agitando vigorosamente durante 20 s. Se añadió 1 ml de tampón de lavado 2 pre-enfriado a -20 °C y 5 µl de aditivo de lavado, se mezcló vigorosamente y se incubó a -20 °C durante 30 min, aplicando agitación vigorosa durante 30 s cada 10 min durante el periodo de incubación. A continuación, se centrifugó durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se eliminaron los restos del mismo centrifugando durante 30 s (Anexo I). Se secó a temperatura ambiente el sedimento durante no más de 5 min y se resuspendió en 150 µl de tampón de rehidratación para electroforesis 2D (urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, anfólitos portadores *Bio-Lyte*[®] 3/10 0,2%, azul de bromofenol 0,002%) con agitación vigorosa durante 30 s a intervalos de incubación a temperatura ambiente de 1 min.

La cuantificación de las proteínas fue llevada a cabo mediante análisis densitométrico de la SDS-PAGE en sistema de tampón discontinuo (Laemmli, 1970) con el gel concentrante al 5% (acrilamida al 5%-bisacrilamida al 0,14%, Tris-HCl 0,1M pH8,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico al 0,036% y NNN'N'-tetrametiletilendiamina –TEMED– 2,3 mM) y gel separador al 10% (acrilamida al 10%-bisacrilamida al 0,27%, Tris-HCl 376 mM pH8,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico al 0,034% y TEMED 5 mM) se aplicaron las muestras en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,1%). La SDS-PAGE se realizó en tampón de electroforesis (Tris-base 20 mM, glicina 67 mM, SDS al 0,1%) a 12 mA durante 30 min y a continuación a 120 V a 30 mA durante aproximadamente 2 h en una célula *MiniProtein*[®] II (BioRad). El gel fue teñido con *GelCode*[®] Blue Stain Reagent (Pierce, Erembodegen, Bélgica) durante 1 h, después de un lavado anterior y otro posterior en agua *milliQ* de 15 min cada uno. Los volúmenes sobrantes de las muestras fueron conservados a -80 °C hasta la realización de la electroforesis bidimensional. Se cuantificó un extracto de promastigotes por el método de Bradford a partir de una recta de calibrado obtenida por regresión lineal de las medidas de $A_{595\text{ nm}}$ de diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA). Este extracto se utilizó como estándar para la cuantificación por densitometría de los extractos proteicos totales de *L. infantum* con el programa informático *Quantity One 4.2.1*. (BioRad).

3.7.2. Electroforesis bidimensional y cuantificación relativa de proteínas.

Se analizaron en gel bidimensional 100 µg de cada extracto proteico de *L. infantum*, estando resuspendidos en tampón de rehidratación (sección 3.7.1.). La electroforesis bidimensional fue realizada

Materiales y métodos

en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Concretamente, las proteínas fueron separadas en la primera dimensión según su pI usando una célula *Protean*[®] IEF (Bio-Rad Laboratories) y los geles de IEF en forma de tiras de pH comprendido entre 3 y 10 (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante; se añadieron los extractos proteicos resuspendidos en tampón de rehidratación a los geles de IEF, rehidratando activamente a 50 V a 20 ° C durante 16 h. Cada extremo de las tiras se situó bajo un electrodo y después fueron cubiertas con aceite mineral (Biotechnology Grade, Bio-Rad). Se aplicó la corriente eléctrica a 20 ° C durante 24 h de la siguiente manera: potencial creciente hasta 300 V durante 45 min, hasta 3500 V durante 22 h 45 min y hasta 5000 V durante 30 min, a un máximo a 99 µA/gel. A continuación las tiras fueron equilibradas en tampón de equilibrado filtrado (Tris-acetato 0,12 M pH 7,0, SDS 5%, urea 6 M, glicerol 30%) en presencia de DTT 52 mM durante 15 min. Después, se volvió a equilibrar con tampón de equilibrado filtrado en presencia de yodoacetamida 1,35 M durante 15 min. Las proteínas fueron separadas en la segunda dimensión en función de su tamaño en un gel de poliacrilamida al 12% en una célula *Protean*[®] II xi (Bio-Rad Laboratories). Los geles fueron preparados el día anterior y se conservaron a 4 ° C hasta el momento de su uso. Las condiciones empleadas para esta electroforesis fueron 70 mA/gel en presencia de tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%). A continuación, se realizó una tinción con plata compatible para espectrometría de masas: fijación con acetona al 40%/ácido acético al 10% durante 1 h; sensibilización con una solución de etanol al 30%, tiosulfato sódico al 0,2% y acetato sódico al 6,8% durante 30 min; tres lavados de 5 min cada uno con agua *milliQ*; tinción con nitrato de plata al 0,25% durante 20 min; desechado del líquido; dos lavados de 1 min cada uno con agua *milliQ*; revelado con carbonato sódico al 0,25%/formaldehído al 0,04% durante 5 min; desechado del líquido; parada del revelado con EDTA disódico dihidratado al 1,46% durante 10 min; y tres lavados de 5 min cada uno con agua *milliQ*. Para obtener la imagen se usó el densitómetro calibrado *GS-800* (Bio-Rad Laboratories).

Los puntos que se visualizaron en los geles 2-D fueron analizados con el programa *PDQuest 2D análisis 7.4.0* (BioRad). Se ajustó el tamaño y la orientación de la imagen (*cropping, rotating tools*), se agrupó un conjunto de geles de la misma serie experimental (*Machset*), se identificaron automáticamente los *spots* (*Spot Detection Wizard*) y se comprobaron manualmente visualizando el histograma de cada uno, marcando y eliminando los puntos que se corresponden con el fondo o *background*. Utilizando el comando *Landmark* (punto de referencia) se localizaron la mayoría de los *spots*; el resto fueron agregados manualmente. La intensidad del *spot* está definida por la suma de los *pixels* de su imagen digital. La creación del *Matchset* (conjunto de geles del experimento que se superpusieron y permitieron construir una imagen virtual de un gel maestro) y la localización de los puntos permite el cálculo de su masa molecular y de su pI ajustando el intervalo de tamaños definido por el patrón de masa molecular de la electroforesis SDS-PAGE y el rango de pH del isoelectroenfoco. La normalización y el análisis estadístico comparativo de los dos grupos también fue realizado con PDQuest. La expresión aplicada para cada *spot* en la normalización viene dada por la Ecuación 3.

$$\text{Intensidad}_{\text{norm.}} = (\text{Intensidad}/f_{\text{norm.}}) \cdot 10^6 \text{ ppm} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde $f_{\text{norm.}}$ es el factor de normalización, que depende del método concreto utilizado de normalización, en este caso el de la cantidad total en *spots* válidos (*Total Quantity in Valid Spots*). Se aplicó el test de la t

para contrastar las cantidades relativas de proteína entre ambos grupos experimentales de tres réplicas biológico-técnicas cada uno.

3.7.3. Digestión triptica en gel y análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

Los procedimientos descritos en esta sección y en la siguiente fueron realizados en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Campus de Cantoblanco, Madrid). Las bandas de proteínas de interés fueron recortadas manualmente del gel bidimensional teñido con plata, fueron depositadas en placas de 96 pocillos y procesadas automáticamente en una estación de digestión y preparación *Proteiner DP* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (Houthaeve y col., 1995). El protocolo de digestión se detalla a continuación. En primer lugar, los fragmentos de gel fueron lavados primero con bicarbonato amónico 50 mM y después con acetonitrilo. A continuación, se llevó a cabo la reacción de reducción con DTT 10 mM en una solución de bicarbonato amónico 25 mM a 56 °C durante 20 minutos y la alquilación se realizó con iodoacetamida 50 mM en una solución de bicarbonato amónico 50 mM a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, los fragmentos de gel fueron lavados primero con bicarbonato amónico 50 mM y después con acetonitrilo y después se secaron a 40 °C. Las digestiones se realizaron añadiendo a las bandas secas tripsina porcina modificada (Promega, Madison, Estados Unidos) a una concentración final de 16 ng/μl en una solución de acetonitrilo al 25% y bicarbonato amónico 50 mM a 37 °C durante 6 h. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido trifluoroacético 0,5%, con el que se realizó la extracción de los péptidos durante 15 min. Los péptidos tripticos eluidos fueron secados en una centrifuga a vacío y fueron resuspendidos en 4 μl de la solución de acetonitrilo acuoso 30%, isopropanol 15% y ácido trifluoroacético 0,1% para espectrometría de masas MALDI (desorción/ionización por láser asistida por matriz). Se depositó una alícuota de 0,8 μl de cada mezcla de péptidos eluidos en un pocillo de una placa de 386 pocillos *OptiTOF™ Plate* (Applied Biosystems, Framingham, Estados Unidos) y se dejó secar a temperatura ambiente. Se depositó después una alícuota de 0,8 μl de solución matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico 3 g/l en solución para MALDI, Sigma), que fue depositada en el digerido seco y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para el análisis por espectrometría de masas (MS/MS) MALDI-TOF/TOF (*Time of Flight*), las muestras fueron introducidas automáticamente en un espectrómetro de masas *ABI 4800 MALDI-TOF/TOF* (Applied Biosystems, Framingham, Estados Unidos) en modo reflector positivo de iones, siendo la diferencia de potencial de aceleración de iones de 25 kV para los espectros de MS y de 1 kV para los de MS/MS. Los espectros obtenidos fueron almacenados en el programa informático *Abi 4000 Series Explorer Spot Set Manager* (Applied Biosystems, Framingham, Estados Unidos). La huella peptídica de masas y los espectros MS/MS de los fragmentos iónicos fueron procesados con el programa informático *Abi 4000 Series Explorer Software* 3.6. para suavizarlos (*smooth*) y ajustarlos a la línea base. Cada espectro de huella peptídica fue calibrado internamente con las señales de masas de los iones de autoproteólisis de la tripsina, situándose típicamente la precisión de la medida de masas en ± 25 ppm. Las señales de masas conocidas de la tripsina y la queratina fueron eliminadas de la lista de picos, así como los aductos potenciales de sodio y potasio (21 Da y 39 Da). Para introducir los datos combinados de la huella peptídica y MS/MS en el programa informático *MASCOT 2.1*. (Matrix Science, Londres, Reino Unido), se utilizó el programa *Global Protein Server (GPS) Explorer* 4.9. (Applied Biosystems), para efectuar la búsqueda en la base de datos no redundante *NCBIInr*. No se establecieron restricciones taxonómicas en esta búsqueda, se permitió la pérdida de un corte triptico y la tolerancia se fijó en 100

ppm. En todos los casos que se validó la identificación de una proteína, la puntuación de probabilidad superó el umbral establecido por el motor de búsqueda *MASCOT*, siendo la probabilidad basada la puntuación obtenida con el algoritmo *Mowse* (Pappin y col., 1993) menor de 0,05.

3.8. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA GENÓMICA COMPLETA DE *L. infantum*.

La genoteca de *L. infantum* fue construida con la colaboración del Dr. Rafael Giraldo y la Dra. Alicia Sánchez (Centro de Investigaciones Biológicas). La fragmentación del ADN genómico al azar se realizó por el método enzimático (digestión parcial con la endonucleasa *Sau3AI*) y la separación por tamaños de los insertos se realizó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. El vector plasmídico pUC18 fue digerido en la diana del MCS *BamHI* (generando extremos compatibles con los de digestión con *Sau3AI*). Finalmente, se realizó la reacción de ligación del ADN pasajero mixto con el vector digerido y se estimó la frecuencia relativa de clones recombinantes y el tamaño medio de los insertos (Figura 12).

3.8.1. Preparación del ADN pasajero mixto.

El ADN genómico de *L. infantum* se fragmentó parcialmente con la enzima *Sau3AI*. Esta endonucleasa de restricción reconoce la secuencia –GATC, generando fragmentos con extremos cohesivos en 5' compatibles con los obtenidos por digestión con *BamHI*. La reacción de digestión de 200 µg de ADN se llevó a cabo en un volumen total de 400 µl en tampón de digestión *SuRE/Cut buffer A 1X* (Roche) con 0,0625 unidades de *Sau3AI* por µg de ADN. Además, se añadió ARNasa A pancreática 1mg/ml (Sigma) a la mezcla. A continuación se incubó a 37 °C durante 10 min y se detuvo la reacción añadiendo EDTA 1,25 mM y enfriando a –80 °C en nieve carbónica. Se retiró una alícuota de 5 µl (2,5 µg) para comprobar el resultado de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 5 V/cm y el resto de la muestra se llevó a un volumen de 500 µl en tampón STE (Anexo I).

La selección de los fragmentos de tamaño adecuado para la construcción de la genoteca se realizó mediante ultracentrifugación preparativa en gradiente continuo de sacarosa. En primer lugar, se preparó una solución de sacarosa al 10% y otra al 40% en STE y se esterizaron ambas por filtración (0,22 µm). Se depositaron 15 ml de la solución más concentrada en un tubo *Ultraclear* (Beckman) y, sobre esta fase, otros 15 ml de la más diluída sin que ambas se mezclasen. El gradiente continuo se formó mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Seguidamente, se depositó la muestra de ADN sobre el gradiente y se centrifugó durante 22 horas a 25.000 rpm a 20 °C a vacío en una ultracentrífuga XL-90 con rotor SW28 (Beckman) con aceleración mínima y deceleración sin freno para evitar la disrupción del gradiente.

Una vez finalizada la ultracentrifugación de los fragmentos de ADN, se procedió a recoger cuidadosamente fracciones de 300 µl con una bomba peristáltica acoplada a un capilar. Para determinar el intervalo de fracciones de ADN de tamaño comprendido entre 2 y 10 Kb, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % a 5V/cm durante una hora de alícuotas de 5 µl de una de cada cinco fracciones. Una vez determinado tal intervalo, se comprobaron por electroforesis las alícuotas de todas las fracciones comprendidas en el mismo más las dos anteriores y las dos posteriores. Las fracciones de ADN de tamaño adecuado se mezclaron y se diluyó la sacarosa mediante la adición de 2,5 volúmenes de agua *milliQ*.

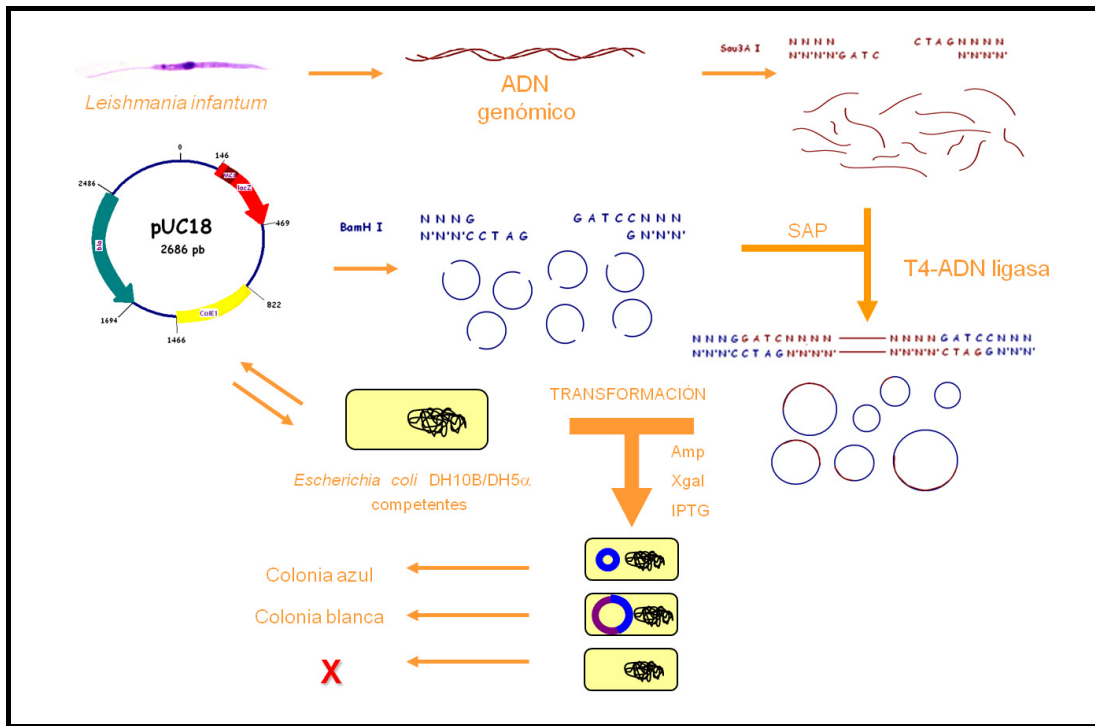


Figura 12. Esquema de la construcción de una genoteca genómica completa de *L. infantum*.

El ADN se recuperó mediante precipitación con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche y se centrifugó en tubos Corex con una ultracentrífuga Sorvall RC-5B y un rotor HB-4 (DuPont) a 8.500 rpm durante 30 minutos a 4°C . Se realizó un lavado con etanol al 70% centrifugando del mismo modo y, finalmente, se dejó resuspender el sedimento en agua *milliQ* a 4°C durante un mínimo de 24 h. De este modo, quedó purificado el ADN pasajero mixto para la reacción de ligación con el vector.

3.8.2. Preparación del vector plasmídico pUC18.

La reacción de digestión total de 5 μg del vector plasmídico pUC18 se realizó en un volumen final de 200 μl con 100 U de la endonucleasa de restricción *Bam* HI en tampón de digestión *SuRE/Cut buffer* B (Roche) y BSA 100 $\mu\text{g/ml}$ durante toda la noche a 37°C . *Bam* HI reconoce la secuencia G–GATCC y genera fragmentos con extremos cohesivos en 5' compatibles con los de *Sau*3 AI.

El resultado de la digestión se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% de una alícuota de 10 μl (250 ng) y, a continuación, se llevó a cabo la hidrólisis del éster ortofosfórico de los extremos 5' con 20 U de fosfatasa alcalina de gamba (SAP)- en tampón de defosforilación (Roche) 1X (Anexo I) durante 30 minutos a 37°C . La enzima se inactivó a 65°C durante 15 minutos. Para purificar el ADN plasmídico, se diluyó la muestra llevándola a un volumen de 300 μl con agua *milliQ*, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y se realizó la extracción del ADN formando una emulsión y centrifugando a continuación a 15.000g durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, recuperando de nuevo la fase acuosa. El ADN fue precipitado a -20°C durante 2 horas con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se centrifugó a 15.000g durante 30 minutos a 4°C , se lavó con etanol al 70% centrifugando del mismo modo durante 15 minutos y se resuspendió en agua *milliQ*.

3.8.3. Ligación del inserto y el vector y obtención de los clones recombinantes.

La reacción de ligación de 4 µg de inserto con 50 ng de vector (razón molecular 50:1, calculada a partir de la Ecuación 4, que determina la relación equimolar entre ambos, asumiendo que el tamaño medio de los insertos es de 4 Kpb) se llevó a cabo en un volumen de 50 µl con 400 unidades *Weiss* de T4-ADN ligasa en tampón de ligación *T4-DNA Ligase Buffer* durante 16 horas a 16 °C.

$$[m_{\text{inserto}}(\text{ng})/\text{tamaño}_{\text{inserto}}(\text{pb})] = [m_{\text{vector}}(\text{ng})/\text{tamaño}_{\text{vector}}(\text{pb})] \quad \text{Ecuación 4}$$

La eficiencia de la reacción se estimó posteriormente calculando el cociente ufc/µg ADN transformante (siendo ufc el número de unidades formadoras de colonias) después de realizar la transformación de las bacterias competentes. Se realizaron varias reacciones de ligación independientes a partir de una única mezcla inicial no mezclando insertos de diferentes preparaciones y sometiendo a las mismas condiciones de incubación simultáneamente todas las alícuotas.

Se diluyeron 200 ng de ADN recombinante a un volumen de 100 µl y se precipitaron a -20 °C durante 1 h con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se sedimentó a 15.000g a 4 °C durante 30 min y se lavó con etanol al 70% centrifugando del mismo modo. Se dejó secar el sedimento y se resuspendió en 4 µl de agua *milliQ*. Se realizó la transformación (sección 3.4.2.) y se procedió al recuento de ufc de transformantes y recombinantes para calcular la eficacia en la obtención de clones recombinantes. Las primeras estimaciones de tamaño de los insertos se realizaron mediante digestión con la endonucleasa *EcoRI* de 200 plásmidos recombinantes.

3.9. CONSTRUCCIÓN DE MICROARRAYS GENÓMICOS DE *L. infantum*.

Los *microarrays* fueron construidos con la colaboración de la Dra. Ana Alonso (Centro de Investigaciones Biológicas), el Dr. Víctor Parro y la Dra. Mercedes Moreno (Centro de Astrobiología, INTA-CSIC).

3.9.1. Amplificación por PCR, purificación y redistribución de los insertos.

Se cultivaron los clones en 1 ml de TB cada uno en placas de 96 pocillos (sección 3.4.1.). A partir de los plásmidos recombinantes aislados de lisados bacterianos por el método simplificado (sección 3.7.1.). Se amplificaron 29.952 insertos de entre 2 y 10 Kb de otros tantos clones recombinantes de la genoteca de *L. infantum* mediante PCR. Para este fin, se utilizó el sistema enzimático *Expand Long Template PCR System* (Roche), que contiene las ADN polimerasas *Taq* (de *Thermus aquaticus*) y *Tgo* (de *Thermococcus gorgonarius*), ambas termorresistentes y la segunda con actividad 3'-5' exonucleasa inherente (Hopfner y col., 1999). Este sistema tiene capacidad para amplificar fragmentos de hasta 20 Kb.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar todos los insertos de la genoteca de *L. infantum* contenidos en los plásmidos recombinantes de los clones seleccionados al azar fueron sintetizados y suministrados por *STABVida* (Oeiras, Portugal) y su secuencia es amino-M13pUC18F23 (5' NH₂-C₆-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3') y amino-M13pUC18R23 (5' NH₂-C₆-AGCGGATAACAATTTACACAGG 3'), ambos modificados con la adición de un grupo amino en el carbono 6 del primer nucleótido del extremo 5' para facilitar posteriormente la adhesión de los productos de PCR al soporte sólido de vidrio recubierto con grupos epóxido. La secuencia de estos cebadores

flanquean al MCS en el vector plasmídico pUC18, de manera que este único par puede ser usado para la amplificación de todos los insertos (Figura 13).

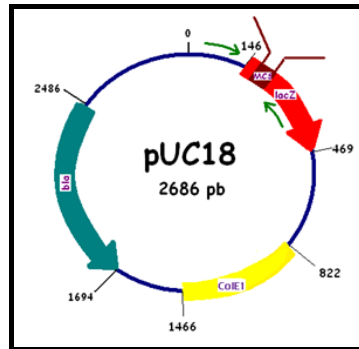


Figura 13. Oligonucleótidos M13pUC18 flanqueando al MCS.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 96 pocillos *PCR 96-well plates* (MJ Research) selladas con tapas adhesivas *Adhesive Seal* (MJ Research) con 1 μ l de lisado bacteriano, amino-M13pUC18F23 0,3 μ M, amino-M13pUC18R23 0,3 μ M, mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 350 μ M (86,5 cada uno) (Roche), betaína 1 M (Sigma), tampón *Expand Long Template Buffer* 1 o 2 y mezcla ADN polimerasa *Taq/Tgo* 1 U (Roche). Estas reacciones se realizaron en termocicladores *Peltier Thermal Cycler 200* (MJ Research), *TETRAD 2* (MJ Research), *iCycler* (BioRad) y *GeneAmp[®] PCR System 9700* (Applied Biosystems), un total de once equipos del Centro de Astrobiología (INTA-CSIC). El perfil de los ciclos térmicos se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil de ciclos térmicos de las reacciones de PCR para la amplificación de los insertos de la genoteca.

	95 °C	54,2 °C	68 °C
1 x	3 min.	-	-
17 x	20 seg.	30 seg.	8 min.
21 x	20 seg.	30 seg.	8 min. + 20 s/ciclo
1 x	-	-	7 min.

El resultado de las amplificaciones fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa de 100 pocillos con un equipo *Sub-Cell GT* (BioRad) al 1% a 5V/cm, o bien en geles de 96 pocillos preteñidos *Ready-To-Run 1,2% Agarose gel, 96 wells* (GE Healthcare) (sección 3.6.6.).

Los productos de amplificación por PCR procedentes de los clones recombinantes de la genoteca de *L. infantum* se conservaron a -20 °C hasta el momento de su purificación, que fue realizada con *ArrayItTM PCR Purification Kit* (TeleChem Intl., Sunnyvale, Estados Unidos) para eliminar sales, enzimas, nucleótidos no incorporados y otras sustancias contaminantes, que de otro modo disminuirían la calidad de las muestras de ADN en futuras reacciones de hibridación y elevarían el fondo fluorescente. En resumen, se depositaron los insertos amplificados diluidos en tampón de unión a las resinas de intercambio aniónico de placas *SuperFilter 800* (96 pocillos), facilitando a continuación el flujo del líquido a través de las mismas mediante vacío. Se aplicó una solución de lavado que contiene etanol y se

Materiales y métodos

secaron por centrifugación a 500g durante 5 min. Por último, se eluyó añadiendo en cada pocillo 100 µl de Tris-HCl 1 mM pH 8,0 y se centrifugó a 500g durante 5 minutos (Anexo I).

Los insertos amplificados y purificados ordenados en placas de 96 pocillos fueron secados completamente en una centrífuga de vacío (Savant) y se conservaron a -20 °C hasta que fueron resuspendidos en *ArrayIt™ Microspotting Solution 1X* (Telechem) a 4 °C en reposo durante 5 días. A continuación, se redistribuyeron en placas de 384 pocillos (Genetix, New Milton, UK) en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Campus de Cantoblanco, Madrid) con un robot de manejo de líquidos *Biomek 2000* (Beckman Coulter, Fullerton, Estados Unidos) con cabezal para ocho puntas mediante el protocolo de manejo de líquidos de filas alternas (ALTROWS), que aparece representado en la Figura 14.

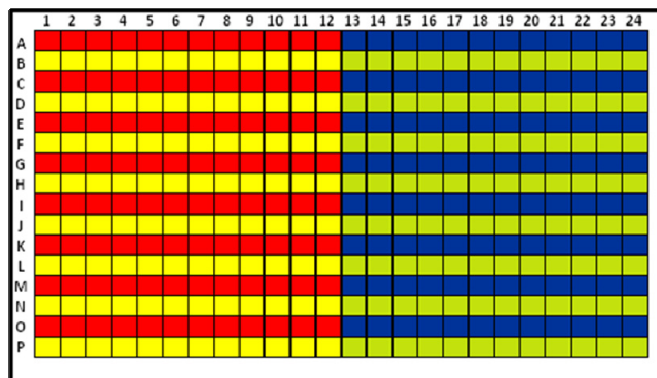


Figura 14. Protocolo de redistribución del contenido de placas de 96 en placas de 384 pocillos. Se utilizó el protocolo ALTROWS, quedando distribuido el contenido de las placas de 96 pocillos en filas alternas: placa 1 (rojo), placa 2 (amarillo), placa 3 (azul), placa 4 (verde).

3.9.2. Preparación de los controles internos para los *microarrays*.

Se preparó una colección de genes de *Leishmania* como controles positivos de los *microarrays* mediante PCR, excepto tres genes previamente clonados en vectores plasmídicos de expresión en el laboratorio (secciones 3.2.4. y 3.3.1.), que fueron preparados por digestión de los plásmidos recombinantes con las endonucleasas de restricción con las que se realizaron los clonajes. Los controles negativos incluidos en el diseño de los *microarrays* son genes de fijación de nitrógeno que se obtuvieron por PCR a partir de clones recombinantes de la genoteca de *Le. ferrooxidans* (secciones 3.2.2. y 3.3.1.). En la Tabla 3 se indican los nombres de todos los genes control, así como los oligonucleótidos iniciadores (todos ellos con modificación 5'-C⁶-amino) para la amplificación por PCR o las endonucleasas de restricción en su caso y el ADN genómico empleado como molde en el caso de los genes amplificados a partir de más de una especie. El protocolo de amplificación por PCR y purificación empleado fue el mismo que el aplicado para los insertos de la genoteca (sección 3.10.1.). Además, se incluyó como control positivo ADN genómico de *L. infantum* y de esperma de arenque, y como control negativo solución tampón citrato sódico salino 1X (1XSSC). Todos estos elementos de control se incluyeron en la última placa de 384 pocillos, la número 79, ocupando 3 columnas x 8 filas = 24 pocillos (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de los controles de los *microarrays* de *L. infantum*. Se indican los nombres de los genes control y los oligonucleótidos cebadores o las enzimas de restricción empleadas para su preparación, según corresponda, así como las especies de las que se obtuvieron. Los controles positivos *LigDNA* (ADN genómico de *L. infantum*) y *HerringS DNA* (ADN de esperma de arenque) se incluyeron en los pocillos c79D3 y H2 respectivamente y el negativo 1XSSC (tampón citrato salino 1X) en el c79H3 de la placa de 384 pocillos número 79.

Gen/pocillo (placa c79, 384)	GenBank	Oligonucleótidos cebadores		Endonucleasas de restricción	Especie
		Nombre	Secuencia 5'→3'		
hsp70/B1, B2, B3, C1.	X85798	hsp70F	C ⁶ -NH ₂ -GGCCGTCCGAAGACAACA	-	<i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i>
		hsp70R	C ⁶ -NH ₂ -ATCGAGTACGCGTAGTTCT		
A2/C2, C3	S69693	A2F	C ⁶ -NH ₂ -CGGGCAAGCCATCTAGAT	-	<i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i>
		A2R	C ⁶ -NH ₂ -GTCGAACCGTCGGCATGAT		
GAPDH/D1, D2	XM_01467109	GAPDHF	C ⁶ -NH ₂ -GGTGGACATGAGCACGAAT	-	<i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i>
		GAPDHR	C ⁶ -NH ₂ -TGTCGATCTCCTGGATAGA		
DNAPolβ/A1	AY004225	-	-	Smal/HindIII	<i>L. infantum</i>
DNATopoII/A2	AF182167	-	-	Smal/HindIII	<i>L. infantum</i>
p36 (LACK)/A3	LIU49695	-	-	EcoRI/HindIII	<i>L. infantum</i>
nifA/hlyD/E1	AY204385	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifD/nifK/E2	AY204398	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifH/E3	AY204398	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifS/nifU/F1	AY204370	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifX/nifB/F2	AY204431	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifH/nifD/F3	AY204398	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifE/G1	AY204397	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifV/HesB/G2	AY204361/A Y204370	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifV/G3	AY204361	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>
nifW/H1	-	ccdF/ccdR	C ⁶ -NH ₂ -ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGG/ C ⁶ -NH ₂ -GAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTGTGG	-	<i>Le. ferrooxidans</i>

3.9.3. Construcción de *microarrays* de ADN con el sistema robotizado *MicroGrid II TAS*.

La fabricación de los *microarrays* se realizó en el laboratorio del Dr. Víctor Parro (Centro de Astrobiología, INTA-CSIC). Se utilizó el sistema robotizado o *arrayer MicroGrid II* controlado por el programa informático *TAS Application Suite 2.4.0.2*. (BioRobotics, Genomic Solutions®, Huntingdon, UK) siguiendo las indicaciones del fabricante para imprimir por contacto (Figura 15A) la colección de insertos purificados de *L. infantum*. El programa TAS guía al usuario en el proceso de preparación del procedimiento de impresión mediante el requerimiento de la confirmación de cada paso. En primer, lugar, se diseñó el protocolo de impresión con el programa TAS (Figura 16, Tabla 4).

Una vez conectado el equipo, se comprobó el nivel de agua *milliQ* del reservorio de 6 l de la unidad de bombeo (MPU) a la estación principal de lavado por el principio de inundación- evacuación o *flood and flush* (*Main Wash Station*, MWS) (Figura 15B), que limpia las puntas de impresión y, acto seguido, las seca mediante vacío entre cada toma de muestra. En caso de haber realizado tres usos, se procedió al vaciado, al lavado (hipoclorito sódico 2% durante 30 min y posteriormente tres lavados con agua *milliQ*) y al llenado con agua *milliQ*. La misma operación de vaciado y llenado se realizó antes de cada uso con los dos reservorios de agua *milliQ* de 2 l cada uno para los baños de lavado con recirculación, también establecida con la MPU. Antes de proceder a la impresión, se ajustaron las condiciones de temperatura y humedad relativa (23 °C, 50-60%) de la sala en la que está ubicado el aparato.

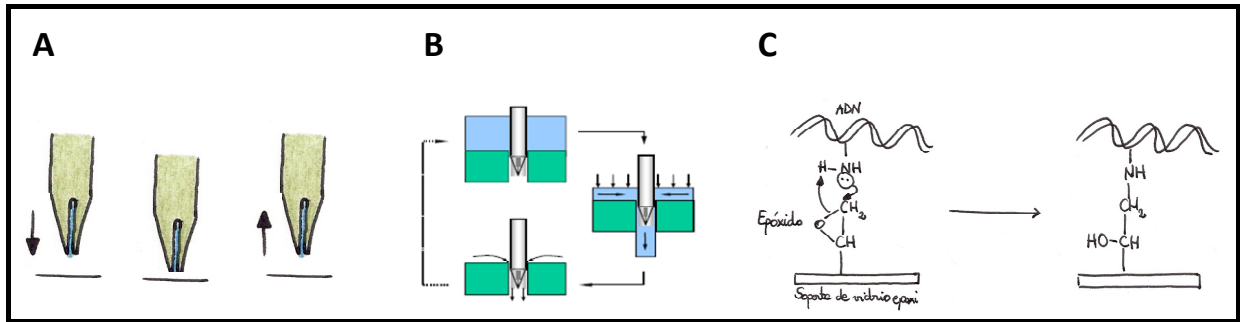


Figura 15. Impresión por contacto con el sistema robotizado MicroGrid II TAS. (A) Impresión por contacto. (B) *Flood and flush*. (C) Unión del ADN al soporte recubierto de radicales epóxido por ataque nucleofílico de los grupos amino de las bases nitrogenadas.

Tabla. 4. Configuración de los parámetros de la impresión de cada lote de *microarrays*. **Pre-spotting*: depósito del exceso de líquido para la impresión correcta de los portaobjetos posteriores que contengan los *microarrays*.

Número de portaobjetos para <i>pre-spotting</i> *	12
Número de portaobjetos para la impresión de <i>microarrays</i>	42
Grosor de los portaobjetos	1 mm
Tiempo de contacto de las puntas de impresión con los portaobjetos	0,250 s
Número de rejillas (<i>grids</i>) por portaobjeto	48
Número de puntos depositados por <i>grid</i>	26 x 25
Separación de los puntos entre sí en cada <i>grid</i>	50 µm
Diámetro de los puntos (determinado por las puntas SMP3, Telechem)	110 µm
Número de <i>subarrays</i>	3
Separación de los <i>subarrays</i> entre sí	0,17mm
Número de bloques (<i>grids</i>) por <i>subarray</i>	16
Profundización en la placa de 384 pocillos	0,036 mm
Tiempo de lavado en baño de agua <i>milliQ</i> en recirculación	4 s
Longitud recorrida en la agitación del cabezal con las puntas en el lavado	1,15 mm
<i>Flush and flood</i> (MWS)	1 lavado/ciclo
Tiempo de secado a vacío de las puntas en la <i>Main Wash Station</i>	6 s

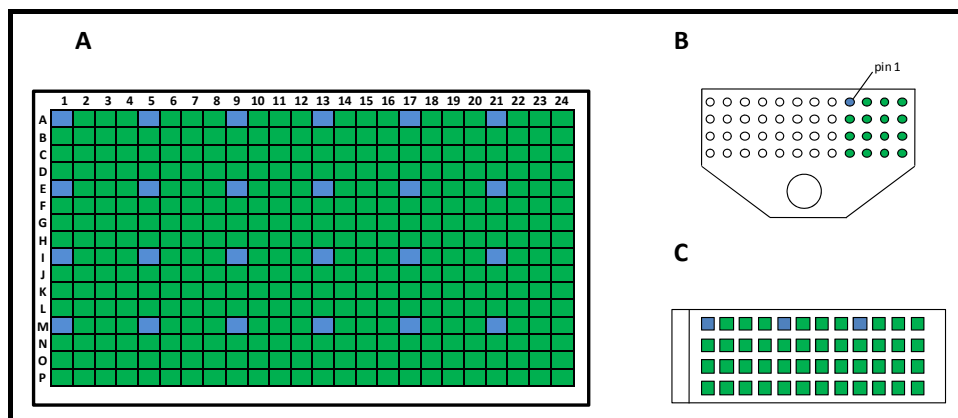


Figura 16. Configuración de la impresión con el sistema robotizado MicroGrid II TAS. (A) Los cuadros azules representan pocillos de la primera placa que contienen insertos que son depositados por una misma punta o *pin*. (B) Posición que ocupa la punta que va a tomar dicha solución de insertos en el cabezal. (C) Cada grupo de tres muestras representadas en azul en (A) que se sitúan correlativamente en cada columna se deposita en diferentes *subarrays*.

A continuación, se preparó el cabezal *BRSPH64 Stealth Printhead* (Telechem) compatible con el sistema de *BioRobotics* y las puntas de impresión *946 Microspotting Pins SMP3* (Telechem), que producen 200 puntos de 110 µm de diámetro en cada carga, recogiendo 0,25 µl y liberando 0,7 nl en cada contacto. El protocolo de limpieza fue: aplicar solución *Printhead Cleaning Solution* en los orificios y la superficie del cabezal, aclarar con abundante agua *milliQ* y secar con aire comprimido filtrado; sonicar las puntas en un baño de sonicación con solución de Tween 20 al 5% durante 10 min, repetir dos veces la sonicación en agua *milliQ*, aclarar muy bien y secar. Situar en el *arrayer* las puntas insertadas en el cabezal y secar las puntas en la estación principal de lavado del robot aplicando varios ciclos de lavado regular con desplazamiento al baño.

Por cada lote de *microarrays* que se pretendía fabricar, se situaron 48 soportes sólidos de vidrio (portaobjetos) libres de nucleasas recubiertos superficialmente con radicales epóxido (VEPO 25C – *Vantage Epoxy Slides Clear – Nuclease-free slides for in situ hybridization and DNA microarrays*, CEL associates Inc., Los Ángeles, Estados Unidos) en dos de las bandejas del *arrayer*, una vez limpiadas con isopropanol y secadas con aire comprimido filtrado. Esta modificación química de la superficie del vidrio recubierta con grupos epóxido permite el acoplamiento covalente de los fragmentos de ADN mediante el ataque electrófilo de un par de electrones del grupo amino de una base nitrogenada a un átomo de carbono del grupo epóxido (Figura 15C). Opcionalmente, se introdujo un grupo amino en 5' en los fragmentos de ADN gracias a la realización de las reacciones de PCR con oligonucleótidos cebadores con esa modificación (sección 3.9.1.). Los fragmentos amplificados de la genoteca de las placas de 96 pocillos Lin1 – 4 no fueron modificados. Se alinearon adecuadamente los soportes y se confirmó este paso, según requiere el programa informático que, acto seguido, controla la inmovilización de los soportes en las bandejas mediante la aplicación de vacío. Seguidamente, se procedió al llenado del *BioBank*, depósito en el que se sitúan ordenadamente 24 placas de 384 pocillos en dos columnas, una para las placas identificadas con números impares y otra para las pares, pudiendo iniciarse entonces la impresión. Una vez finalizada la impresión de las primeras 24 placas, se reemplazaron por las 24 siguientes hasta completar un total de 79 placas. Se requirió un total de 3,5 días para la fabricación de cada lote. Una vez finalizada la impresión y para identificar cada *spot* con el correspondiente pocillo de cada placa de 384 se genera un archivo con la extensión *.gal, que contiene las coordenadas de todos los puntos incluidos en los *microarrays* mediante la aplicación del comando *Clone Tracking Wizard* del programa *TAS Application Suite*.

3.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL CON *MICROARRAYS* DE ADN DE *L. infantum*.

3.10.1. Hibridación.

En primer lugar, se realizaron dos lavados de los *microarrays*: uno a temperatura ambiente en 2XSSC con N-lauroil sarcosina al 0,1% durante 2 min y otro similar pero sin N-lauroil sarcosina. A continuación, se sumergió el portaobjetos en agua a 95 °C durante 2 min y después se introdujo en etanol a -20 °C, dejándolo previamente enfriar durante 10 s para evitar la fractura del vidrio. Por último, se centrifugó durante 10-20 s en una microcentrífuga de portaobjetos *Galaxy™ Miniarray* (VWR, West Chester, Estados Unidos).

Para bloquear los *microarrays*, se prepararon 60 µl de solución de prehibridación (3XSSC, Tris-HCl 60mM pH8,0, ADN de esperma de arenque 83,3 µg/µl desnaturalizado durante 3' a 95 °C y enfriado

Materiales y métodos

rápidamente a 4 °C, N-lauroil sarcosina 0,3% y BSA 1%) por cada portaobjetos, se depositaron en el centro de un cubreobjetos para hibridación con *microarrays* de 60 x 22 mm *HybriSlip™* (Sigma-Aldrich) en una superficie plana, se situó el portaobjetos boca abajo en contacto con el cubreobjetos y se eliminaron las burbujas en caso de que aparecieran. Se depositó una gota de agua en cada reservorio de la cámara de hibridación, se situó encima el portaobjetos evitando contactar con los bordes de la cámara, la cual fue cerrada y sumergida en un baño a 42 °C asegurando la nivelación. Se incubó durante 30-60 min, se retiró el cubreobjetos mediante una breve inmersión en agua *milliQ* y se centrifugaron los portaobjetos.

La solución de hibridación (3XSSC, Tris-HCl 60 mM pH8, N-lauroil sarcosina 0,3%, poli(T) 25 ng/μl y formamida 50%) fue calentada en un bloque térmico a 65 °C, así como los *microarrays*, el cubreobjetos y la cámara de hibridación. Se desnaturalizaron 5 μg de ADN de esperma de arenque y los ADNc marcados con Cy5 y Cy3 (50-100 pmoles incorporados) durante 3' a 95 °C y se enfriaron rápidamente a 4 °C. A continuación, se calentó a 65 °C la mezcla de ADNc y el ADN de esperma de arenque durante 2 min. Se añadió a dicha mezcla la solución de hibridación, siendo el volumen final 60 μl; se calentó de nuevo durante 2 min, se añadió BSA al 0,1% y se depositó rápidamente la mezcla sobre el cubreobjetos, situando el portaobjetos boca abajo. Se situó en la cámara de hibridación precalentada y se incubó a 40 °C durante toda la noche en el baño bien nivelado, siguiendo las mismas indicaciones para este procedimiento que para la prehibridación.

La temperatura de fusión de las hebras (T_m) fue calculada (67,9 °C) con la Ecuación 5, determinada empíricamente (Meinkoth y Wahl, 1984).

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log [Na^+] + 0,41 (\%G + C) - 0,61 (\%v/v \text{ formamida}) - 500/(L) \quad \text{Ecuación 5}$$

donde L es la longitud media estimada de los fragmentos de ADNc hibridados con los *microarrays*. Como el tampón SSC (Anexo I) está concentrado a 3X en este caso (Anexo I), $[Na^+] = 0,585 \text{ M}$. El contenido en G + C del genoma de *L. infantum* en las regiones codificantes es del 62,5% (sección 1.4.1.). Se consideró una longitud media de los fragmentos de ADNc de 700 pb, según el rango de tamaños del ARNa (secciones 3.6.4. y 3.6.6.). La temperatura de hibridación fue entonces determinada mediante la Ecuación 6.

$$T_{\text{hyb}} = T_m - 25 \text{ °C} \quad \text{Ecuación 6}$$

Una vez realizada la hibridación, se llevaron a cabo los lavados. Para ello, se calentaron 400 ml de la primera solución de lavado (2XSSC, N-lauroil sarcosina al 0,1%) a 40 °C y se vertieron en una cámara de lavado en agitación (ArrayIt, Telechem). A continuación, se retiró el portaobjetos sumergiéndolo en esta solución y se incubó en agitación lenta durante 4 min. Antes de transferir los *microarrays* a una jarra Couplin con 100 ml de 1XSSC (segundo lavado), se limpiaron las pinzas primero con agua y luego con etanol, dejándolas secar brevemente a temperatura ambiente. A continuación, se desechó la solución y se añadió el mismo volumen de 0,2XSSC, repitiendo el procedimiento del segundo lavado. Se eliminó el líquido remanente mediante centrifugación de los portaobjetos. Los *microarrays* hibridados fueron conservados en oscuridad a temperatura ambiente.

3.10.2. Adquisición y análisis de las imágenes de los *microarrays*.

Se escanearon los *microarrays* con el equipo *GenePix*[®] 4100A controlado por el programa informático *GenePix Pro 7.0* (Axon Instruments, Foster City, Estados Unidos) con una resolución de 5µm/pixel. A continuación, se ajustó la “gradilla” a la imagen de los *microarrays*, que es el archivo *.gps generado con *GenePix Pro 7.0*, una plantilla generada con el archivo *.gal para la identificación de los puntos o *spots* por sus coordenadas (sección 3.9.3.). El posicionamiento se realizó primero globalmente y luego individualmente para cada bloque o *grid*; en los casos en los que un punto o un grupo de puntos se desviaron de la “gradilla”, se ajustaron individualmente. Una vez posicionada la “gradilla” correctamente, se descartaron aquellos puntos afectados por un fondo o *background* local alto por diversas causas, como una mancha de fluoróforo. Dicha eliminación se realizó utilizando el comando *flags* (destacando así puntos para diversos fines, en este caso para descartarlos del análisis). Una vez realizados estos ajustes, se procedió al análisis de las intensidades de fluorescencia, seleccionando previamente la opción de eliminación del *background* local. El resultado es una matriz de datos en la que se indican las intensidades de fluorescencia de Cy3 y Cy5 (intensidad total, media y mediana), los cocientes de intensidad Cy5/Cy3 (cocientes de las medias y de las medianas y medias y medianas de los cocientes), el *background* eliminado, las cuasidesviaciones típicas correspondientes, los *flags*, etc. Esta matriz se guarda como archivo de resultados no normalizados *.gpr.

3.10.3. Normalización de los datos y contraste de hipótesis.

Se utilizó el programa *AlmaZen* (BioAlma, Tres Cantos, España) para normalizar los datos del archivo *.gpr. El formato de cuantificación aplicado fue el valor del cociente en escala logarítmica en base 2 de las medianas de intensidad de fluorescencia con el *background* sustraído. El algoritmo de normalización de los datos aplicado fue el *Locally Weighted Scatter Plot Smoothing (LOWESS) per pin* (individualmente para cada bloque o *grid*). La principal finalidad de este algoritmo es utilizar una regresión polinomial ponderada localmente del diagrama de dispersión M/A (de tipo Bland-Altman) (Ecuaciones 7 y 8), en el que se visualizan mejor los artefactos que en el diagrama intensidad vs. intensidad, para obtener un factor de calibración. Para un determinado punto de los *microarrays*, se define:

$$M_i = \log_2 (R_i/G_i) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$A_i = [(\log_2 R_i + \log_2 G_i)/2] \quad \text{Ecuación 8}$$

donde $i = 1, 2, \dots, n$. El *smoothing* (suavizado o ajuste) obedece a la función:

$$M_j = g(A_j) + \varepsilon_j \quad \text{Ecuación 9}$$

donde ε_j es una variable aleatoria de media cero. El punto en cuestión queda ajustado a (A_j, \hat{M}_j) aplicando el algoritmo LOWESS, donde

$$\hat{M}_j = \sum_{i=1}^m h_j(A_j) M_i \quad \text{Ecuación 10}$$

Materiales y métodos

es el valor ajustado de la regresión, una combinación lineal de M_i . El algoritmo LOWESS está definido por cuatro parámetros específicos: orden polinomial, d ; número de iteraciones, t ; función de ponderación w ; y fracción de datos usada en la regresión local, f . Estos parámetros afectan al valor de la estimación \hat{M}_j . El desarrollo completo de este algoritmo fue descrito por (Cleveland, 1979). Al realizar el análisis con *AlmaZen*, se crea un proyecto que engloba varios experimentos de hibridación, en cada uno de los cuales se introducen los archivos *.gpr de las réplicas realizadas, que posteriormente han de ser asociadas al mismo diseño o *layout* (creado a partir del mismo archivo *.gpr). A continuación, se seleccionó la opción de normalización *LOWESS per pin* en el programa. Una vez que las tres matrices de las réplicas fueron insertadas y normalizadas, se procedió al análisis comparativo mediante el contraste de hipótesis con el estadístico t de Student pareado (Ecuación 11) en todos los casos, debido a que las medidas eran pareadas por realizarse la hibridación de dos poblaciones de ADNc en un mismo portaobjetos de *microarrays* (hibridación competitiva). La hipótesis nula es la falta de regulación diferencial para un determinado gen contenido en un determinado inserto, o dicho de otro modo, la igualdad de los dos valores de intensidad ($H_0: R_i = V_i$).

$$t = \frac{\bar{M}}{S / \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$S = \sqrt{\frac{n \sum M_i^2 - (\sum M_i)^2}{n(n-1)}} \quad \text{Ecuación 12}$$

donde S es la cuasidesviación típica y n el número de observaciones. El criterio considerado para considerar que un clon contiene un gen diferencialmente expresado es el siguiente: (i) $F \geq 2$ ó $\geq 1,7$ si $Cy5 > Cy3$ o $F \leq -2$ ó $\leq -1,7$ si $-Cy5/Cy3$ (teniendo en cuenta el diagrama de dispersión M/A); (ii) intensidad de fluorescencia (unidades de fluorescencia arbitrarias, UF) diez veces superior al *background* local medio; (iii) nivel de significación $\alpha = 0,05$ ($p < 0.05$). Estos filtros se aplican también con el programa *AlmaZen*.

3.11. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADN.

3.11.1. Secuenciación.

La secuenciación de los insertos *a posteriori* se realizó en la Unidad de Secuenciación y Bioinformática del Centro de Astrobiología (INTA-CSIC, Torrejón de Ardoz). En primer lugar, se cultivaron los clones en medio TB con ampicilina (sección 3.4.1.) que contenían los insertos seleccionados (sección 3.10.3) en el análisis de la expresión génica con *microarrays*. A continuación, se realizaron preparaciones de los plásmidos en placas de 96 pocillos con el kit *Perfectprep® Plasmid 96 Vac, Direct Bind* (Eppendorf) (sección 3.6.1.) y se secuenciaron por el método dideoxi (Sanger y col., 1977) los extremos de los clones utilizando los oligonucleótidos m13pUC18F23 y m13pUC18R23. El protocolo concreto de las reacciones de secuenciación fue el siguiente: se mezcló el ADN molde a una concentración de 150 y 300 ng/ μ l con 2 μ l de mezcla de reacción, 2 μ l del tampón de secuenciación

(ambos del kit *BigDye[®] Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems) (Anexo I) y el oligonucleótido cebador a una concentración de 3,2 pmol/μl, en un volumen total de 10 μl; a continuación, se incubaron las muestras en el termociclador con el programa 94 °C, 3 min, 25x[(96 °C, 30 s) + (50 °C, 10 s) + (60 °C, 4 min)]; se purificaron los productos diluyendo con 10 μl de agua *milliQ* y 2 μl de SDS 2,2%, incubando a 96 °C durante 5 min y a 25 °C durante 10 min y, por último, centrifugándolos en columnas de *Sephadex[™] G50* una vez situadas en placas de filtro *Multiscreen* (Millipore). El eluido se procesó en un secuenciador *ABI Prism[®] 3730XL* (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos).

3.11.2. Ensamblaje y alineamiento de secuencias.

Las secuencias cromosómicas y las anotaciones génicas de *L. infantum* MCAN/ES/98/LLM-877 fueron descargadas del sitio *ftp* del *Sanger Center* (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/L_infantum). El proyecto genoma de *L. infantum* MCAN/ES/98/LLM-877 se ha completado prácticamente en su totalidad (Peacock y col., 2007), aunque las secuencias cromosómicas consisten en colecciones no ordenadas de *contigs* concatenados con series de 50 caracteres “N”. Las anotaciones están disponibles como archivos en formato *EMBL*, que pueden ser visualizados directamente con Artemis, e incluyen información sobre la localización y la función de los genes predichos. Estos archivos fueron procesados con un *script* (archivo de procesamiento por lotes) o programa escrito con el intérprete de comandos *Perl* para generar archivos GFF (*General Feature Format*). Las secuencias y las anotaciones así formateadas fueron depositadas en una base de datos relacional de tipo *MySQL*, que era consultada utilizando el interfaz gráfico proporcionado por el sistema *GBrowse* (Stein y col., 2002).

Las lecturas de las secuencias correspondientes a los extremos de los insertos de los clones de *L. infantum* MCAN/ES/98/10445 fueron alineadas con *BLASTN* (Altschul y col., 1990) contra las secuencias cromosómicas de *L. infantum* MCAN/ES/98/LLM-877. Estos alineamientos fueron procesados otro programa escrito en *Perl* para identificar los segmentos cromosómicos incluidos en los insertos estableciendo los siguientes requisitos: (i) que los alineamientos generados con *BLASTN* tuvieran un valor de *e* menor a $1e^{-10}$ (donde *e* se refiere a potencias de 10, en este caso, 10^{-10}); (ii) que las secuencias de los extremos se alinearan de forma convergente, teniendo en cuenta que cada uno pertenece a una hebra distinta, dentro del mismo cromosoma; (iii) que la longitud máxima del inserto fuera de 12 Kpb, según el rango de tamaños de los insertos de la genoteca; y (iv) que la región presumiblemente incluida en el inserto no contuviera una sucesión de 50 caracteres “N”. Tanto las coordenadas que definían los extremos de los insertos como las de todos los alineamientos fueron depositadas en la base de datos *GBrowse*, lo que permitió determinar visualmente las secuencias génicas e intergénicas incluidas en cada clon. Además, se utilizó otro programa escrito en *Perl* para generar de forma automática tablas en las que se identificaban los genes que solapaban al menos en un 5% de su longitud con cada uno de los clones. Dichas tablas permitieron generar listados de genes expresados de forma diferencial a partir de los listados de todos los clones derivados de los experimentos de transcriptómica.

Los alineamientos de múltiples secuencias fueron generados con *CLUSTALW*, que es un algoritmo de alineamiento múltiple de tipo progresivo. Con este tipo de algoritmos, se calcula en primer lugar las distancias entre todos los pares de secuencias que se pretende alinear y representándolas en un árbol guía y, a continuación, se genera un alineamiento entre las dos secuencias más cercanas y se van incorporando las demás en el orden que dicta el árbol guía.

Materiales y métodos

La predicción de hélices transmembrana fue realizada mediante el servidor *TMHMM* del centro *Center for Biological Sequence Analysis* de la Universidad Técnica de Dinamarca (<http://www.cbs.dtu.dk>). Este algoritmo se basa en la utilización de modelos ocultos de Markov (HMMs) para representar las propiedades de las hélices transmembrana en cuanto a su longitud y en cuanto a la hidrofobicidad y la distribución de las cargas eléctricas asociadas a las diferentes regiones de la hélice. Una vez se predicen las posibles hélices transmembrana de una proteína, el algoritmo realiza una predicción de la topología de la misma.

3.11.3. Anotación de genes y funciones.

Con la intención de identificar posibles genes no incluidos en las anotaciones generadas por el *Sanger Center* para el genoma de *L. infantum*, se utilizó el programa informático *Glimmer 3.0* (Delcher y col., 2007). Para ello, en primer lugar se utilizó la secuencia nucleotídica de los 8184 ORFs ya predichos como conjunto de entrenamiento para el programa. Los genes predichos por *Glimmer* fueron filtrados para eliminar los que coincidían con los ya anotados en el *Sanger Center*, los que solapaban con cadenas de 50 “N” y los que tenían menos de 300 pb de longitud. Los genes resultantes fueron anotados por comparación con los correspondientes productos génicos con las entradas de la base de datos SwissProt utilizando *BLASTP*. Las coordenadas de los nuevos genes fueron introducidas en la base de datos *GBrowse* y utilizadas para identificar solapamientos con los clones que contenían genes diferencialmente expresados según los análisis transcriptómicos.

Los genes diferencialmente regulados que se detectaron en este estudio fueron re-anotados y con el programa informático *BLAST2GO* para establecer la distribución de términos entre ellos de funciones moleculares y procesos biológicos de la base de datos GO (Conesa y col., 2005). Para ello, se compararon las secuencias de los productos génicos con las entradas de la base de datos NR del *NCBI*, con lo que se obtuvieron predicciones funcionales de acuerdo a la terminología definida por el *Gene Ontology Consortium* (Reference Genome Group of the Gene Ontology Consortium, 2009) dentro de las ontologías de “Función Molecular” y “Proceso Biológico”. Las anotaciones así generadas fueron procesadas con la misma aplicación para determinar la distribución de términos de GO asociada a las diferentes condiciones experimentales. Dichas distribuciones fueron representadas gráficamente de dos maneras: por un lado, se generaron grafos acíclicos dirigidos (DAGs) para representar de forma combinada la diversidad de términos de GO asociada a cada condición experimental y las relaciones existentes entre ellos; y por otro lado, se generaron diagramas de sectores circulares multinivel para visualizar la distribución de los términos de GO más abundantes de diferentes niveles de concreción en las anotaciones asociadas a cada condición experimental. Además de la información genómica, en el sitio de *GeneDB*, <http://www.genedb.org/Homepage/Linfantum> (The GeneDB team y col., 2002), se proporcionan, siempre que sea posible, anotaciones de términos funcionales de diferentes bases de datos (GO, PFAM, InterPro y números EC de la *IUBMB*) en las anotaciones génicas. Estos términos también han sido considerados para la interpretación de los resultados de los análisis de expresión génica diferencial global.

3.11.4. Análisis de inserciones, deleciones y sustituciones.

Se ensamblaron las secuencias de los extremos de todos los clones secuenciados en este estudio de la genoteca de *L. infantum* MCAN/ES/98/10445 con el paquete *Phred/Phrap/Consed* (Ewing y Green, 1998; Ewing y col., 1998; Gordon y col., 1998) y después se alinearon con las secuencias cromosómicas

del proyecto genoma de *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-877) con el programa *Cross-match* (Green, 1994). Los alineamientos generados fueron procesados con un programa escrito en *Perl* para extraer tanto el número y la longitud de los huecos o *gaps* presentes en los alineamientos como el porcentaje de sustituciones.

3.12. VALIDACIÓN POR RT-PCR CUANTITATIVA RELATIVA EN TIEMPO REAL.

A partir del ARNm amplificado, se sintetizó el ADNc con *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y las reacciones de PCR cuantitativa relativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron en un termociclador *MyiQ™ Single-Colour Real-Time PCR Detection System* (BioRad) con la mezcla de reacción *iQ™ SYBR® Green Supermix* (BioRad) 1X (Anexo I), oligonucleótidos 0,3 μM (Anexo III, Figura A1, Tabla A1) y 5ng de cada muestra de ADNc no marcado y dos diluciones seriadas 1/3. La temperatura de hibridación para cada par de oligonucleótidos (STABVida) fue optimizada realizando diferentes reacciones de PCR con un gradiente de temperatura y comprobándolas mediante electroforesis en gel de agarosa, para comprobar la ausencia de dímeros de los oligonucleótidos y secuencias amplificadas inespecíficamente. Además, se analizó la curva de desnaturalización y se comprobó la especificidad mediante secuenciación. El perfil de ciclos térmicos fue el siguiente: 95 °C durante 5', 40 x (95 °C durante 30'', 50-60°C durante 30'', 72°C durante 30'' con adquisición de datos), 72 °C durante 5', curva de fusión (*melting*) [95 °C durante 1', 80 x (55→95 °C durante 10'' (+0.5 °C/ciclo) con adquisición de datos)]. La eficiencia de la PCR fue calculada mediante el mejor ajuste a la curva estándar con el programa informático *MyiQ software* (BioRad) a partir de tres diluciones de cada una de las tres réplicas biológicas tomadas para cada experimento de expresión génica. Finalmente, los valores de F y las correspondientes cuasidesviaciones típicas fueron calculados mediante el método ΔC_t corregido con el valor de la eficiencia (Ecuaciones 13-15) (Bookout y col., 2006). Dependiendo de los casos, se tomó como gen de referencia el de la *hsp70* (PNA^{+/−}) o el de 18S ARNr.

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$Q = E^{(-Ct)} \quad \text{Ecuación 14}$$

$$VN = \frac{Q_{GI}}{Q_{GR}} \quad \text{Ecuación 15}$$

donde E es la eficiencia calculada mediante la curva estándar, Q es la cantidad correspondiente al gen de interés, Ct es el ciclo umbral (*cycle threshold*), es decir, aquél en el que comienza la amplificación, GI es el gen de interés y GR es el gen de referencia.

3.13. META-ANÁLISIS.

3.13.1. Contraste de hipótesis con el test de la distribución binomial.

Con el fin de evaluar las diferencias de las frecuencias absolutas de sobre-expresión y sub-expresión, se aplicó el test de la distribución binomial. La expresión diferencial de genes es una variable dicotómica definida por las categorías “sobre-expresión” y “sub-expresión”. El análisis transcriptómico mediante *microarrays* de ADN y las aproximaciones proteómicas pueden ser consideradas como muestreos aleatorios independientes realizados simultáneamente para miles de genes y proteínas del mismo genoma y proteoma respectivamente. Por lo tanto, esta variable sigue una distribución binomial $B(n, p)$, en la cual el parámetro n es el número de repeticiones y p la probabilidad de obtener uno de los dos posibles resultados. Sea p la probabilidad de sub-expresión y $q = 1-p$ la probabilidad de sobre-expresión. La hipótesis nula de ausencia de diferencias significativas entre el número de genes sobre-expresados y sub-expresados ($H_0: p_0 = q_0$) en un conjunto determinado de genes diferencialmente expresados se puede contrastar con el test de la distribución binomial. Si $n > 30$ y $np > 10$ y $nq > 10$, $B(n, p)$, se puede aproximar a una distribución normal $N(np, (npq)^{1/2})$, según el teorema de Laplace-De Moivre. Esta distribución puede ser tipificada a una normal $N(0, 1)$ si $n > 50$, donde

$$Z = [(p-p_0)/(p_0q_0/n)^{1/2}] \quad \text{Ecuación 16}$$

Cuando no se cumplen estos requisitos, se realiza un cálculo exacto,

$$P(X \geq r) = [P(X = r) + P(X = r + 1) + \dots + P(X = n)] \quad \text{Ecuación 17}$$

donde r es el número de veces que ocurre el suceso con probabilidad p y

$$P(X = r) = [n!p^r q^{n-r}]/[r!(n-r)!] \quad \text{Ecuación 18}$$

El valor mínimo de F considerado en todos los conjuntos de datos analizados es de 1,7 y -1,7.

3.13.2. Análisis de significación de *microarrays* y *clustering* jerárquico iterativo.

En el estudio de la influencia del pH y la temperatura en el transcriptoma en el proceso de diferenciación de los promastigotes a amastigotes se realizó el análisis de significación de *microarrays* (SAM) (Tusher y col., 2001) para contrastar la igualdad del perfil de expresión de los genes en ambas condiciones aplicadas por separado y simultáneamente. Los genes diferencialmente expresados fueron agrupados según su perfil de expresión génica aplicando el algoritmo de *clustering* jerárquico iterativo HCL-ST. Ambos análisis fueron realizados con el programa informático *MultiExperiment Viewer* (MEV) del paquete *Microarray Software Suite TM4* (Saeed y col., 2006). Para la realización de ambos análisis, se introdujeron las matrices de datos de expresión génica y se aplicaron los algoritmos SAM y HCL-ST, el primero con 100 permutaciones y un valor de significación $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) y el último con 100 iteraciones.

4

Resultados

4.1. CONSTRUCCIÓN DE *MICROARRAYS* GENÓMICOS COMPLETOS DE *L. infantum*.

El resultado de cada una de las etapas de la preparación de los insertos o ADN pasajero mixto y el vector plasmídico pUC18 para la construcción de una genoteca que representa el genoma completo de *L. infantum* se muestra en la Figura 17. De las cuatro digestiones parciales de ADN genómico con *Sau3AI*, se seleccionó la nº 3, puesto que la colección de fracciones tras la ultracentrifugación en gradiente continuo de sacarosa fue la que más se ajustaba al criterio de selección de tamaños moleculares (entre 2 y 10 Kpb). La técnica utilizada para comprobarlo fue la electroforesis en gel de agarosa de las fracciones múltiplo de 5 a partir de la nº 20, según fue optimizada. A continuación, se comprobaron por la misma técnica todas las fracciones intermedias más las dos anteriores y las dos posteriores al intervalo definido por la primera aproximación, siendo seleccionadas aquellas cuyo rango de tamaños era correcto. Se realizaron dos mezclas distintas de fracciones, cada una de las cuales se correspondía con un intervalo de tamaños moleculares distintos (2-5 y 5-10 Kpb), se diluyeron y se precipitó el ADN que posteriormente sería el pasajero mixto. Tras la cuantificación de los insertos y del vector digerido, defosforilado y purificado, se realizaron dos mezclas de ligación que fueron divididas en alícuotas de 50 µl con la proporción de inserto y vector 50:1. Dichas mezclas se correspondían con los dos subconjuntos de diferente rango de tamaño. La incubación a 16 °C durante 16 h de las alícuotas de cada mezcla de ligación fue simultánea.

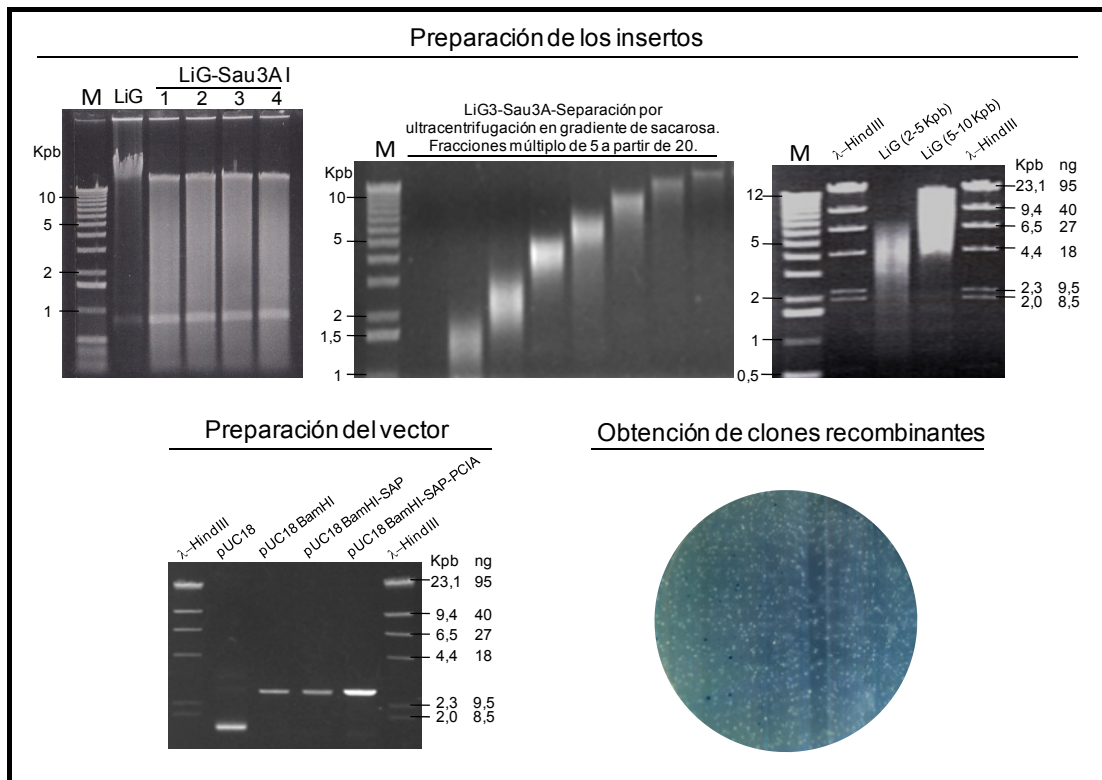


Figura 17. Etapas de la preparación de la genoteca completa de *L. infantum*. Abreviaturas: M, marcador de tamaño molecular de 1 Kpb (Anexo I); LiG, ADN genómico de *L. infantum*; LiG-*Sau3AI*, LiG digerido con *Sau3AI*; λ -*HindIII*, marcador de masa y tamaño molecular; LiG (2-5 Kpb) y LiG (5-10 Kpb), mezclas de insertos de distinto rango de tamaño molecular; pUC18*BamHI-SAP-PCIA*, vector plasmídico de clonaje pUC18 preparado por digestión con *BamHI*, defosforilación de los extremos cohesivos 5' con fosfatasa alcalina de gamba y purificación mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1.

Resultados

El resultado se comprobó inicialmente mediante transformación por choque térmico de bacterias competentes de la estirpe de *E. coli* DH5 α con el 10% de cada alícuota y la posterior digestión con *EcoRI* de 200 plásmidos aislados de clones transformantes seleccionados al azar. En la Tabla 5 se muestra el resultado de estas primeras estimaciones, entre las cuales figura la del número de clones necesario para representar el genoma completo con un valor de *P* dado. Dicho número se calcula mediante la Ecuación 19 (Clarke y Carbon, 1976). Este dato fue necesario para el diseño pormenorizado de la siguiente etapa del proceso de construcción de los *microarrays*. En concreto, se tomó el valor *P* = 0,95 como probabilidad de que cualquier secuencia del genoma del parásito estuviese representada en la genoteca, siendo el tamaño haploide del genoma de *L. infantum* de aproximadamente 32,8 Mpb e I el tamaño medio de los insertos (Tabla 5).

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln\left(1 - \frac{I}{G}\right)} \quad \text{Ecuación 19}$$

Tabla 5. Características de la genoteca de *L. infantum*. En la etapa de comprobación de la genoteca previa a la construcción de los *microarrays*, se usó el método de transformación por choque térmico y la comprobación de los tamaños de los fragmentos mediante digestión con *EcoRI*. Con la progresión de la construcción de los *microarrays* mediante amplificación por PCR de los fragmentos y su comprobación por electroforesis en gel de agarosa, se obtuvo el número de recombinantes y las estimaciones del tamaño medio de los fragmentos y de la eficacia de la transformación y la recombinación. El número de recombinantes requerido se calculó con la Ecuación 19. La eficacia de recombinación estimada se calculó del siguiente modo: n° de colonias blancas/n° total de colonias.

Método	Estimaciones					
	N° recombinantes		Eficiencia de transformación	Eficiencia de recombinación	Tamaño	
	Requerido	Obtenido			Media	Rango
Transformación por choque térmico y digestión con <i>EcoRI</i> de los plásmidos recombinantes	2,0 x 10 ⁵	8,8 x 10 ⁵	2,62 x 10 ³ ufc/ μ g ADN	95%	5,0	2-10
Transformación por electroporación y amplificación por PCR de los insertos	2,4 x 10 ⁵	5,9 x 10 ⁶	1,76 x 10 ⁵ ufc/ μ g ADN	89%	4,1	0,5-12

Una vez obtenida la genoteca, prosiguió el procedimiento de fabricación de los *microarrays* según lo propuesto en el diseño experimental (Figura 10 sección 3.1.). Se realizaron transformaciones por electroporación, se sembraron individualmente en 1 ml de medio líquido TB-Amp en placas de 96 pocillos los clones que posiblemente tenían inserto, dada la ausencia de precipitado de color azul por degradación del análogo cromogénico de sustrato XGal y, a continuación, se lisaron 5 μ l de cada cultivo para la preparación rápida de plásmidos y la posterior amplificación por PCR de los insertos (secciones 3.6.1. y 3.9.1.); el volumen sobrante de los cultivos se conservó a -80 °C con glicerol al 20%. En total fueron cultivados 29.952 clones, que constituyen la genoteca ordenada en placas multipocillo de la cual derivaron los *microarrays* (Figura A2), y se realizaron las correspondientes reacciones de amplificación por PCR de los insertos, resultando ser positivas 24.855, según se calculó a partir de los resultados de las correspondientes electroforesis, número suficiente para lograr la representatividad propuesta del genoma (N = 24.414, *P* = 0,95) (Tabla 5). Para realizar tales estimaciones, el 9,3% de las reacciones fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa convencional (29 placas de 96 pocillos en células de electroforesis *Sub-Cell GT*) (Figura A3), lo cual permitió estimar el tamaño medio de los insertos amplificados (Tabla 5). El resto de las reacciones fueron comprobadas mediante electroforesis en geles

preteñidos *Ready-To-Run*. Con este sistema no es posible comprobar el tamaño, dada la escasa resolución de la separación electroforética por su brevedad (Figura A4). Los 29.952 volúmenes de reacción de PCR, de los cuales 24.885 resultaron en amplificaciones positivas de insertos, estaban inicialmente distribuidos en las 312 placas en las que se realizaron las reacciones (Lin1-Lin312). A continuación, fueron purificados, deshidratados completamente en la centrífuga de vacío, resuspendidos en tampón de impresión 1X, redistribuidos en 78 placas de 384 (Li1-Li78) y utilizados para obtener diferentes lotes de *microarrays* con la misma configuración (sección 3.9.3). Se configuró la placa de controles de la genoteca (Li79) (Figuras A5-8, sección 3.9.2.) y se incluyó en la colección de placas para la fabricación de los *microarrays*. Finalmente, antes de proceder a realizar los experimentos propuestos (sección 2) se optimizó el procedimiento de síntesis y marcaje indirecto de ADNc y el de hibridación (sección 3.10.1).

4.2. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL CON *MICROARRAYS* DE ADN Y DE ENSAMBLAJE E IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS GÉNICAS.

Una vez obtenidas y caracterizadas las muestras biológicas y el ARN total aislado de las mismas para los análisis de expresión génica con *microarrays*, el ARNm fue amplificado en todos los casos (sección 3.6.4.), ya que en todos los experimentos se obtuvieron cantidades limitadas de material biológico en al menos un estadio o condición experimental, especialmente en el caso de los promastigotes obtenidos de la parte anterior a la válvula estomodeal del tubo digestivo de *P. perniciosus* (sección 4.7.). En este caso, se añadió glucógeno como *carrier* para aumentar el rendimiento del proceso de aislamiento y se realizaron dos rondas de amplificación. Antes de optar por este procedimiento, en la fase de diseño experimental se estudiaron las ventajas y los inconvenientes que pudiera plantear. Se ha descrito que el sesgo introducido por este procedimiento es mínimo (Luo y col., 1999; Baugh y col., 2001; Feldman y col., 2002; Polacek y col., 2003; Goff y col., 2004; Li y col., 2004) y que aumenta la reproducibilidad y la fiabilidad de los resultados de los experimentos de hibridación con *microarrays*, independientemente de que sea o no necesario para disponer de suficiente cantidad de muestra (Feldman y col., 2002; Polacek y col., 2003). La doble amplificación no produce un sesgo significativo de los datos en relación al ARN no amplificado y amplificado en una sola ronda (Luo y col., 1999; Baugh y col., 2001; Goff y col., 2004).

En el análisis de los datos obtenidos en los ensayos de hibridación se aplicaron de modo sistemático diversos filtros para evitar falsos positivos. En primer lugar, la eliminación de puntos afectados por un *background* local elevado y el establecimiento de un formato de cuantificación en el programa *AlmaZen* basado en la sustracción del *background* local medio a los valores de intensidad de fluorescencia, empleándose la mediana como estadístico en ambos casos para eliminar los valores de *pixels* de intensidad muy elevada y/o muy limitada. Además, el algoritmo de normalización *LOWESS* permite la eliminación de artefactos en diferentes intervalos de intensidad de fluorescencia media, es decir, de modo local, y fue aplicado independientemente para cada bloque o *grid* de los *microarrays* para eliminar el efecto de posibles variaciones locales en el proceso de hibridación y lavado. Por último, la expresión diferencial de los genes fue considerada no sólo a partir de un valor límite de F (sección 3.10.3.) según el diagrama de dispersión M/A correspondiente y con un valor de $p < 0,05$ en el contraste de hipótesis con el test de la t pareado, sino también a partir de un valor de intensidad de fluorescencia diez veces superior al

Resultados

background global medio para asegurar la fiabilidad de F. En síntesis, se consideró la aplicación de un análisis estadístico de los datos robusto para la eliminación de posibles falsos positivos.

Los extremos de los insertos contenidos en los clones de la genoteca seleccionados en los análisis de expresión fueron secuenciados con el mismo par de oligonucleótidos flanqueantes del MCS de pUC18 que se utilizó para su amplificación durante la construcción de los *microarrays* (m13pUC18F23 y m13pUC18R23, Figura 13). A continuación, estas secuencias fueron alineadas con *BLASTN* para mapear los clones con las secuencias genómicas (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/L_infantum) de la estirpe de *L. infantum* MCAN/ES/98/LLM-887. Los extremos secuenciados de los insertos fueron definidos con un programa escrito en *Perl* con el que se intentó buscar alineamientos entre las secuencias obtenidas con uno y otro oligonucleótido que cumplieran las siguientes condiciones: (i) valor $e < 1e-10$ para ambos alineamientos, (ii) orientación convergente (antiparalela) entre las secuencias de ambas hebras del mismo cromosoma, (iii) longitud máxima de 12 Kpb entre los extremos del inserto de cada clon y (iv) ausencia de sucesiones de 50 caracteres "N" (sección 3.11.2.). Cuando se localizó un alineamiento que cumplía estas condiciones, los extremos se consideraron mapeados en su posición exacta, siendo definido como alineamiento de tipo *a* (Figura 18). Este tipo de alineamiento se produjo en el (19,6%) de los casos. Cuando más de un par de alineamientos cumplían estas condiciones, el clon es de tipo *b* (Figura 18). Este tipo de alineamientos que no tienen definidos de manera precisa los extremos se produce por la presencia de secuencias de baja complejidad en el entorno de los mismos, existiendo una posición más probable, lo cual se tuvo en cuenta para determinar el/los fragmento/s génico/s englobado/s en el inserto. Esta situación se produjo en el (72,3%) de los casos. Y por último, se definieron los clones de tipo *c* (8,1%) como clones que no cumplen la condición (ii), la (iii) y/o la (iv) (Figura 18), de modo que las posiciones de inicio de los extremos están situadas a más de 12 Kpb de distancia, que mapean en distintos cromosomas (probablemente debido a un ensamblaje deficiente de esa región en el proyecto genoma) o a la falta de la secuencia de uno de los extremos.

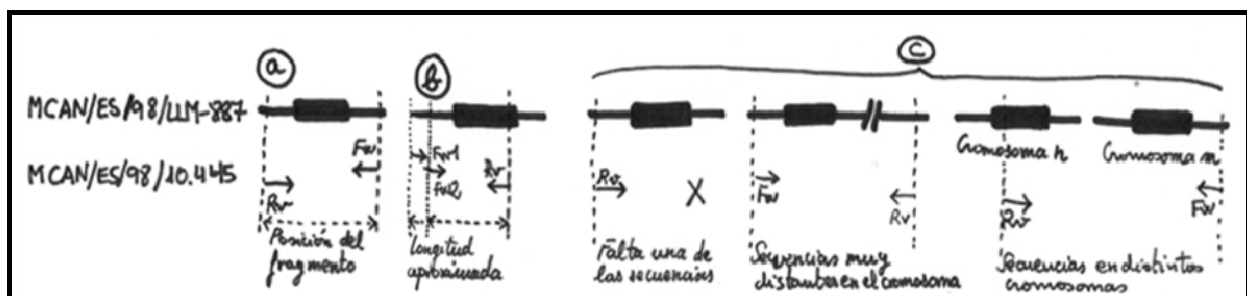


Figura 18. Categorías de los alineamientos entre los extremos de los insertos y la secuencia del proyecto genoma de *L. infantum*.

A continuación, se usó otro programa escrito en *Perl* para localizar los genes solapantes con el inserto, considerándose como tales aquellos cuya secuencia estaba representada en él en un 5% como mínimo. Un (18,3%) de los clones no contiene ningún gen solapante; en algunos de ellos, se realizaron anotaciones con el programa informático *Glimmer* (Anexo IV), habiendo realizado de nuevo la anotación génica de toda la secuencia cromosómica y, como resultado, se observó un 76% de coincidencias con la realizada en el *Sanger Institute* (Peacock y col., 2007).

En algunos clones se produjo más de un solapamiento con genes anotados. En tales casos, fue necesario realizar un análisis de expresión adicional para determinar cuál/es del/de los gen/es estaba/n diferencialmente expresado/s. Para ello, se llevaron a cabo análisis de qRT-PCR, que también sirvieron como técnica de validación externa de los datos proporcionados por el análisis de *microarrays*, habiendo sido aplicados en clones solapantes con un solo gen. Además, se realizó la validación interna con los datos de hibridación de los controles positivos y negativos incluidos en los *microarrays* (sección 3.9.2.).

Todos los clones cuyos extremos fueron secuenciados que se describen en este estudio (secuencias de *L. infantum* MCAN/ES/98/10445), excepto los seleccionados en los experimentos descritos en la sección 4.7., fueron ensamblados con el paquete de programas informáticos *Phred/Phrap/Consed* en 888 *contigs* que representan una longitud total de $\approx 1,2$ Mpb con una cobertura media de 2. Las secuencias consenso de los *contigs* fueron alineadas contra las secuencias cromosómicas del proyecto genoma con *Cross-match* para estimar el grado de divergencia entre *L. infantum* MCAN/ES/98/10445 y MCAN/ES/98/LLM-887. El resultado de esta comparación fue un 0,78% de sustituciones nucleotídicas, 0,11% de deleciones y 0,2% de inserciones. Como se puede observar en el histograma de frecuencias (Figura 19), el rango de tamaños de las deleciones es de 1 a 30 pb, y el 75,6% son de uno o dos nucleótidos, mientras que el 21,4% tiene un tamaño comprendido entre 3 y 10 pb. El rango de las inserciones es de 1 a 16 pb (Figura 19), de las cuales el 90,1% son de uno o dos nucleótidos. Como consecuencia, la estrategia de secuenciación y ensamblaje por alineamiento de la secuencia genómica con la de los extremos de los fragmentos clonados no está afectada por inserciones, deleciones y sustituciones.

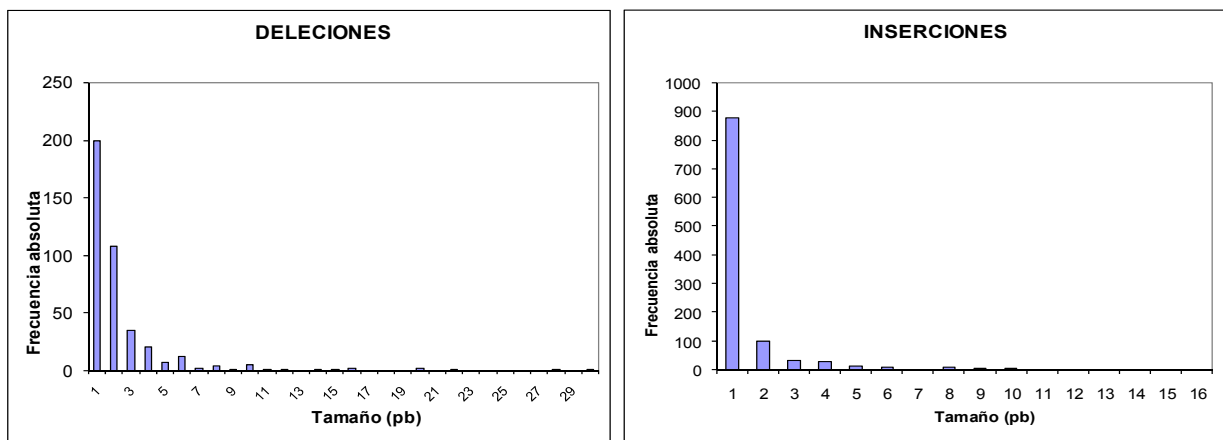


Figura 19. Histogramas de frecuencias absolutas de inserciones y deleciones entre las secuencias genómicas alineadas. Se representan las frecuencias absolutas de las inserciones y deleciones en el aislado MCAN/ES/98/10445 con respecto al MCAN/ES/98/LLM-887. El primero es el utilizado en los análisis de expresión génica y el segundo es el aislado cuyo genoma ha sido secuenciado en el *Sanger Institute* (Peacock y col., 2007).

4.3. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS ESTADÍOS FUNDAMENTALES DEL CICLO BIOLÓGICO DE *L. infantum*.

4.3.1. Ensayos de hibridación con *microarrays* para el análisis de la expresión génica diferencial en promastigotes y amastigotes.

En primer lugar, se tomaron muestras de cultivos axénicos de promastigotes en fase logarítmica (L) y estacionaria (E) (días 2 y 7 respectivamente) (Figura 20A) y de amastigotes intracelulares (A) obtenidos a partir de infecciones de células diferenciadas de la línea U937 estimulada con PMA de su medio natural, es decir, intracelulares (Figura 20B). La infección fue comprobada analizando la expresión de la leishmanolisina o gp63 mediante IFI (Figura 20F), ya que se expresa tanto en promastigotes como en amastigotes, y la ausencia de contaminación con promastigotes adheridos a las células se realizó mediante IFI de gp46 (Figura 20G), glicoproteína de superficie también denominada antígeno de superficie del promastigote (PSA) que no se expresa en amastigotes (Kahl y McMahon-Pratt, 1987).

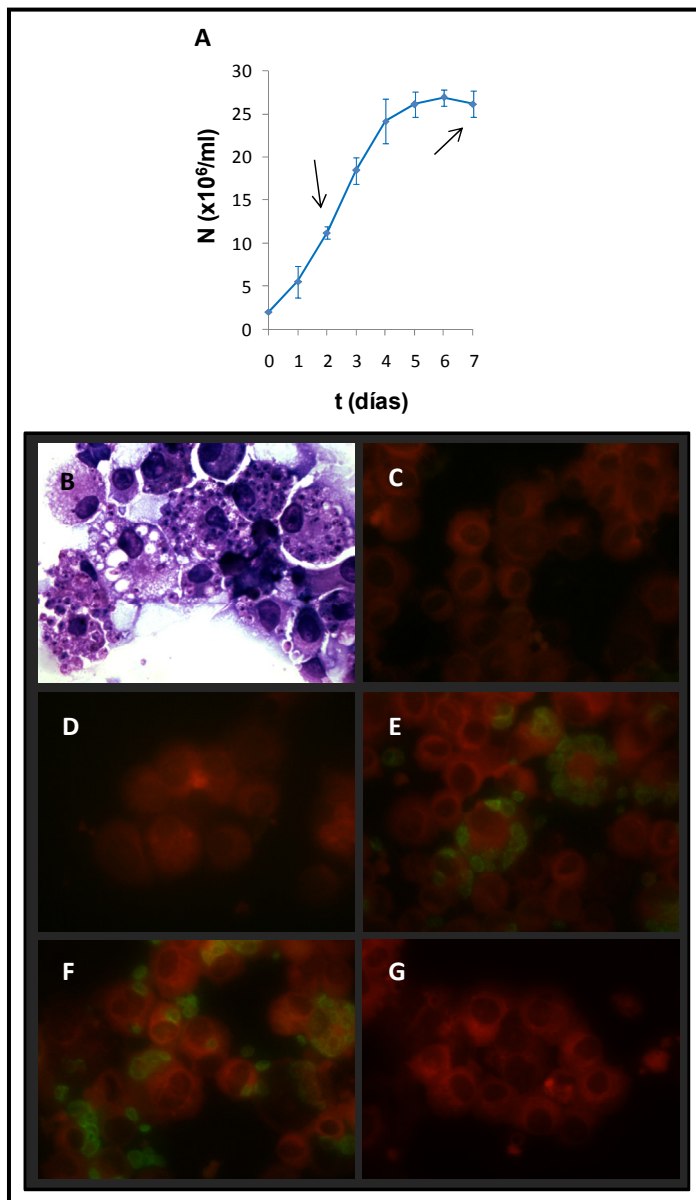


Figura 20. Curva de crecimiento medio de los promastigotes y detección de los amastigotes mediante IFI en cultivos de la línea celular U937 infectada *in vitro*. (A) Curva de crecimiento media de tres cultivos para las réplicas de los experimentos de hibridación con *microarrays*. Los promastigotes en fase logarítmica se obtuvieron el día 2 y los promastigotes en fase estacionaria el día 7. (B-G) Cultivos de la línea celular U937 estimulada con PMA e infectada con promastigotes para la obtención de amastigotes intracelulares (IFI en C-G). (B) Tinción con Giemsa modificado. (C) PBS como control negativo del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC. (D) Anticuerpo monoclonal IgG anti-factor H del complemento de conejo como control negativo del anticuerpo primario. (E) Anticuerpo monoclonal IgG anti-SLA SIM110 como control positivo. (F) Anticuerpo monoclonal IgG anti-gp63 SIM 6.11.2.1. (G) Anticuerpo monoclonal IgG anti-gp46 purificado. Se usó azul de Evans como fluoróforo de contraste en C-G.

A continuación, se extrajo el ARN total de los tres estadios y se amplificó el ARNm (ARNa) (Figura 21). Se realizó la síntesis de ADNc marcado con Cy3 de los promastigotes en fase logarítmica y de los amastigotes y la de ADNc marcado con Cy5 de los promastigotes en fase estacionaria y en fase logarítmica. Además, se extrajo ADN genómico de las células U937, el cual fue fragmentado al azar por sonicación, amplificado y marcado con Cy5 para ser posteriormente hibridado con los *microarrays* (secciones 3.6.2. y 3.6.4. y 3.6.5.). De este modo, se llevaron a cabo las siguientes hibridaciones con los *microarrays*: E/L, E/A, L/A (en los tres casos, Cy5/Cy3) y un control de hibridación cruzada con el genoma humano (células de la línea U937). Los puntos que mostraban hibridación inespecífica entre el ADN de *L. infantum* y el humano una vez sustraído el *background* local fueron eliminados del análisis de expresión posterior para evitar falsos positivos por la presencia de restos de ARN de las células U937 al purificar los amastigotes que pudieran dar lugar a hibridación cruzada. Se observaron 113 puntos en los que se producía hibridación cruzada, lo que indica un alto grado de especificidad en las condiciones de hibridación aplicadas a todos los experimentos realizados en este estudio y la eficacia del procedimiento de purificación de amastigotes basado en la lisis suave (0,1% SDS) de los fagocitos (Hart y col., 1981), siendo viables y prácticamente libres de contaminación (menos del 0,2%) los promastigotes aislados por este método (Pupkis y Coombs, 1984).

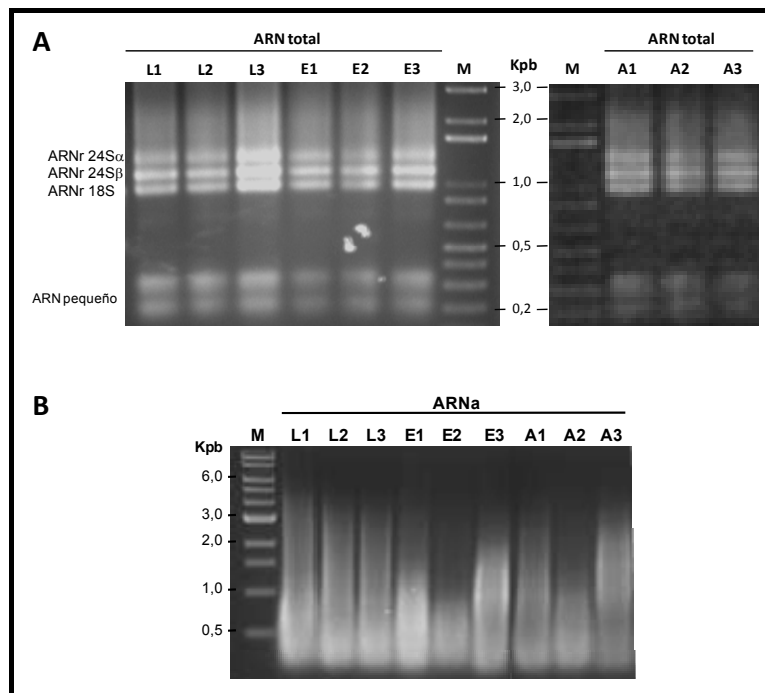


Figura 21. Análisis de las muestras de ARN de los promastigotes y los amastigotes. (A) Electroforesis del ARN total en gel de agarosa no desnaturalizante. Se observa la integridad del ARNr 18S y del 24S (α y β), así como la ausencia de degradación en el intervalo comprendido entre las bandas de ARN pequeño (fundamentalmente ARNt, y también ARNsn, ARNsno, ARNg) y el pico del ARNr 18S. (B) Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ARNa. Abreviaturas: promastigotes en fase logarítmica (L) y estacionaria (E) de cultivo axénico y amastigotes intracelulares (A).

Una vez realizadas las hibridaciones de los ADNc de E/L, E/A y L/A (Cy5/Cy3) con los *microarrays*, se obtuvieron las imágenes (Figura 22) y el archivo *.gpr de datos no procesados, que se normalizaron aplicando el algoritmo LOWESS individualmente para cada matriz (LOWESS *per pin*)

Resultados

(sección 3.10.2). Se realizaron tres réplicas biológicas de cada experimento para poder discriminar entre las diferencias significativas y las no significativas de expresión génica entre los estadios comparados. Asumiendo que los valores se ajustan a una distribución normal, se aplicó el test de la t de Student pareado. La hipótesis nula contrastada fue la ausencia de expresión diferencial de un determinado gen representado para cada uno de los fragmentos de ADN incluidos en los *microarrays*. Tanto la normalización como el contraste múltiple de hipótesis se realizaron con el programa informático *AlmaZen*, obteniendo los diagramas de dispersión M/A (Figura 23). Teniendo en cuenta estos diagramas, se seleccionaron aquellos puntos de los *microarrays* cuyos valores del cociente de intensidades de fluorescencia (Cy5/Cy3 si $Cy5 > Cy3$; -Cy3/Cy5 si $Cy5 < Cy3$) fuesen $F \geq 1,7$ o $\leq -1,7$ y cuya intensidad de fluorescencia para uno de los fluoróforos fuese al menos diez veces superior al valor medio del *background* local (5000 UF en este caso), siendo el valor de significación estadística $\alpha = 0.05$ ($p < 0,05$).

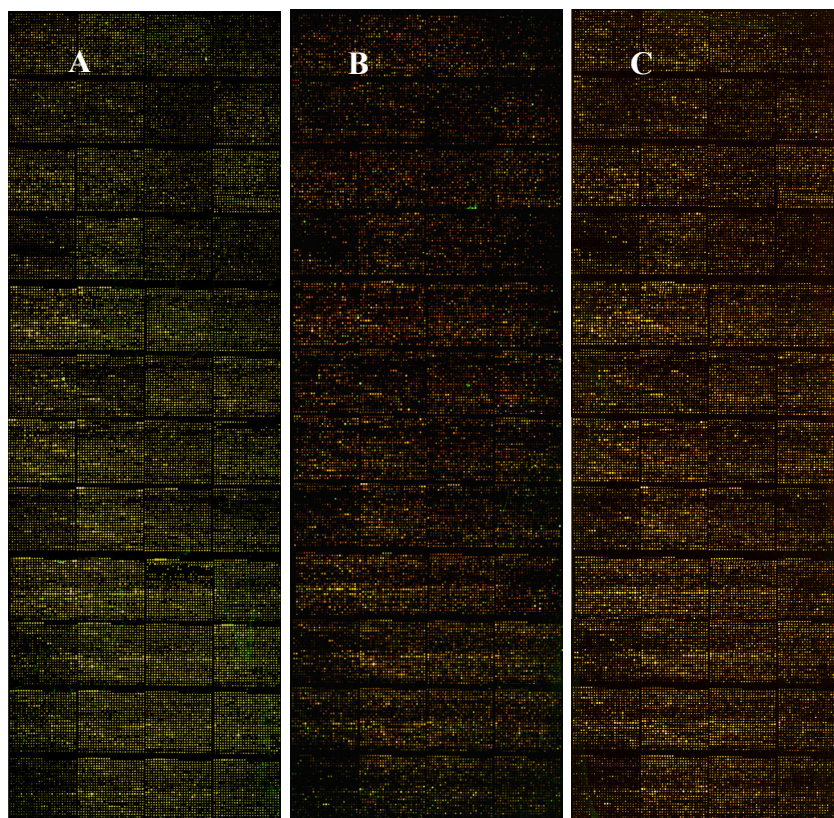


Figura 22. *Microarrays* hibridados para el análisis del perfil de expresión génica en los estadios fundamentales del ciclo biológico de *L. infantum*. Se muestra una de las tres réplicas de cada experimento. (A) E/L. (B) E/A. (C) L/A.

Mediante este análisis de expresión, se registró la regulación diferencial de 222 genes en el proceso de diferenciación de los promastigotes en cultivo axénico (E/L), 210 en la transición del promastigote al amastigote (E/A) y 303 en la transición del amastigote al promastigote en fase logarítmica de cultivo axénico (L/A) (Tabla 6). Ninguno de los puntos que presentaban hibridación cruzada con ADN del genoma humano cumplían los criterios para considerar expresión diferencial, por lo que no hubo que eliminar por este motivo ninguno de los datos obtenidos.

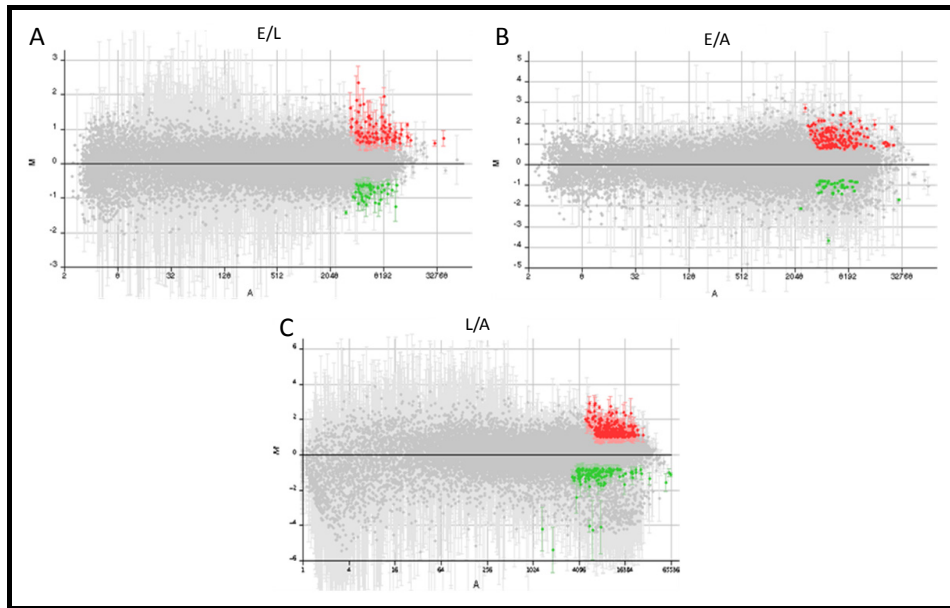


Figura 23. Diagramas de dispersión M/A de los experimentos de hibridación para la comparación del perfil de expresión génica de los estadios fundamentales del ciclo biológico de *L. infantum*. Se representa el valor de M de cada punto y su correspondiente cuasidesviación típica. $M = (\log_2 R_i - \log_2 V_i)$ y $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i)/2]$ (Ecuaciones 7 y 8), donde R y V son respectivamente los valores de intensidad de fluorescencia de Cy5 (rojo) y de Cy3 (verde). Los puntos marcados en rojo son los que cumplen los criterios de selección ($F \geq 1,7$ ó $\leq -1,7$, intensidad de fluorescencia de al menos un fluoróforo > 5000 UF y $p < 0,05$) para ser considerados como continentes de genes sobre-expresados y los marcados en verde de sub-expresados.

Tabla 6. Expresión génica diferencial en *L. infantum*: situación de las anotaciones génicas. El número de genes diferencialmente expresados en cada uno de los principales estadios está desglosado en la tabla según el estado actual de las anotaciones. Asimismo, se indica el número de clones que mapean con secuencias de minicírculos, así como clones no resueltos, es decir, aquellos que contienen más de un gen anotado y aquellos que no contienen ningún gen anotado en el proyecto genoma de esta especie. Éstos últimos sugieren que no han sido anotados todos los genes existentes en el genoma. Abreviaturas: d, sub-expresado; u, sobre-expresado; E, promastigotes en fase estacionaria; L, promastigotes en fase logarítmica; A, amastigotes; pro, procíclicos; met, metacíclicos (sección 4.4.).

	dE/L	uE/L	dEmet/ pro	uEmet/ pro	uE/A	dE/A	uL/A	dL/A	Total
Genes con función anotada	41	56	52	36	72	30	104	13	404
Genes de proteínas hipotéticas	17	15	37	44	22	27	50	26	238
Genes desconocidos	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Pseudogenes	1	0	0	0	0	0	1	0	2
Secuencias de minicírculos	0	2	0	5	0	1	1	0	9
Clones no resueltos	con anotaciones génicas	23	21	7	9	4	18	18	118
	sin anotaciones génicas	20	25	26	84	31	5	48	262
Total	102	119	122	178	129	81	224	79	1034

La validación de la técnica se realizó con los controles internos, habiendo registrado expresión constitutiva de todos los controles positivos en los tres experimentos de expresión génica diferencial global, exceptuando el gen A2 en amastigotes (sub-expresión en E/A y L/A). Los controles negativos (genes de *Le. ferrooxidans* y tampón 1XSSC) presentaban una intensidad de fluorescencia similar o doble a la del *background* local medio y un coeficiente de variación elevado en los tres experimentos (Tablas 7-9). El 20% de los datos de expresión diferencial hallados mediante el análisis de hibridación con *microarrays* han sido validados mediante qRT-PCR. Los resultados obtenidos por ambas técnicas presentan una alta correlación entre sí (Tablas 10-12). En algunos casos, el análisis de qRT-PCR fue

Resultados

realizado para genes representados en un mismo clon y se detectó que más de uno estaba diferencialmente expresado, lo cual indica que se produce co-regulación de dos genes adyacentes, e incluso tres en algunos casos (Tablas 10-12).

Tabla 7. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes E y L. Para los controles positivos se detalla F (*fold change*) de E/L y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; al ser en todos los casos $p \geq 0,05$, no hay expresión diferencial en E/L en ninguno de los genes control positivo. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	<i>p</i>	Control positivo
cLin79A1	-1,3 \pm 0,4	0,163	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	-1,5 \pm 0,6	0,221	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	-1,5 \pm 0,6	0,237	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,0 \pm 0,0	0,608	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,5 \pm 0,7	0,305	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,2 \pm 0,3	0,548	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,3 \pm 0,5	0,273	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-1,2 \pm 0,2	0,483	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,2 \pm 0,3	0,429	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	-1,6 \pm 0,5	0,145	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,5 \pm 0,4	0,089	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,1 \pm 0,1	0,741	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 \pm 0,2	0,212	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	241 \pm 267		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	10 \pm 34		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	171 \pm 37		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	133 \pm 35		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	324 \pm 158		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	112 \pm 17		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	319 \pm 108		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	21 \pm 13		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	63 \pm 53		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	92 \pm 104		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	12 \pm 6		<i>IXSSC</i>

Tabla 8. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes E y amastigotes (A). Para los controles positivos se detalla F de E/A y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; sólo hay expresión diferencial (sobre-expresión en amastigotes) del gen A2. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	<i>p</i>	Control positivo
cLin79A1	-1,3 \pm 0,4	0,163	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	-1,5 \pm 0,6	0,221	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	-1,5 \pm 0,6	0,237	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,0 \pm 0,0	0,608	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,5 \pm 0,7	0,305	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,2 \pm 0,3	0,548	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,3 \pm 0,5	0,273	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-2,4 \pm 0,0	0,000	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-2,0 \pm 0,2	0,021	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,8 \pm 0,7	0,347	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,2 \pm 0,3	0,381	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,0 \pm 0,1	0,610	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,0 \pm 0,0	0,595	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	31 \pm 42		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	24 \pm 18		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	155 \pm 107		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	387 \pm 65		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	119 \pm 34		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	96 \pm 77		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	140 \pm 174		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	182 \pm 80		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	53 \pm 44		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	31 \pm 24		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	13 \pm 7		<i>IXSSC</i>

Tabla 9. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de L y A. Para los controles positivos se detalla F de L/A y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la *t*, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; no hay expresión diferencial en L/A en ninguno de los genes control positivo, excepto el A2, sobre-expresado en amastigotes. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	<i>P</i>	Control positivo
cLin79A1	-2,6 \pm 2,0	0,177	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	-1,6 \pm 0,7	0,215	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	1,5 \pm 0,9	0,179	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,3 \pm 0,3	0,144	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,5 \pm 0,6	0,132	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,5 \pm 0,6	0,194	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,5 \pm 0,4	0,159	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-3,1 \pm 0,0	0,000	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-2,5 \pm 0,2	0,015	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	-1,6 \pm 0,5	0,145	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,5 \pm 0,4	0,089	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,1 \pm 0,1	0,741	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 \pm 0,2	0,212	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	86 \pm 29		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	14 \pm 21		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	93 \pm 60		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	105 \pm 44		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	56 \pm 38		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	305 \pm 69		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	109 \pm 22		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	26 \pm 18		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	154 \pm 75		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	46 \pm 24		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	11 \pm 8		<i>IXSSC</i>

Los clones que contienen genes diferencialmente expresados de función conocida, así como los correspondientes parámetros de expresión relativa, aparecen en la Tabla 10 en el caso de la comparación E/L, en la Tabla 11 para E/A y en la Tabla 12 para L/A. Las proteínas hipotéticas y los genes desconocidos aparecen en las Tablas A2, A4 y A6 y los clones no resueltos, bien porque no poseen ninguna secuencia que corresponda a las anotaciones del genoma del parásito, bien porque contengan más de una secuencia génica y/o uno de sus extremos no se haya secuenciado con éxito (clon de tipo *c*) y no se haya determinado mediante qRT-PCR qué gen/es está/n diferencialmente expresado/s, aparecen en la Tablas A3, A5 y A7. Se ha observado una mayor proporción de genes que codifican para proteínas hipotéticas que genes de función conocida sobre-expresados en el amastigote. Además, los clones que no contienen ninguna secuencia correspondiente a genes anotados indica que no han sido anotados todos los genes en el genoma de *L. infantum*.

Tabla 10. Genes de función conocida diferencialmente expresados en E/L. Los datos que se describen de cada clon son: número de clon; *fold change* o nivel de expresión diferencial (sobre-expresión si $F \geq 1,7$, sobre la línea divisoria, y sub-expresión si $F \leq -1,7$, bajo la línea divisoria); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); *p*, valor *p* del test de la *t* con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de *GenBank* GSS; valores *e* del alineamiento en *BLAST* de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (*Fw*) y *downstream* (*Rv*); Def., definición del clon según la exactitud de su ensamblaje y mapeo (*a*, *b* o *c*; sección 4.2.); anotaciones (identificadores *GeneDB*); las correspondientes funciones génicas; qRT-PCR, resultado del análisis por PCR cuantitativa relativa en tiempo real. *Cuando un clon solapa con más de una secuencia génica (indicado con asterisco en la columna *Clon*), se muestra sólo el resultado positivo de la qRT-PCR y no el del resto de los genes representados en el clon. (Comienza en la página siguiente).

Resultados

Continuación Tabla 11

Lin137D6	1,87	0,9 ± 0,0	0,004	GS882413	0	0	b	LinJ30_V3.3160	Proenzima de S-adenosil-metionina decarboxilasa (SAMDC)	+	5,8 ± 1,0
Lin139B3	3,13	1,3 ± 0,0	0,011	GS882414	0	0	b	LinJ16_V3.0470	Proteína ribosómica 60S L21, putativa (L21)	+	2,5 ± 0,4
Lin142E2*	2,55	1,4 ± 0,1	0,043	GS882415	0	0	c	LinJ21_V3.1290 LinJ21_V3.1300	Proteína ribosómica 60S L9, putativa (L9) 40S Proteína ribosómica S23, putativa (S23)	+	3,6 ± 0,5 6,8 ± 0,6
Lin146F6*	1,71	0,8 ± 0,1	0,049	GS882416	0	0	b	LinJ36_V3.4390	UDP-N-acetilglucosamina-doliquilfosfato-N-acetilglucosamina fosfotransferasa (UDP-NAGDPT)	+	56,1 ± 4,6
Lin148E9*	3,29	1,7 ± 0,0	0,004	GS882417	0	0	a	LinJ06_V3.0410	Proteína ribosómica 60S L19, putativa (L19)	+	3,3 ± 0,3
Lin149H2	3,12	1,6 ± 0,1	0,036	GS882418	0	0	b	LinJ20_V3.1210 LinJ20_V3.1220	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C2, putativa (C2cp) Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C2, putativa (C2cp)	N.D.	N.D.
Lin153B7*	3,15	1,7 ± 0,1	0,022	GS882419	0	0	b	LinJ21_V3.1790	Proteína ribosómica 40S S11, putativa (S11)	+	2,4 ± 0,1
Lin159D1*	2,35	1,2 ± 0,1	0,039	GS882420	0	0	b	LinJ01_V3.0430/40	Proteína ribosómica S7, putativa (S7)	+	6,3 ± 0,6
Lin183A2*	3,22	1,7 ± 0,1	0,031	GS882421	0	0	b	LinJ23_V3.0080	Proteína de tipo agmatinasa (agm)	+	5,9 ± 0,1
Lin193E6	4,28	2,1 ± 0,1	0,027	GS882423	0	0	b	LinJ23_V3.1230	SHERP	+	6,3 ± 0,5
Lin193F5*	1,75	0,8 ± 0,1	0,045	GS882424	0	0	b	LinJ36_V3.2070	Fosfomanomutasa, putativa (PMM)	+	7,1 ± 0,3
Lin196A12*	1,88	0,9 ± 0,0	0,018	GS882425	0	0	b	LinJ29_V3.1170/80	Proteína ribosómica L1a, putativa (L1a)	+	1,8 ± 0,1
Lin205H12*	3,99	2,0 ± 0,0	0,002	GS882426	0	0	b	LinJ32_V3.0930	Proteína ribosómica 60S L18a, putativa (L18a)	+	3,8 ± 0,5
Lin208G9*	1,92	0,9 ± 0,1	0,025	GS882427	2e-59	0	b	LinJ19_V3.0040	Histona H2B (H2B)	+	2,6 ± 0,2
Lin214D6*	3,07	1,6 ± 0,2	0,044	GS882428	0	0	b	LinJ19_V3.0050	Proteína ribosómica 40S S2, putativa (S2)	+	4,1 ± 0,4
Lin219A10*	1,89	0,9 ± 0,1	0,004	GS598961	0	0	b	LinJ05_V3.0040	Componente del vástago paraflagelar par4, putativa (PAR4)	+	11,0 ± 2,3
Lin228A12	1,78	0,8 ± 0,1	0,037	GS882429	0	0	b	LinJ19_V3.0710	Malato deshidrogenasa glicosomal (gMDH)	+	2,2 ± 0,3
Lin239A10	1,94	1,0 ± 0,0	0,040	GS882430	0	0	a	LinJ30_V3.3650 LinJ24_V3.2340	Proteína ribosómica 40S S14 (S14) Ácido graso desaturasa, putativa	+	4,5 ± 0,3 8,2 ± 1,0
Lin11D7	-2,53	-1,3 ± 0,3	0,020	GS598854	0	0	b	LinJ31_V3.0460	Amastina, putativa	N.D.	N.D.
Lin22E12	-2,79	-1,5 ± 0,1	0,001	GS598856	0	0	b	LinJ31_V3.1850	Aminoácido permeasa (aap)	N.D.	N.D.
Lin25C5*	-2,39	-1,3 ± 0,1	0,023	GS882431	0	0	b	LinJ07_V3.0360	Proteína de síntesis de fosfatidilglicerofosfato (PLD)	+	-6,3 ± 0,2
Lin26B8	-2,19	-1,1 ± 0,0	0,013	GS882432	4e-162	9e-37	b	LinJ29_V3.2850	Proteína de tipo actina, putativa (Actin)	N.D.	N.D.
Lin35E9	-3,63	-1,9 ± 0,1	0,014	GS882433	0	0	b	LinJ17_V3.1520	Cisteína peptidasa otubaina, Clan CA, familia C65, putativa	+	-13,9 ± 0,4
Lin36B8	-1,99	-1,0 ± 0,2	0,015	GS598859	0	0	b	LinJ30_V3.3230	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, putativa (HMGR)	N.D.	N.D.
Lin48F2	-2,61	-1,4 ± 0,0	0,012	GS882434	0	0	a	LinJ31_V3.2590 LinJ31_V3.2600	Proteína de tipo ferredoxina, 2Fe-2S (Fd) Proteína de tipo ferredoxina, 2Fe-2S (Fd)	N.D.	N.D.
Lin62D3*	-1,92	-0,9 ± 0,4	0,040	GS598862	0	0	b	LinJ05_V3.0350	Trianpotión reductasa (TR)	+	-25,7 ± 1,4
Lin76D1	-4,41	-2,1 ± 0,3	0,054	GS882435	0	0	b	LinJ08_V3.0520	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa, putativa (PRPPS)	N.D.	N.D.
Lin83D1	-2,36	-1,2 ± 0,1	0,049	GS882309	0	0	b	LinJ08_V3.0700/10	Proteína de tipo amastina	N.D.	N.D.
Lin103F1	-1,83	-0,9 ± 0,0	0,004	GS882436	0	0	a	LinJ35_V3.3080	Carboximetiltransferasa específica de proteína prenilada, putativa (isoprenilcisteína metiltransferasa, ICMT)	N.D.	N.D.
Lin113C3	-1,87	-0,9 ± 0,1	0,040	GS598876	3e-74	0	a	LinJ14_V3.1440 LinJ14_V3.1450	Transportador de pteridina (PT3) Mio-inositol-1-fosfato sintasa (INO1)	+	-3,4 ± 0,2 -6,4 ± 0,2
Lin123H10*	-1,81	-0,9 ± 0,1	0,035	GS882437	0	0	b	LinJ30_V3.1520	P1/S1 nucleasa (P1/S1)	+	-3,0 ± 0,1
Lin124C1*	-1,72	-0,8 ± 0,1	0,003	GS882438	4e-159	9e-111	c	LinJ16_V3.0550	Aspartato carbamoiltransferasa, putativa (AspCT)	+	-4,3 ± 0,6
Lin142D7	-1,87	-0,9 ± 0,1	0,033	GS882439	0	0	a	LinJ36_V3.6760	Homólogo de MAPK (MAPKh)	N.D.	N.D.
Lin165E2	-3,48	-1,8 ± 0,2	0,004	GS598885	0	0	b	LinJ22_V3.0680	Proteína 3'a2rel (3'a2rel)	+	-9,3 ± 0,5
Lin197A12	-1,95	-1,0 ± 0,2	0,016	GS598890	0	0	a	LinJ31_V3.2540	Lipasa, putativa (TGL)	N.D.	N.D.
Lin201F12*	-1,79	-0,8 ± 0,0	0,018	GS882440	0	0	c	LinJ29_V3.1370	Proteína de dominio lipasa, putativa (TGL)	+	-2,6 ± 0,3
Lin210C4	-2,09	-1,1 ± 0,0	0,013	GS598893	0	0	b	LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina	N.D.	N.D.
Lin234D7	-1,93	-1,0 ± 0,0	0,005	GS882441	9e-151	2e-118	b	LinJ11_V3.1220 LinJ11_V3.1230	Proteína de tipo transportador ABC (ABC) Transportador ABC1, putativo (ABC1)	+	-3,4 ± 0,2 -4,1 ± 0,1
Lin238D6	-2,34	-1,2 ± 0,1	0,041	GS882442	0	0	a	LinJ30_V3.1820	Factor de <i>splicing</i> 3A, putativo (Sf3A)	N.D.	N.D.
Lin254D11	-2,30	-1,2 ± 0,1	0,041	GS882443	7e-59	0	b	LinJ11_V3.1250	Proteína de tipo transportador ABC (ABC)	N.D.	N.D.
Lin264E5*	-1,73	-0,8 ± 0,1	0,044	GS882444	0	0	a	LinJ32_V3.1080	Proteína quinasa, putativa	+	-5,0 ± 0,5
Lin267D9*	-2,06	-1,0 ± 0,2	0,010	GS598898	9e-111	0	b	LinJ16_V3.0590	Carbamoil fosfato sintetasa (CPS)	+	-2,9 ± 0,4
Lin294A10	-1,89	-0,9 ± 0,0	0,004	GS882445	0	0	a	LinJ35_V3.1420	Treonil-ARNt sintetasa, putativa (^{Thr} tS)	N.D.	N.D.
Lin298D3	-4,39	-2,1 ± 0,0	0,009	GS882446	0	0	a	LinJ17_V3.1520	Cisteína peptidasa otubaina, Clan CA, familia C65, putativa	+	-13,9 ± 0,4
Lin310F2	-2,34	-1,2 ± 0,5	0,046	GS598904	0	0	b	LinJ23_V3.1220	Proteína hidrofílica de superficie (HASPB)	N.D.	N.D.
cLinA2	-2,45	-1,3 ± 0,0	0,000	S69693	-	-	-	-	Gen A2 de <i>L. infantum</i> – punto control en los <i>microarrays</i> de ADN	X	X
cLinA2	-2,01	-1,0 ± 0,1	0,021	-	-	-	-	-	Gen A2 de <i>L. donovani</i> – punto control en los <i>microarrays</i> de ADN	X	X

4.3.2. Genes diferencialmente expresados en el ciclo biológico de *L. infantum*.

Una primera aproximación al perfil de expresión génica la proporciona el análisis de términos de procesos biológicos y funciones moleculares de la base de datos GO, que constituyen una nomenclatura controlada. Este análisis funcional se ha realizado mediante el programa informático *BLAST2GO*, con el que se obtienen grafos acíclicos dirigidos (DAG), que relacionan los términos de funciones moleculares y procesos biológicos que se encuentran en el conjunto de genes analizado, así como su representatividad, que está definida por el valor α , caracterizado por la combinación del número de secuencias correspondientes a un nodo y la suma de las distancias entre los términos de GO originales de dichas secuencias (Conesa y col., 2005). Los procesos biológicos y las funciones moleculares más relevantes en función de α se pueden representar en diagramas de sectores circulares.

Resultados

Continuación Tabla 12

Lin226A10*	2,09	1,1 ± 0,2	0,018	GS882510	0	0	b	LinJ26_V3.0160	Proteína ribosómica 60S L7, putativa (L7)	+	8,8 ± 2,0
Lin226F1	5,60	2,5 ± 0,5	0,011	GS882511	0	0	b	LinJ31_V3.1660	Proteína putativa de tipo 3-cetoacil-CoA tiolasa (Tiol I)		N.D.
Lin226F2	2,07	1,0 ± 0,3	0,021	GS882512	0	0	b	LinJ05_V3.0420	Cadena ligera de la dineína, putativa (DLC)		N.D.
Lin228D4*	2,27	1,2 ± 0,4	0,031	GS882513	0	0	a	LinJ19_V3.0090	Fibrilarina, putativa (Fibril)	+	13,7 ± 0,1
Lin231A5	2,89	1,5 ± 0,5	0,030	GS882514	0	0	b	LinJ35_V3.1310	Proteína conjugante de ubiquitina E2, putativa (UBC2)		N.D.
Lin231E8*	2,03	1,0 ± 0,1	0,005	GS882515	0	0	b	LinJ16_V3.0600	Histona H3, putativa (H3)	+	2,0 ± 0,2
Lin236H2	3,45	1,8 ± 0,4	0,014	GS882516	0	1e-147	b	LinJ29_V3.1860	Histona H2A, putativa (H2A)		N.D.
								LinJ29_V3.1870	Histona H2A, putativa (H2A)		N.D.
Lin237D5	2,72	1,4 ± 0,3	0,016	GS882517	0	0	b	LinJ22_V3.1300	Ciclofilina, putativa (Cph)		N.D.
Lin239H2*	4,20	2,1 ± 0,3	0,005	GS882518	0	0	b	LinJ30_V3.0800	Proteína de síntesis de 4-metil-5(β-hidroxi-etil)-tiazol monofosfato, putativa (MPETs)	+	35,0 ± 1,9
Lin241B10	2,15	1,1 ± 0,1	0,003	GS882519	0	0	b	LinJ34_V3.2420	Cadena 3 de la subunidad media del complejo adaptador, putativa (Apex3)		N.D.
Lin276F6	2,54	1,3 ± 0,2	0,009	GS882520	0	0	b	LinJ35_V3.2370	Proteína quinasa, putativa (PK)		N.D.
Lin276F9*	2,44	1,3 ± 0,2	0,006	GS882521	0	-	c	LinJ24_V3.2230	Proteína ribosómica 60S L12, putativa (L12)	+	1,8 ± 0,1
Lin277E3	2,28	1,2 ± 0,4	0,035	GS882522	0	0	b	LinJ36_V3.0590	Proteína de tipo ubiquitina, putativa (ubq)	+	2,4 ± 0,3
								LinJ36_V3.0600	Quinasa relacionada a cdc2 (cdc2)	+	3,0 ± 0,5
Lin280E9*	2,41	1,3 ± 0,2	0,011	GS882523	0	0	a	LinJ31_V3.1600	Subunidad VIII de la citocromo c oxidasa, putativa (cox VIII)	+	2,7 ± 0,2
Lin282B6	3,14	1,6 ± 0,3	0,008	GS882524	0	0	b	LinJ03_V3.0960	Subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción (IF2α)		N.D.
Lin288C8*	2,23	1,2 ± 0,2	0,006	GS882525	0	-	c	LinJ27_V3.1120	Histona H1, putativa (H1)	+	14,7 ± 0,5
Lin294C9	4,26	2,1 ± 0,5	0,020	GS882525	0	1e-82	a	LinJ04_V3.0330	Factor de ribosilación de ADP (ADPrf)		N.D.
Lin295C8*	2,02	1,0 ± 0,3	0,030	GS882526	0	0	b	LinJ31_V3.2070	Proteína de fusión ubiquitina (ubq)	+	4,9 ± 0,2
Lin301B5	3,68	1,9 ± 0,7	0,041	GS882527	0	0	b	LinJ18_V3.1010	Cadena ligera de la dineína 2b, citoplásmica, putativa (Dyn2bLC7)		N.D.
Lin309E11	2,74	1,5 ± 0,5	0,031	GS882528	0	0	b	LinJ20_V3.1220	Cisteína peptidasa, Clan A, familia C2, putativa (C2cp)		N.D.
Lin241H6	2,67	1,4 ± 0,4	0,031	GS882529	0	0	b	LinJ33_V3.3380	Proteína ribosómica 60S L44, putativa (L44)	+	3,5 ± 0,1
								LinJ33_V3.3390	Proteína de tipo histona H1 (H1)	+	1,9 ± 0,1
Lin249D12*	2,57	1,4 ± 0,1	0,002	GS882530	-	0	c	LinJ26_V3.0160	Proteína ribosómica 60S L7, putativa (L7)	+	6,0 ± 0,3
Lin251A8	2,12	1,1 ± 0,2	0,011	GS882531	0	0	b	LinJ23_V3.0860	Proteína de tipo 3-cetoacil-CoA tiolasa (Tiol I)		N.D.
Lin253A10*	2,85	1,5 ± 0,2	0,007	GS882532	0	0	c	LinJ04_V3.0460	Proteína ribosómica 60S L11 (L11)		N.D.
								LinJ06_V3.1330	Coproporfirínogeno III oxidasa, putativa (C(III)O)	+	3,2 ± 0,2
								LinJ06_V3.1340	Proteína de tipo protoporfirínogeno oxidasa (PO)	+	6,7 ± 0,2
Lin256B3	2,50	1,3 ± 0,2	0,005	GS882533	2e-31	0	a	LinJ35_V3.0670	Proteína con dedo RING, putativa		N.D.
Lin260G2	2,24	1,2 ± 0,4	0,045	GS882534	0	4e-156	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido Δ4-desaturasa, putativa		N.D.
Lin265E2	2,29	1,2 ± 0,2	0,008	GS882535	9e-154	0	b	LinJ29_V3.1880	Proteína del vástago paraflagelar 1D, putativa (PFR1D)	+	15,2 ± 0,7
Lin268E7	3,62	1,9 ± 0,4	0,014	GS882536	0	0	b	LinJ27_V3.0300	Proteína portadora de acilo, putativa (ACP)		N.D.
Lin270A3*	3,08	1,6 ± 0,6	0,041	GS882537	0	0	b	LinJ23_V3.0060	Peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa, putativa (FKBP)	+	2,5 ± 0,1
								LinJ23_V3.0080	Proteína de tipo agmatinasa (agm)	+	3,3 ± 0,0
Lin11D7	-2,53	-1,3 ± 0,3	0,020	GS882538	0	0	b	LinJ31_V3.0460	Amastina, putativa		N.D.
Lin12D9	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,026	GS882539	0	0	b	LinJ27_V3.1900	Proteína de división celular FtsJ, putativa		N.D.
Lin25B12*	-1,88	-0,9 ± 0,3	0,038	GS882540	0	-	c	LinJ29_V3.2310	Proteína de unión a GTP, putativa	+	-15,3 ± 1,1
Lin26B8	-2,10	-1,1 ± 0,2	0,009	GS882541	6e-158	5e-35	b	LinJ29_V3.2850	Proteína de tipo actina, putativa		N.D.
Lin130C5	-18,35	-4,2 ± 1,3	0,028	GS882542	0	0	a	LinJ36_V3.4270	Proteína de tipo fosfoglicerato mutasa (PGM)		N.D.
Lin142C1*	-1,72	-0,8 ± 0,1	0,003	GS882438	4e-159	9e-111	c	LinJ16_V3.0550	Aspartato carbamoil transferasa, putativa (AspCT)	+	-3,6 ± 0,4
Lin239B8	-1,82	-0,9 ± 0,3	0,032	GS882543	4e-162	6e-112	b	LinJ32_V3.1080	Proteína quinasa, putativa (PK)	+	-2,8 ± 0,5
Lin245E2	-2,03	-1,0 ± 0,3	0,032	GS882544	0	0	b	LinJ22_V3.0680	Proteína 3'a2rel (3'a2rel)		N.D.
Lin247B12	-1,82	-0,9 ± 0,2	0,017	GS882545	0	2e-121	b	LinJ12_V3.0690	Precursor del antígeno de superficie 2 (SALp2)		N.D.
Lin254D11	-2,49	-1,3 ± 0,3	0,020	GS882546	0	0	b	LinJ11_V3.1250	Proteína de tipo transportador ABC (ABC)		N.D.
Lin259H9*	-2,34	-1,2 ± 0,4	0,036	GS882547	0	1e-168	c	LinJ29_V3.1370	Proteína con dominio lipasa, putativa (TGL)	+	-1,9 ± 0,1
Lin298D3	-2,13	-1,1 ± 0,4	0,049	GS882548	0	0	a	LinJ17_V3.1520	Cisteína peptidasa otubaina, Clan CA, familia 65, putativa		N.D.
cLinA2	-3,11	-1,3 ± 0,0	0,000	S69693	-	-	-	-	Gen A2 de <i>L. infantum</i> – punto control en los <i>microarrays</i> de ADN		X
cLdoA2	-2,54	-1,0 ± 0,1	0,015	-	-	-	-	-	Gen A2 de <i>L. donovani</i> – punto control en los <i>microarrays</i> de ADN		X

En este caso, se presentan diagramas mixtos o multinivel, ya que en ellos aparecen representados nodos de diferentes niveles de concreción funcional en los DAGs. En los diagramas de sectores circulares para los perfiles de expresión E/L, E/A y L/A (Figura 24-26) se puede observar la sobre-expresión de actividades relacionadas con la regulación de la expresión génica, como la biogénesis de los ribosomas y la traducción en promastigotes con respecto a amastigotes, sobre todo en la fase estacionaria. Estos términos de procesos biológicos están relacionados con las funciones moleculares de constitución estructural de los ribosomas y unión al ARN. En los estadios en división (promastigotes en fase logarítmica y amastigotes) se sobre-expresan genes relacionados con procesos biosintéticos celulares y otros procesos metabólicos.

La Figura 27 ilustra el perfil de expresión génica de los promastigotes y los amastigotes (E/L, E/A y L/A) y la localización de las proteínas correspondientes en la membrana plasmática, las vías de expresión génica y de secreción y algunos procesos metabólicos y de señalización intracelular. De esta representación se excluyen las proteínas hipotéticas y desconocidas y, obviamente, los clones en los que no se ha localizado ninguna anotación génica. Los genes con función conocida se pueden agrupar en los procesos que se describen a continuación.

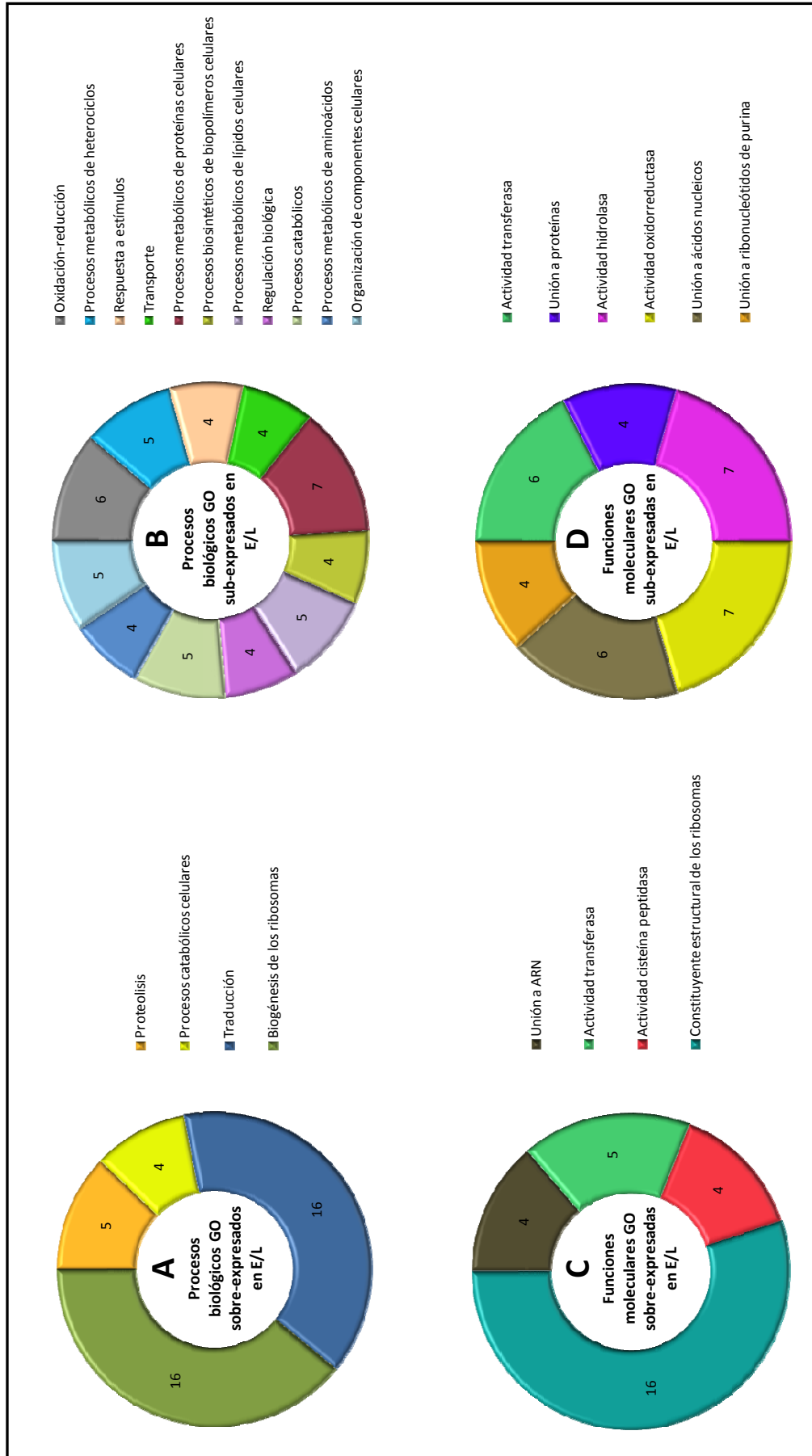


Figura 24. Diagramas multinivel de sectores circulares de la puntuación α para los términos GO anotados en los genes diferencialmente expresados en E/L. (A) Procesos biológicos anotados en genes sobre-expresados en E/L. (B) Procesos biológicos anotados en genes sub-expresados en E/L. (C). Funciones moleculares anotadas en genes sobre-expresados en E/L. (D). Funciones moleculares anotadas en genes sub-expresados en E/L.

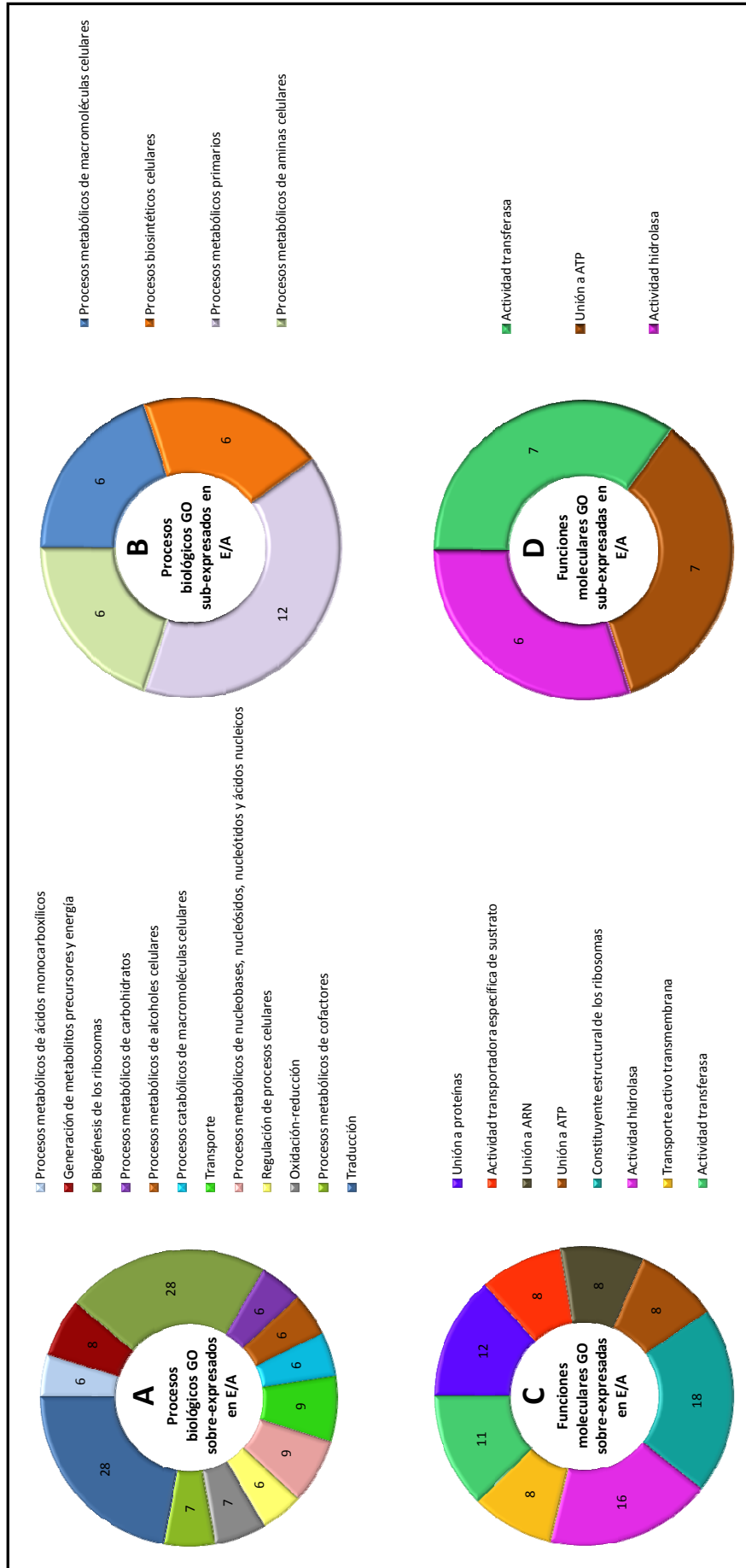


Figura 25. Diagramas multinivel de sectores circulares de la puntuación α para los términos GO anotados en los genes diferencialmente expresados en E/A. (A) Procesos biológicos anotados en genes sobre-expresados en E/A. (B) Procesos biológicos anotados en genes sub-expresados en E/A. (C) Funciones moleculares anotadas en genes sobre-expresados en E/A. (D) Funciones moleculares anotadas en genes sub-expresados en E/A.

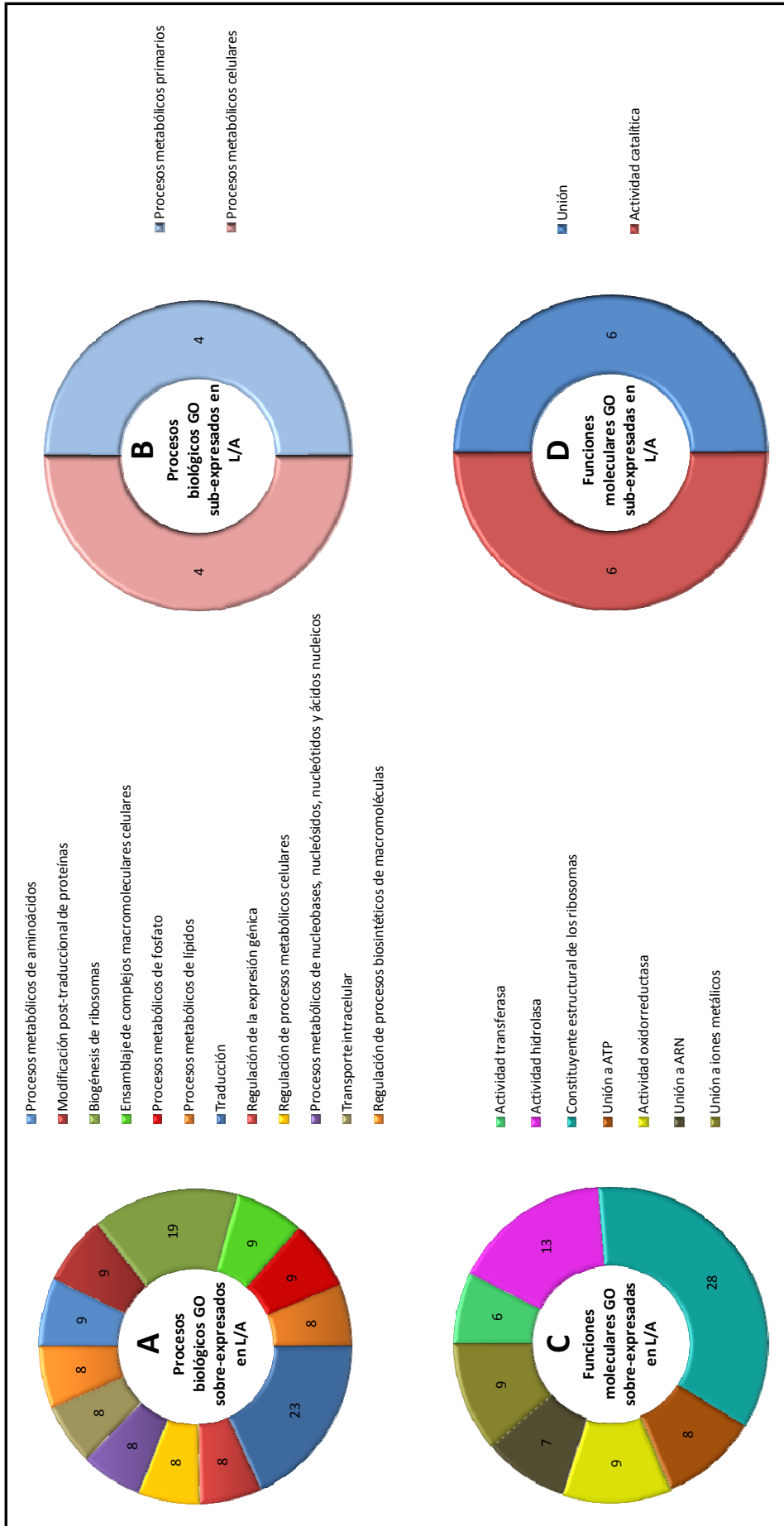


Figura 26. Diagramas multinivel de sectores circulares de la puntuación α para los términos GO anotados en los genes diferencialmente expresados en L/A. (A) Procesos biológicos anotados en genes sobre-expresados en L/A. (B) Procesos biológicos anotados en genes sub-expresados en L/A. (C) Funciones moleculares anotadas en genes sobre-expresados en L/A. (D) Funciones moleculares anotadas en genes sub-expresados en L/A.

Resultados

4.3.2.1. Cromatina, epigenética, replicación del ADN y metabolismo de nucleótidos.

Se ha detectado expresión diferencial de genes de todas las familias de histonas. Los genes H1 (LinJ27_V3.1120 y LinJ33_V3.3390), H2A (LinJ29_V3.1860/70), H3 (LinJ16_V3.0600) y H4 (36_V3.0020), junto con la histona deacetilasa (H-deAc) están sobre-expresados en L/A. Otros muestran diferentes patrones de regulación: los genes H1 LinJ27_V3.1070, H3 LinJ10_V3.1070 y H4 LinJ31_V3.3320 están sub-expresados en E/L y H2B LinJ19_V3.0040 y LinJ28_V3.0210 están sobre-expresados en E/A. La proteína 3 de mantenimiento estructural de los cromosomas (*smc3*), relacionada con la organización de los cromosomas durante la división celular, está sub-expresada en E/L. En cuanto a la replicación del ADN, se ha detectado la sobre-expresión en E/A de una proteína del complejo de mantenimiento de minicromosomas (*mmc*), que participa en la iniciación de la replicación. También se ha hallado la sub-expresión en E/L de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa I α (*cADNPol I α B*) y la proteína D de la ADN polimerasa mitocondrial I (*mPol ID*). Además, *mPol ID* está sobre-expresada en L/A y en consecuencia, sus mayores niveles de transcritos se alcanzan en los promastigotes en fase logarítmica. La nucleósido difosfato quinasa b (*Ndkb*), que contiene dominios adenosina quinasa, está sobre-expresada en el nivel de transcrito en E/A. Otro gen relacionado con el metabolismo de nucleótidos que está diferencialmente expresado es el de la fosforribosil pirofosfato sintetasa (*PRPPS*), que en concreto está sub-expresado en E/A.

Dos genes de la 3'-nucleotidasa/nucleasa (3'NT/Nasa) posicionados en tándem en el cromosoma 31 están sobre-expresados en E/A. Mediante diferentes parejas de oligonucleótidos empleadas en el análisis de qRT-PCR de los genes 3'NT/Nasa, se ha determinado que ambos presentan tal patrón de regulación diferencial. El diseño de los oligonucleótidos para diferenciarlos se realizó gracias a los alineamientos de ambos genes con *CLUSTALW* (Figura A1). Las 3'NT/Nasas son esenciales para el parásito, puesto que no es capaz de sintetizar nucleótidos purínicos *de novo*. Están localizadas en la membrana plasmática y podrían participar en la adquisición de nucleótidos purínicos y ácidos nucleicos, siendo sustratos de las mismas los 3'-ribonucleótidos (3'-AMP y 3'-IMP) (Sacci y col., 1990; Gbenle, 1993; Debrabant y col., 2001).

4.3.2.2. Expresión génica, modificación de proteínas y vías de secreción.

Se han hallado cuatro genes relacionados con procesos transcripcionales o post-transcripcionales que están diferencialmente expresados: la subunidad 9 de la ARN polimerasa II, que está sub-expresada en E/L; el factor de *splicing* de ARN pequeño nuclear U5 (*ARNsn-U5-sf*), que está sobre-expresado en E/L; un componente de la ribonucleoproteína pequeña nucleolar (*snRNP*), que está sobre-expresado en L/A; y el factor de *splicing* 3A, sub-expresado en L/A. En el nivel traduccional, se ha hallado la sobre-expresión de 16 genes constituyentes del ribosoma (proteínas ribosómicas de la subunidad 40S S2, S3, S4, S11, S12, S29; proteínas ribosómicas de la subunidad 60S L7, L11, L12, L18, L19, L31, L36, L38, L44) y 4 genes que codifican para factores de iniciación de la traducción (*eIF2*, *eIF2 α* , *eIF3s8* y *eIF5a*) que están sobre-expresados en L/A. También se han hallado genes sobre-expresados en E/A y en E/L relacionados con funciones traduccionales, en concreto 12 (proteínas ribosómicas 40S S2, S3a, S4, S6, S18 y S27-1; proteínas ribosómicas 60S L1a, L3, L5, L14 y L32; y la proteína ribosómica acídica P2) y 23 (proteínas ribosómicas 40S S2, S3, S3a, S4, S7, S11, S14, S15a, S23, S24 y S29; proteínas ribosómicas 60S L1a, L2, L3a, L6, L7, L9, L13a, L18, L18a, L19, L21 y L31) respectivamente. Sin embargo, entre ellos no figura ninguno de los anteriores factores de traducción, apareciendo otros distintos que están sub-expresados en E/L: un factor de iniciación (*eIF*) y una proteína

de unión a GTP de la familia de los factores de elongación Tu (EF-Tu). En resumen, numerosos genes que codifican para constituyentes de los ribosomas y factores traduccionales presentan niveles inferiores de transcritos en el amastigote que en el promastigote.

Otro proceso importante de regulación de la expresión en tripanosomátidos es la degradación de transcritos (revisado por Clayton y Shapira, 2007). A este nivel, se ha detectado la sub-expresión en amastigotes (sobre-expresión en E/A y L/A) del gen de la endorribonucleasa L-PSP (pb5). El gen de la P1/S1 nucleasa presenta un patrón contrario, al estar sub-expresado en E/A. Además, algunas secuencias de minicírculos parecen estar sobre-expresadas en estadios diferenciados: en amastigotes (Tabla A8) y, como se verá más adelante, en promastigotes metacíclicos (sección 4.4.2.9.).

En cuanto al plegamiento de las proteínas, las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas previenen la agregación de dominios adenosina quinasa (Sen y col., 2007), y por lo tanto, de proteínas como Ndkb. Además, aceleran el plegamiento catalizando la isomerización *cis-trans* de enlaces peptídicos imídicos de prolina en oligopéptidos (Chakraborty y col., 2004). Proteínas de este tipo son las ciclofilinas (Cph) y las proteínas de unión a FK-506 (FKBP). Una Cph y dos FKBP están sobre-expresadas en L/A.

En la ruta de síntesis de oligosacáridos anclados a dolicol para la posterior glicosilación de las proteínas, el gen de la UDP-N-acetilglucosamina:doliquil-fosfato N-acetilglucosamina fosfotransferasa (UDP-NAGDPT) (EC 2.7.8.15) está sobre-expresado en L/A y E/A. Dos genes indirectamente relacionados con la glicosilación están también diferencialmente regulados: la fosfomanomutasa (PMM) está sobre-expresada en E/A; y la glucosa-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNAT) está sobre-expresada en E/A y sub-expresada en E/L. Además, la N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol de-N-acetilasa (NAGPID) está sobre-expresada en L/A en el nivel de transcrito. La NAGPID cataliza la segunda reacción de la biosíntesis del GPI en todos los eucariotas (Doering y col., 1989), el cual en el caso de *Leishmania* se encarga de anclar el LPG, entre otras moléculas (revisado por Ilgoutz y McConville, 2001). De hecho, el gen *lpg2*, codificante de una proteína de biosíntesis del LPG, está sobre-expresado en L/A. Otro gen que participa en la maduración de las proteínas cuya expresión diferencial se ha detectado es la subunidad α de la farnesiltransferasa (FNTA), concretamente su sub-expresión en E/L. Por su parte, la isoprenilcisteína metiltransferasa (ICMT) está sobre-expresada en E/A en el nivel de transcrito.

En cuanto al recubrimiento de vesículas, se han hallado diferentes genes con distinto patrón de expresión: por un lado, el gen de la syntaxina (Sx) está sub-expresado en E/L; y por otro, el gen de la cadena pesada de la clatrina (Clatrina-H), el de la cadena 3 de la subunidad media del complejo adaptador (Apcx3) y el de la proteína de membrana asociada a vesículas (*vamp*) están sobre-expresados en L/A. *vamp* también está sobre-expresado en E/A; además, está sub-expresado en E/L.

4.3.2.3. Metabolismo de hexosas, fosforilación oxidativa y transporte.

Dos genes que están posicionados en tándem en el cromosoma 36 que codifican para transportadores de glucosa (GT) están sobre-expresados en E/L, E/A y L/A, alcanzándose así los mayores niveles de expresión en los promastigotes en fase estacionaria. En la glucólisis, la fructosa-1,6-difosfato aldolasa (ALD) y la fosfoglicerato mutasa independiente de regulación alostérica por 2,3-difosfoglicerato (PGM^{BPI}) están sobre-expresadas en E/A, al igual que la malato deshidrogenasa glicosomal (gMDH), que se encarga de proporcionar NAD⁺ para la reacción glucolítica de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), entre otras. Por otro lado, se ha hallado la sub-expresión en L/A de otra PGM que es independiente de regulación por catabolito.

Resultados

En cuanto al ciclo de Krebs, la succinil-CoA ligasa formadora de GDP (SCL) está sobre-expresada en E/A. La proteína de síntesis de 4-metil-5(β -hidroxietil)tiazol monofosfato (MPETS) está sobre-expresada en L/A y sub-expresada en E/L. Este gen se requiere para la síntesis de tiamina pirofosfato (TPP), un importante cofactor del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH). La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal (gPEPCK) está sobre-expresada en E/L. Además, dos genes relacionados con la glucogenosíntesis están sobre-expresados en E/A, concretamente la fosfoglucomutasa (PGluM) y la glucógeno sintasa quinasa (GSK).

Las translocasas de ADP/ATP de la membrana interna mitocondrial ANC1 y ANC2 están sobre-expresadas en L/A. Dichas translocasas, participan en el transporte de ATP al interior de la mitocondria y del ADP en sentido contrario (Cozens y col., 1989). Además, dos genes no ligados de la subunidad 9 de la ATPasa (F_0s9) están sobre-expresados en L/A. El análisis realizado con *BLAST2GO* ha dado como resultado la anotación en ambas secuencias génicas del término de GO de función biológica de transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP, así como de la función molecular relacionada de actividad ATP sintasa acoplada al transporte de hidrogeniones por mecanismo rotacional. Estas secuencias también están asociadas a los términos de las bases de datos de dominios PFAM e InterPro subunidad C de la ATP sintasa y subunidad C del complejo F_0 ATPasa. Esta subunidad está incluida en el complejo ATP sintasa y contribuye a la biosíntesis del ATP por rotación propiciada por el gradiente de potencial electroquímico de protones. Por lo tanto, ambos genes F_0s9 están relacionados con la síntesis de ATP acoplada a la cadena de transporte de electrones, de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica. Tres componentes del complejo III de la cadena de transporte de electrones también están diferencialmente expresados a lo largo del ciclo biológico del parásito: las subunidades V y VIII de la citocromo c oxidasa (coxV y coxVIII) están sobre-expresadas en L/A; coxV está sub-expresado en E/L y coxVI está sobre-expresado en E/A.

También se ha hallado la regulación diferencial de la expresión de otras ATPasas y de transportadores de la superfamilia de proteínas con casete de unión a ATP (ABC). En concreto, dos genes de ATPasa están sobre-expresados en L/A: una ATPasa de tipo AFG1 y otra de tipo P con motivo de unión a calcio (Ca^{2+} -ATPasa). La Ca^{2+} -ATPasa está sobre-expresada también en E/A y pertenece a la superfamilia de tipo P o E1-E2 de enzimas transportadoras de cationes y se encuadra en el grupo de los transportadores de Ca^{2+} (Fagan y Saier, 1994). En cuanto a los transportadores ABC, Se ha detectado la expresión diferencial de seis genes: un transportador ABC/proteína de resistencia a múltiples drogas/glicoproteína P (MRP) está sobre-expresado en L/A; dos genes de proteínas de resistencia a estibogluconato sódico (SbGRP) están sub-expresados en E/L y uno de ellos está sobre-expresado en E/A; y tres genes de tipo transportador ABC que mapean en tándem en el cromosoma 11 y están sub-expresados en E/A y uno de ellos en L/A.

Otros tipos de transportadores están también diferencialmente regulados en cuanto a su expresión en el ciclo biológico del parásito. En primer lugar, una pirofosfatasa translocadora de protones de tipo vacuolar (vH^+ -PPasa) está sobre-expresada en E/A y participa en el establecimiento del gradiente de potencial de protones entre el lumen vacuolar y el citosol. La subunidad Tim17 del complejo pre-proteína translocasa de la membrana interna mitocondrial está sobre-expresado en L/A. La 3'NT/Nasa está sobre-expresada en E/A (sección 4.3.2.1.). Y finalmente, la aminoácido permeasa LinJ31_V3.1850 (aap) está sobre-expresada en E/L y sub-expresada en E/A.

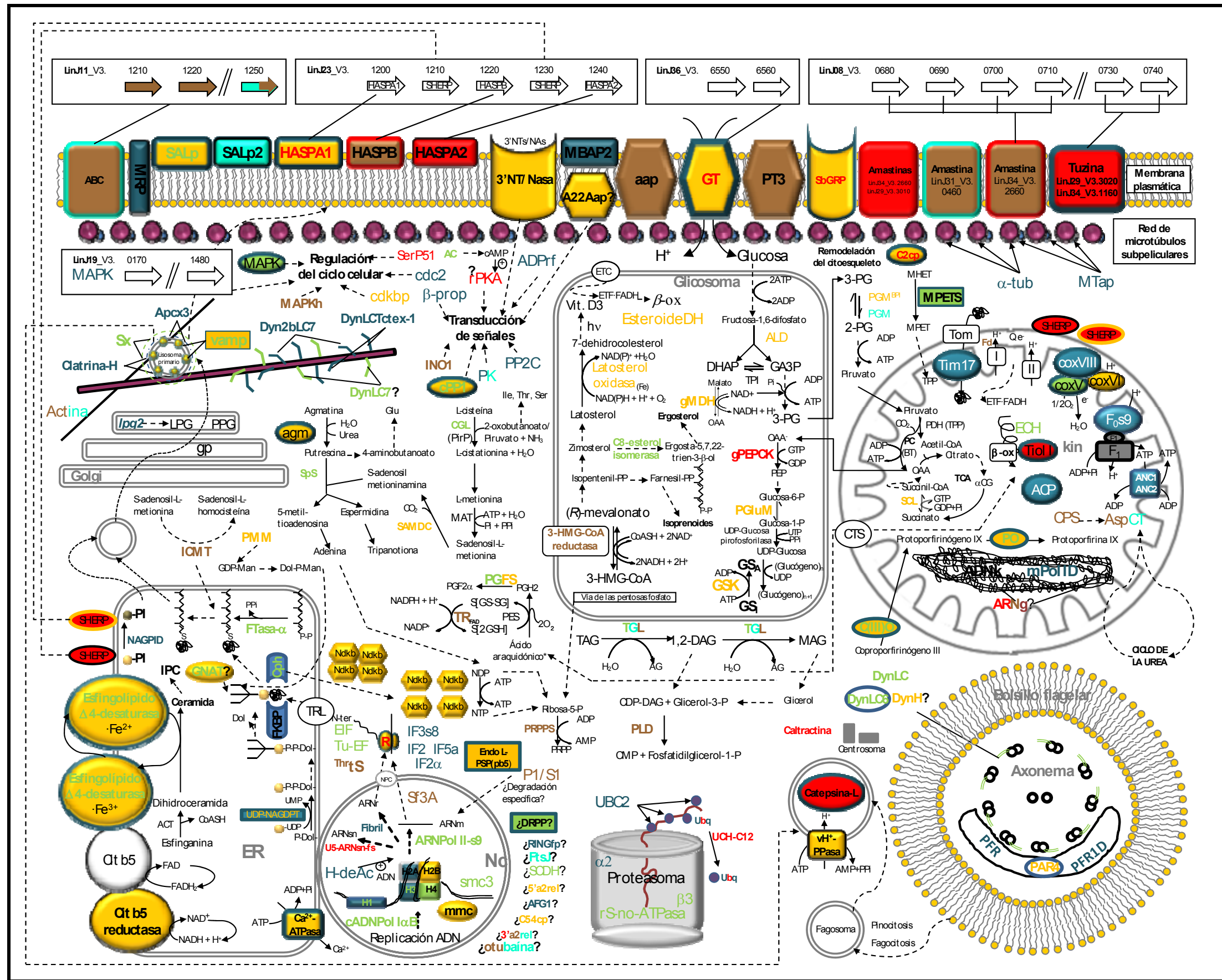


Fig. 27. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial de E/L, E/A y L/A. Leyenda: genes sub-expresados en E/L; genes sobre-expresados en E/L; genes sobre-expresados en E/A; genes sub-expresados en E/A; genes sub-expresados en L/A; genes sobre-expresados en L/A.

Como resumen de esta sección, varios genes glucolíticos y de la glucogenosíntesis están sobre-expresados en E/A, gPEPCK está sobre-expresado en E/L y algunos genes relacionados con la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena de transporte de electrones están sobre-expresados en L/A. Por otra parte, en los amastigotes se sobre-expresa un *cluster* de transportadores ABC y se sub-expresan los genes SbGRP y MRP de la misma superfamilia.

4.3.2.4. Biosíntesis de porfirinas.

El grupo hemo participa en muchas reacciones de transporte de electrones, ya que es un grupo prostético de los citocromos, incluyendo el citocromo b5, que participa en procesos redox en el RE liso en procesos de insaturación de AG. Sin embargo, los parásitos del género *Leishmania* son auxotrofos para las porfirinas, ya que carecen de la maquinaria enzimática completa para sintetizar *de novo* el grupo hemo, apareciendo en el genoma los genes de las tres últimas enzimas de la misma: la coproporfirinógeno III oxidasa (C(III)O, LinJ06_V3.1330), la protoporfirinógeno oxidasa (PO, LinJ06_V3.1340) y la ferroquelatasa (LinJ17_V3.1580). Los promastigotes indiferenciados sobre-expresan los genes C(III)O y PO, ya que se han detectado como sobre-expresados en los experimentos de expresión E/A y L/A, y sub-expresados en E/L.

4.3.2.5. Metabolismo de aminoácidos y poliaminas y homeostasis redox.

La cistationina γ -liasa (CGL), que participa en el metabolismo de los aminoácidos Cys, Ile, Thr y Ser, está sub-expresada en E/L. El producto de la reacción de CGL L-cistationina conecta con el metabolismo de la metionina, en el cual la S-adenosil-L-metionina decarboxilasa (SAMDC) está sobre-expresada en el nivel de transcrito. La SAMDC es responsable de la reacción limitante de decarboxilación de la S-adenosil-metionina a S-adenosil-metioninamina en la ruta biosintética de poliaminas en mamíferos y nematodos (Da'dara y Walter, 1998). Además, el gen de la agmatinasa (agm), relacionado con la biosíntesis de putrescina, está sobre-expresado en E/A y L/A. Los productos de las reacciones previas, S-adenosil-metioninamina y putrescina, son sustratos de la espermidina sintasa (SpS), que está sub-expresada en E/L. Para la síntesis de la tripanotión, una molécula de espermidina es acoplada a dos de glutatión. La tripanotión reductasa (TR) está sub-expresada en L/A.

4.3.2.6. Metabolismo de lípidos.

Un gen que codifica una triacilglicerol (TAG) lipasa (TGL) y otro de un precursor de la lipasa se localizan en tándem en el cromosoma 31 y están sub-expresados en E/L. Otros dos genes que codifican también para lipasas muestran un patrón de expresión diferente al anterior: uno de ellos está sub-expresado en E/A y el otro en L/A. A pesar de ello, las lipasas codificadas por estos genes presentan actividad TGL, de acuerdo con las anotaciones de la base de datos GO y la actividad catalítica anotada EC 3.1.1.3. Los ácidos grasos liberados de las moléculas de TAG y 1,2-DAG por la TGL pueden tener diferentes destinos en la célula, como la β -oxidación (β -ox) de los ácidos grasos (AG) y la síntesis de AG insaturados y sus derivados. En cuanto a la β -ox, el gen de la 3,2-*trans*-enoil-CoA hidratasa isomerasa (ECH) está sub-expresado en E/L; ECH está relacionada con la β -ox de AG insaturados. Además, tres genes de 3-cetoacil-CoA tiolasas (Tiol I) están sobre-expresados en L/A y dos de ellos también lo están en E/L. Por lo tanto, la expresión diferencial de los genes ECH y Tiol I no está correlacionada. Estos genes participan en la adición reversible de acetil-CoA a grupos acilo en la β -ox, así como en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (valine, leucina e isoleucina). En cuanto a los procesos

Resultados

biosintéticos de AG, el gen de la proteína portadora de acilo (ACP) está sobre-expresado en L/A. Uno de los dos genes de la prostaglandina F sintasa (PGFS) anotados en el genoma de *L. infantum* está diferencialmente expresado, concretamente sub-expresado en E/L y sobre-expresado en E/A. En la ruta de biosíntesis de los esfingolípidos, la dihidroceramida se reduce a ceramida por la esfingolípido δ -4 desaturasa, gen sub-expresado en E/L y sobre-expresado en E/A y L/A.

El gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (3-HMG-CoA reductasa) está sub-expresado en L/A, se localiza en el glicosoma y participa en la síntesis de esteroides a partir de leucina (McConville y col., 2008). El gen de la C8-esterol isomerasa está sub-expresado en E/L, y es el único que se ha encontrado como diferencialmente expresado de entre los que participan en la biosíntesis del ergosterol. El gen de la latosterol oxidasa está sobre-expresado en E/A; es el gen de la reacción previa a la síntesis de colesterol, pero estos parásitos carecen de la última enzima de la ruta y, por tanto, de colesterol, siendo el ergosterol el que realiza las correspondientes funciones. Por tanto, el último producto de esta ruta es el 7-dehidrocolesterol, que mediante la absorción de un fotón (hv) da lugar al colecalciferol o vitamina D3.

4.3.2.7. *Proteolisis.*

Un conjunto de genes de proteasas están sobre-expresados en los promastigotes en fase estacionaria y los amastigotes. En concreto, la proteasa de tipo catepsina L LinJ08_V3.0960 está sobre-expresada en L/A y E/L; la cisteína peptidasa AUT2/APG4/ATG4, Clan CA, familia C54 (C54cp) está sobre-expresada en E/A; la cisteína peptidasa otubaína, Clan CA, familia C65, de función desconocida, está sub-expresada en E/A y L/A; y la serina peptidasa S51 (SerP51) está sobre-expresada en E/L. Además, varias proteínas relacionadas con la maquinaria de degradación de la vía ubiquitina-proteasoma están expresadas diferencialmente con la progresión del ciclo biológico. La subunidad α 2 del proteasoma participa en los procesos catabólicos de proteínas dependientes de ubiquitina y presenta una actividad de tipo treonina endopeptidasa. De acuerdo con los resultados de este trabajo, este gen y la enzima conjugante de ubiquitina E2 (UBC2) están sobre-expresados en L/A en el nivel de transcrito. Las proteínas destinadas a la degradación por la vía del proteasoma son ubiquitiniladas mediante la ubiquitina ligasa (E3) después de la conjugación con ubiquitina mediada por UBC2. Dos genes que codifican para diferentes proteínas de tipo ubiquitina (*ubq*) están también sobre-expresados en L/A y un gen distinto de *ubq* en E/L. Otros patrones distintos han sido encontrados para genes relacionados con el complejo del proteasoma: una subunidad no-ATPasa reguladora del proteasoma LinJ07_V3.1300 (rS-no-ATPasa) y la subunidad β 3 del proteasoma (LinJ28_V3.0110) están sub-expresados en E/L; una cisteína peptidasa, Clan CA, familia C12 (UHC-C12) está sobre-expresada en E/L. UHC-C12 muestra una actividad C-terminal fosfohidrolasa (EC 1.4.19.12) para la liberación de los residuos de ubiquitina de las proteínas marcadas.

4.3.2.8. *Señalización intracelular y regulación del ciclo celular.*

Un gen que codifica para una quinasa relacionada con la quinasa dependiente de ciclina 2 (*cdc2-rel*) y tres genes de proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK) están sobre-expresados en L/A. Una de estas MAPK está sub-expresada y una proteína de unión a quinasa dependiente de ciclina (*cdkbp*) sobre-expresada en E/L. Además, un homólogo de MAPK (MAPKh) está sub-expresado en E/A. Algunas de las proteínas que participan en otros procesos de transducción de señales están diferencialmente expresadas. Así, una proteína todo β toroidal (*β -propeller protein*, *β -prop*) y un factor de ribosilación de

ADP (ADPrf) están sobre-expresados en L/A. β -prop es una transducina porque contiene una estructura en repetición G- β (PF00400), en concreto repeticiones WD40 (IPR001680) con dicha estructura y ADPrf tiene actividades de unión a GTP y GTPasa (GO). Además, la proteína fosfatasa 2C (PP2C) y la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (cPP1) están sobre-expresadas en L/A; cPP1 está también sobre-expresada en E/A pero sub-expresada en E/L. Una adenilato ciclasa y cinco proteína quinasas (PK), incluyendo la GSK, anteriormente mencionada, están diferencialmente reguladas. Entre ellas está la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (rPKA), que está sobre-expresada en E/L, la cual está relacionada a la vía de señalización del cAMP en otros eucariotas. A pesar de ello, una adenilato quinasa de tipo no receptor (AC) está sub-expresada en E/L. Una cisteína endopeptidasa dependiente de calcio (C2cp, calpaína μ) (EC 3.4.22.52) está sobre-expresada en L/A y E/A. También se ha detectado la expresión diferencial de dos genes de peptidasas relacionadas con procesos de transducción de señales: la peptidasa aspártica de tipo presenilina de la familia A22A (A22Aap) está sobre-expresada en E/A y SerP51 en E/L como se ha mencionado anteriormente.

4.3.2.9. Citoesqueleto y movimiento.

Tres proteínas del vástago paraflagelar (PAR4, PFR y PFR1D) están sobre-expresadas en L/A. PFR y PFR1D son componentes estructurales del complejo macromolecular flagelar y unen calmodulina, y PAR4, también sobre-expresada en E/A, participa en la biogénesis y la organización del flagelo según el análisis de GO. Entre los miembros de la familia de la cadena ligera de la dineína flagelar DLC1, se ha detectado la sobre-expresión en L/A y la sub-expresión en E/L del brazo corto de la cadena ligera de la dineína lc6 de tipo 1 (DynLC6) y de una cadena ligera de dineína (DynLC). También se han hallado dineínas no flagelares sobre-expresadas en L/A: una cadena ligera de dineína de la familia Tctex-1 (DLCTctex-1); y una cadena ligera 2b de una dineína citoplásmica (Dyn2bLC7_18.1010), que pertenece a la familia *Roadblock/LC7* (PF03259) y participa en el transporte de vesículas y orgánulos en el citoplasma por de/polimerización de microtúbulos. Dos genes más de dineínas de localización desconocida están diferencialmente regulados: una cadena pesada de dineína (DynH) está sobre-expresada en E/A y una proteína de tipo *roadblock* (“obstáculo”) asociada a dineína (DynLC7) está sub-expresada en E/L. Una tubulina α y una proteína asociada a microtúbulos de función desconocida (MTap) están sobre-expresadas en L/A. Por el contrario, un gen de actina está sub-expresado en E/A y L/A. Como se ha mencionado antes, C2cp está sobre-expresada en E/L, E/A y L/A y está relacionada con la reorganización del citoesqueleto entre otras funciones. Finalmente, un gen de caltractina asociado al centrosoma está sobre-expresado en E/L. En resumen, algunos genes relacionados con las estructuras flagelar y paraflagelar están sub-expresados en amastigotes.

4.3.2.10. Moléculas de superficie y genes de función desconocida. El *cluster* de las proteínas hidrofílicas de superficie (HASP) y SHERP (HASP/SHERP), localizado en el cromosoma 23, está regulado diferencialmente en la progresión del ciclo biológico del parásito. HASPA1 es una proteína hidrofílica de función desconocida que está sobre-expresada en E/L, E/A y L/A, y en consecuencia, sus mayores niveles de expresión se alcanzan en la fase estacionaria. El gen HASPB está sub-expresado en E/A, es decir, sobre-expresado en amastigotes, mientras que HASPA2 está sobre-expresado en E/L. Los genes SHERP LinJ23_V3.1210/30 (ambos localizados entre HASPA1 y HASPB respectivamente) están sobre-expresados en E/L y el segundo también en E/A. Además de las moléculas codificadas en el *cluster* HASP/SHERP, tres proteínas de tipo antígeno de superficie (SALp) están diferencialmente reguladas: una

Resultados

de ellas está sobre-expresada en L/A y E/A y sub-expresada en E/L; otra SALp está sobre-expresada en L/A, mientras que SALp2 está sub-expresada en L/A. En cuanto al *cluster* A2-A2rel, el gen A2 está sobre-expresado en amastigotes (sub-expresado en E/A y L/A). El gen 3'a2rel está también sub-expresado en E/A y L/A y sobre-expresado en E/L. El gen 5'a2rel está sobre-expresado en E/A.

Algunos genes de las familias de amastinas y tuzinas están diferencialmente expresados, en concreto, varios genes del *cluster* amastina-tuzina del cromosoma 8: los de amastinas están sub-expresados en E/A y sobre-expresados en E/L, y los de tuzina están sobre-expresados en L/A. El gen de amastina LinJ34_V3.2660 presenta el mismo patrón que los anteriores, mientras que el LinJ34_V3.0460 está sub-expresado en E/A y L/A y no se ha hallado en el conjunto de genes sobre-expresados en E/L. Otros dos genes de tuzina y el gen de amastina LinJ19_V3.3010 están sobre-expresados en E/L. En síntesis, al menos algunos genes de amastinas no son específicos del estadio amastigote.

Otros genes de función desconocida en el parásito aún no mencionados y su regulación diferencial son: una proteína con dedos de zinc de tipo RING o rifilina (RINGfp), sobre-expresada en L/A, que podría participar en interacciones proteína-proteína (IPR001841); dos genes contiguos de deshidrogenasa de cadena corta (SCDH), sub-expresados en E/L; una fosfoproteína regulada diferencialmente en el desarrollo (DRPPLP), sobre-expresada en L/A y sub-expresada en E/L; y la proteína de división celular FtsJ (FtsJ), sub-expresada en L/A. Finalmente, se ha detectado una alta tasa de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresadas en amastigotes.

4.3.3. Menor tasa de sobre-expresión en amastigotes.

En las Tablas 6, 11, 12, A4-7, se puede observar un número notablemente mayor de genes sobre-expresados en promastigotes (68,4%) que en amastigotes (31,6%). Además, prácticamente todos los genes relacionados con la expresión génica y su regulación que están diferencialmente expresados están sobre-expresados en promastigotes con respecto a amastigotes. Estas observaciones sugieren que la sub-expresión predomina sobre la sobre-expresión en la diferenciación al amastigote. Por lo tanto, se contrastó la hipótesis nula de ausencia de diferencias significativas entre la sobre-expresión y la sub-expresión en amastigotes en los conjuntos de datos L/A y E/A (Anexo V) mediante el test de la distribución binomial (sección 3.13.1), encontrándose diferencias significativas en ambos casos y globalmente (Tabla 13). Esto confirma que los niveles de sobre-expresión son significativamente mayores en promastigotes que en amastigotes.

Tabla 13. Contraste de las frecuencias absolutas de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes mediante el test de la distribución binomial. Se realizaron tres contrastes de hipótesis: uno para el conjunto de genes diferencialmente expresados en E/A, otro en L/A y otro global que incluía los conjuntos E/A y L/A. (*) Subconjuntos de genes considerados para el contraste E/A. (**) Subconjuntos de genes considerados para el contraste L/A. Para el contraste global se consideraron una sola vez los genes diferencialmente expresados según los resultados de las dos comparaciones transcriptómicas, E/A y L/A. En todos los casos, las diferencias entre las frecuencias de sub-expresión y sobre-expresión son estadísticamente significativas ($p < 0,01$), con predominancia de la primera en amastigotes.

	N	%	p
Genes sub-expresados en E/A	68*	14,6	< 0,001
Genes sub-expresados en L/A	66**	14,4	< 0,001
Genes sub-expresados en E/A y L/A	13*/**	2,8	
Genes sobre-expresados en E/A	94*	20,2	
Genes sobre-expresados en L/A	189**	40,5	
Genes sobre-expresados en E/A y L/A	35*/**	7,5	
Total	465	100	< 0,001

4.3.4. Comparación de los perfiles de expresión génica de los promastigotes en fase logarítmica y en fase estacionaria de cultivo axénico mediante técnicas de proteómica.

Se obtuvieron extractos de proteínas totales de *L. infantum* en los días 3 y 8 de la curva de crecimiento (Figura 28A, promastigotes en fase logarítmica y estacionaria respectivamente) y se resuspendieron en tampón de rehidratación. El método de extracción de proteínas fue optimizado para obtener mejores rendimientos y mayor pureza de la muestra (sección 3.7.1.) y con el fin de obtener mejor resolución en el isoelectroenfoco y la posterior electroforesis PAGE-SDS (electroforesis bidimensional). Un extracto de proteínas totales de *L. infantum* fue cuantificado por el método de Bradford (recta de regresión lineal [BSA] = $1,21x + 0,03$, con coeficiente de correlación $r^2 = 0,99$) y, resultando ser su concentración de 2,18 mg/ml, fue utilizado como estándar para densitometría con el programa *Quantity One*. Posteriormente, se realizó la separación por PAGE-SDS y la subsiguiente tinción de los extractos de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica y estacionaria de cultivo axénico que serían empleados para el análisis proteómico (Figura 28B y C).

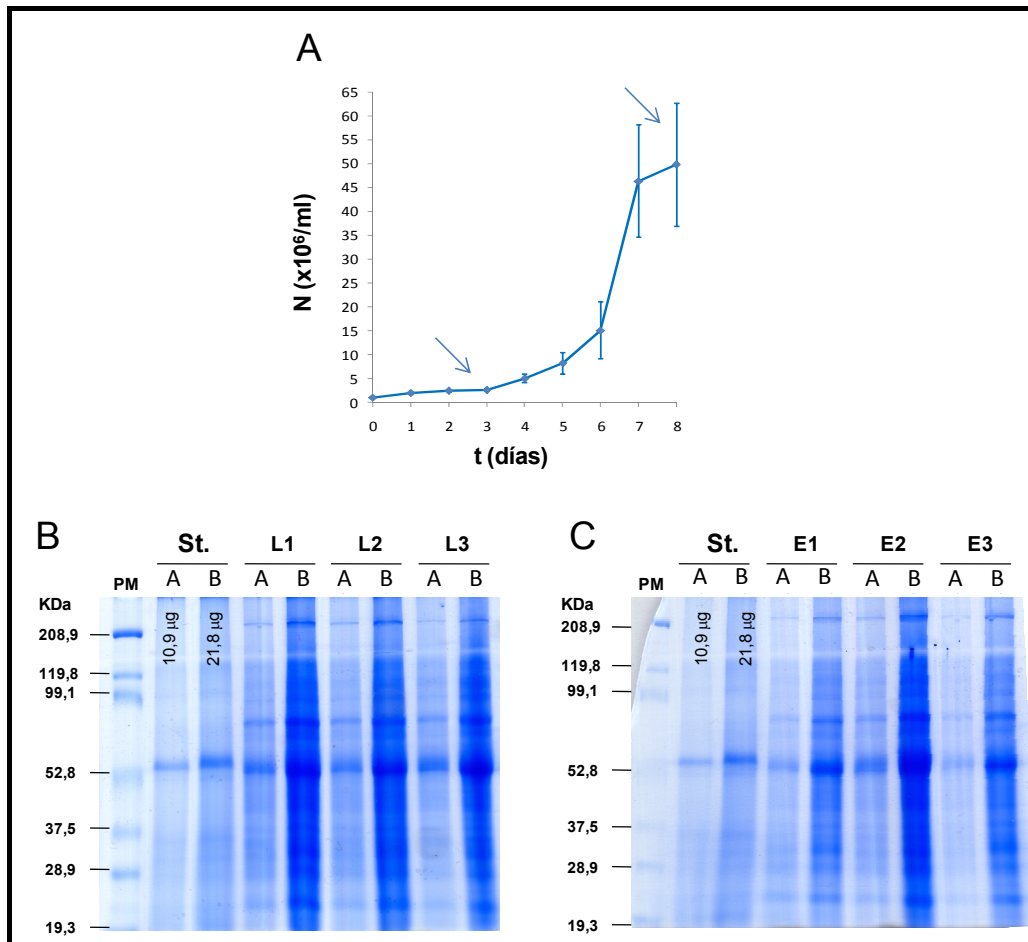


Figura 28. Cuantificación de los extractos proteicos totales de *L. infantum* para el análisis proteómico. (A) Curva de crecimiento media de tres cultivos de promastigotes de *L. infantum*, de los que se obtuvieron muestras para extracción de proteínas los días 3 (fase logarítmica) y 8 (fase estacionaria). N es la densidad celular. Se representa la cuasidesviación típica (S) en cada punto de la curva. (B) PAGE-SDS para la cuantificación de extractos proteicos totales de promastigotes en fase logarítmica. L1, 16,1 $\mu\text{g/ml}$; L2, 16,1 $\mu\text{g/ml}$; L3, 13,1 $\mu\text{g/ml}$. (C) PAGE-SDS para la cuantificación de extractos proteicos totales de promastigotes en fase estacionaria. E1, 3,29 $\mu\text{g/ml}$; E2, 5,18 $\mu\text{g/ml}$; E3, 3,32 $\mu\text{g/ml}$. Abreviaturas: PM, patrón de masa molecular; St., estándar cuantificado por el método de Bradford; L, promastigotes en fase logarítmica (el número que aparece a continuación indica la réplica); E, promastigotes en fase estacionaria (seguido del número de réplica); A, indica que se cargaron 5 μl del extracto en ese carril; B, indica que se cargaron 10 μl del extracto en ese carril.

Resultados

La aproximación realizada al proteoma es parcial, debido a que el isoelectroenfoco se realizó en un rango de pH de 3 a 10 y no se realizaron fraccionamientos subcelulares ni isoelectroenfocos con rangos más reducidos de pH para cada una de las fracciones que de uno u otro modo se hubiesen obtenido.

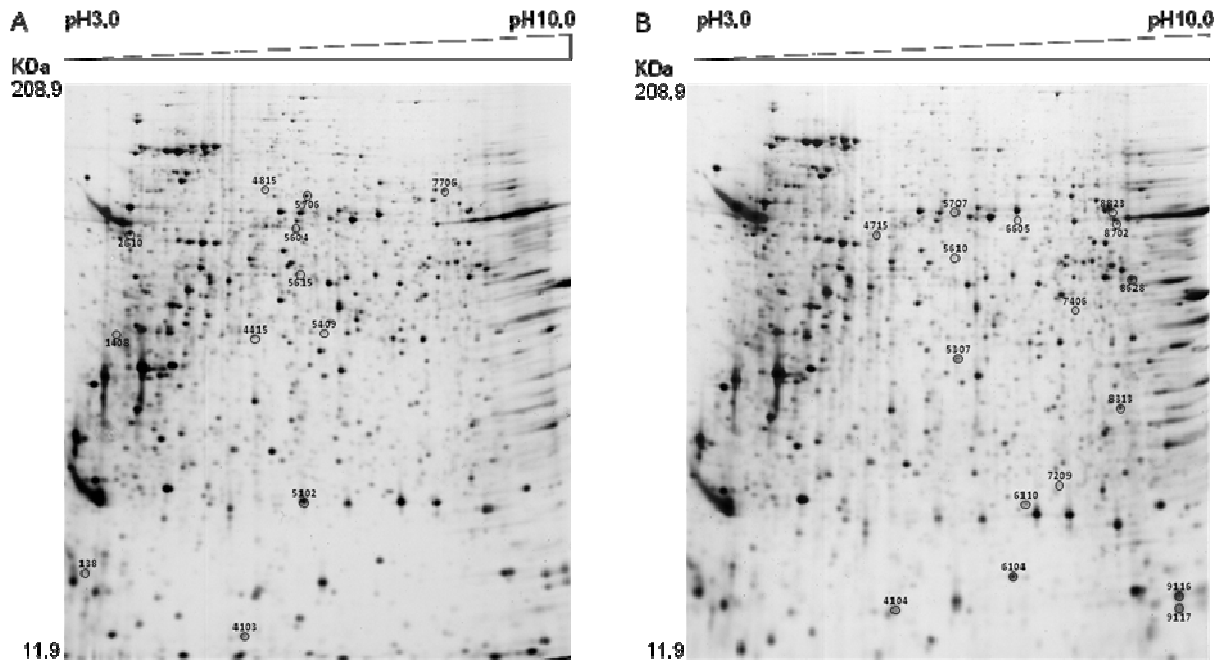


Figura 29. Electroforesis bidimensionales de los extractos proteicos totales de cultivos de *L. infantum* en fase logarítmica y estacionaria. Primera dimensión, de izquierda a derecha, isoelectroenfoco o separación de las proteínas según su punto isoeléctrico (pI), con un rango de pH comprendido entre 3,0 y 10,0. Segunda dimensión, de arriba a abajo, electroforesis PAGE-SDS para separación por tamaño. (A) Electroforesis bidimensional correspondiente a una de las réplicas de los extractos de promastigotes en fase logarítmica. (B) Electroforesis bidimensional correspondiente a una de las réplicas de los extractos de promastigotes en fase estacionaria.

Se identificaron 28 puntos correspondientes a proteínas diferencialmente expresadas entre los promastigotes en fase logarítmica y estacionaria (Figura 29, Anexo VI). Concretamente, 12 corresponden a la fase logarítmica y 16 a la estacionaria (Tabla 14). Tres de los puntos correspondientes a la fase estacionaria no pudieron ser identificados y otro no produjo una huella peptídica con información suficiente para la búsqueda en la base de datos con *MASCOT* (sección 3.7.3.). En algunos casos aparece más de una proteína, quedando en ese caso sin resolver el contenido del punto correspondiente a la proteína cuya cantidad relativa varía. En el caso del punto Lin5307 se ha considerado que la proteína cuyo gen está diferencialmente expresado es el polipéptido α de la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF), puesto que el análogo de la proteína quinasa C activada (LACK) está expresado constitutivamente en los promastigotes, según se comprobó previamente por Western blot en el laboratorio (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1999).

Los promastigotes de fase estacionaria sobre-expresan la ciclofilina LinJ06_V3.0120 con respecto a los de fase logarítmica (sobre-expresión en E/L), así como la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRF), una de las enzimas que el parásito dispone para obtener derivados de purina a partir de los nutrientes de sus hospedadores (Boitz y Ullman, 2006), ETF, una proteína de tipo chaperona DnaJ y el factor de elongación 1α (eIF1 α). Las proteínas sub-expresadas en E/L son la proteína ribosómica 40S

S12, la subunidad γ de la proteína 1 del complejo T (Tc β 1 γ), que es una chaperona (KEGG), la subunidad de 51 KDa del factor de replicación A, una proteína antioxidante dependiente de tior, perteneciente a la familia de las peroxirredoxinas y la manosa-1-fosfato guanililtransferasa.

Tabla 14. Proteínas diferencialmente expresadas en promastigotes logarítmicos y estacionarios. Se describe el número del punto analizado asignado por el programa *PDQuest* en el análisis del gel maestro precedido de las iniciales de la especie *L. infantum*, el nombre de la proteína, la masa molecular (MM), el punto isoeléctrico (pI), la puntuación asignada por el motor de búsqueda *MASCOT* y F, que es el cociente de intensidades de tinción detectadas. F se define como E/L > 1,70 si E > L (sobre la línea divisoria) y L/E < -1,70 si E < L (bajo la línea divisoria).

Punto	Proteína	MM (KDa)	pI	Puntuación MASCOT	F
Li4104	No identificada	14,8	5,85	-	3,94
Li4715	No identificada	54,0	5,58	-	2,45
Li5307	Homólogo del receptor de la proteína quinasa C activada (LACK) (Ldon 2654167)/Flavoproteína de transferencia de electrones, polipéptido α (Lin 146091897) LinJ28_V3.1240	26,9	6,73	122/121	2,74
Li5610	Proteína hipotética (LmjF157870357)/ α -tubulina (Ldon 606648)	46,5	6,62	99/95	1,85
Li5707	Subunidad reguladora del proteasoma 19S, subunidad 5 no-ATPasa reguladora del proteasoma (Lmj157868918)/Proteína de tipo sucrosa-fosfato sintasa (LinJ 146082719)	60,0	6,61	192/144	2,35
Li6104	Ciclofilina (LinJ 146070754) LinJ06_V3.0120	16,5	7,52	251	6,02
Li6110	Sin datos para la búsqueda	18,3	7,73	-	1,73
Li6605	Proteína hipotética (LinJ 146088184)	58,3	7,51	82	4,46
Li7209	HGPRT, hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (LinJ 146080155)	21,4	7,76	410	1,77
Li7406	Proteína hipotética (LinJ 146088184)	35,8	8,28	130	6,31
Li8313	Proteína hipotética (LinJ 146076010)	25,3	9,12	136	1,81
Li8628	Proteína DnaJ 146091218 LinJ27_V3.2350	41,1	9,05	262	2,68
Li8702	Factor de elongación 1 α (LinJ 146083153) LinJ17_V3.0170-0200	61,2	8,72	179	2,30
Li8823	Factor de elongación 1 α (LinJ 146083153) LinJ17_V3.0170-0200	57,6	8,78	178	2,45
Li9116	Factor de elongación 1 α (T. brucei Brenner 71406243)	15,1	9,43	100	1,76
Li9117	No identificada	14,9	9,43	-	1,70
Li138	Proteína ribosómica 40S S12 (LmjF 157866190)	13,3	3,62	359	-2,49
Li1408	Proteína ribosómica ácida 60S (LmjF 73544403)/ α -tubulina (Ldon 51847763)	29,7	4,06	88/73	-6,18
Li2610	α -tubulina (Ldon 606648)/Proteína hipotética conservada (Lbra 154339589)/ATPasa, subunidad β (LmjF157870644)	60,3	4,19	158/94/90	-1,92
Li4103	α -tubulina (Ldon 51847763)	15,2	5,79	113	-1,78
Li4415	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa (Lin 146086987)	28,8	5,85	376	-4,78
Li4815	Proteína hipotética conservada (Lin 146086263)	69,7	6,23	119	-1,93
Li5102	Proteína antioxidante dependiente de tior (Lin 21307665)	11,7	6,42	212	-2,93
Li5409	Proteína hipotética conservada (Lin 146083797)	29,3	6,78	113	-1,73
Li5604	Factor de replicación A, subunidad de 51 KDa (Lin 146092153)	55,3	6,41	160	-11,52
Li5615	Subunidad 5 reguladora del proteasoma no-ATPasa (Lin146086561)/Proteína 1 del complejo T, subunidad β (Lin146090813)/ α -tubulina (Ldon 606648)	43,8	6,46	402/101/103	-4,48
Li5706	Proteína 1 del complejo T, subunidad γ (Lin146087432)	67,2	6,56	338	-10,30
Li7706	Proteína hipotética conservada (Lin 146093001)	69,5	8,32	233	-2,18

4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LAS SUBPOBLACIONES DE PROMASTIGOTES PROCÍCLICOS PNA⁺ Y METACÍCLICOS PNA⁻ DE LA POBLACIÓN EN FASE ESTACIONARIA DE CULTIVO AXÉNICO DE *L. infantum*.

4.4.1. Ensayos de hibridación con *microarrays* para el análisis transcriptómico de los promastigotes PNA⁺ y PNA⁻.

La separación de las subpoblaciones procíclica y metacíclica de cultivos en fase estacionaria de *L. infantum* se realizó mediante aglutinación con PNA y centrifugación diferencial. En primer lugar, se prepararon tres cultivos de *L. infantum* para realizar posteriormente réplicas de los experimentos de hibridación con *microarrays* y se representó la curva de crecimiento media (Figura 30). Un día después de que los cultivos alcanzaran la fase estacionaria (día 7 en este caso), se realizó el procedimiento de aglutinación con PNA seguido de separación mediante centrifugación diferencial, cuya optimización para *L. infantum* está detallada en la sección 3.4.4. Cada fase de la centrifugación diferencial fue comprobada mediante la observación al microscopio óptico de los parásitos teñidos con Giemsa modificado (Figura 31).

Resultados

Se estimó que tan sólo el 1% de la población de promastigotes en fase estacionaria no aglutina con PNA. Por lo tanto, tras el análisis mediante electroforesis capilar de la integridad del ARN purificado de ambas subpoblaciones (Figura 32A y B), fue necesario amplificarlo *in vitro* (Figura 32C) para disponer posteriormente de suficiente cantidad de ADNc de promastigotes PNA⁺ y PNA⁻ marcado con las cianinas Cy3 y Cy5 respectivamente y así poder llevar a cabo las hibridaciones con los *microarrays*.

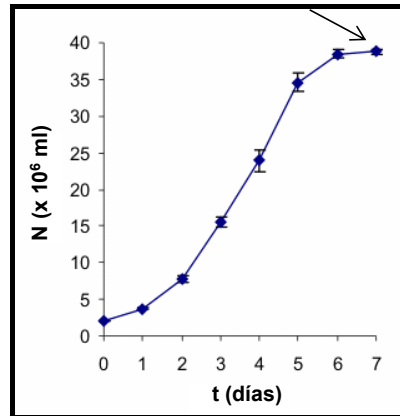


Figura 30. Curva de crecimiento promedio de tres cultivos de *L. infantum* para la separación posterior de las subpoblaciones procíclica y metacíclica en fase estacionaria. N es la densidad celular media. Se representa la cuasidesviación típica (S) en cada punto de la curva. Los promastigotes fueron recogidos en fase estacionaria (día 7) para la separación de ambas subpoblaciones mediante aglutinación con PNA y posterior separación por centrifugación diferencial de las formas aglutinantes (PNA⁺) y no aglutinantes (PNA⁻).

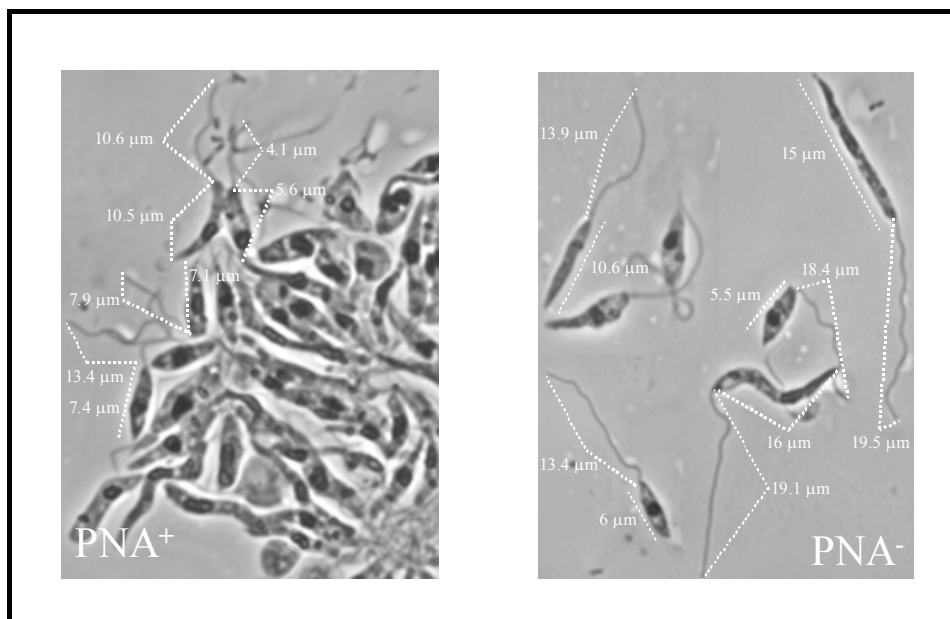


Figura 31. Morfología de los promastigotes PNA⁺ y PNA⁻. Tinción con Giemsa modificado de ambas subpoblaciones. En los promastigotes procíclicos PNA⁺, la relación entre la longitud del cuerpo celular y la del flagelo es aproximadamente 1:1, y el cuerpo celular es ovoide y de tamaño pequeño o medio (5-10 μm). En los promastigotes PNA⁻, el flagelo es más largo que el cuerpo celular y se observan dos morfologías: cuerpo celular corto y ovoide (relación 1:3 de longitud entre el cuerpo y el flagelo) y cuerpo celular largo y delgado (*slender*, relación 4:5).

Una vez realizada la hibridación del ADNc de los promastigotes procíclicos y metacíclicos con los *microarrays* (Figura 33), se normalizaron los datos con el algoritmo *LOWESS per pin* (de forma individual para cada *grid*). Se realizaron tres réplicas biológicas del experimento, analizándose los cocientes de intensidad mediante el test de la t de Student pareado para el contraste de la hipótesis nula de ausencia de expresión diferencial para cada punto. La normalización y el test de la t se realizaron con el programa informático *AlmaZen* y se obtuvo el diagrama de dispersión M/A (Figura 34). Teniendo en cuenta el diagrama de dispersión M/A (Figura 34), los criterios para considerar expresión génica diferencial fueron, en este caso, los siguientes: $F \geq 2$ ($Cy5/Cy3$ si $Cy5 > Cy3$) ó ≤ -2 ($-Cy3/Cy5$ si $Cy5 < Cy3$), intensidad de emisión de al menos un fluoróforo ≥ 5000 UF y $\alpha = 0.05$. Como resultado de este análisis, se hallaron 317 puntos con diferencias significativas entre las intensidades de fluorescencia, es decir, 317 clones que contienen secuencias correspondientes a genes diferencialmente expresados entre promastigotes PNA^+ y PNA^- . Este dato corrobora que es posible la separación de ambas subpoblaciones pertenecientes a una población en cultivo en fase estacionaria de promastigotes de *L. infantum*.

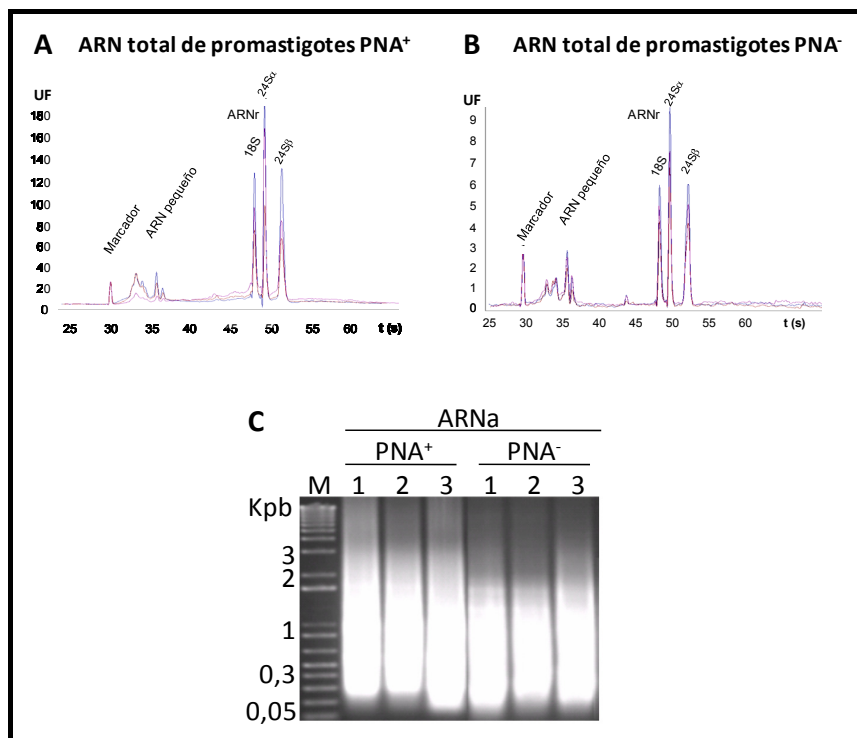


Figura 32. Análisis del ARN total y del ARN mensajero amplificado (ARNa) de los promastigotes procíclicos PNA⁺ y metacíclicos PNA⁻. Electroferogramas de las muestras de ARN total obtenidas de promastigotes procíclicos PNA⁺ (A) y metacíclicos PNA⁻ (B). El primer pico corresponde al marcador *RNA 6000 Nano Marker* (Agilent Technologies) para establecer el punto de inicio. Se observa la integridad del ARNr 18S y del 24S (α y β), así como la ausencia de degradación en el intervalo comprendido entre los picos de ARN pequeño y el pico del ARNr 18S. (C) Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ARNa de los promastigotes PNA⁺ y PNA⁻.

A continuación, se procedió a secuenciar dichos clones, al ensamblaje de las secuencias y al alineamiento de las mismas con la secuencia del genoma de *L. infantum* para identificar los genes o fragmentos génicos contenidos en ellos. Tan sólo 197 clones contienen secuencias génicas anotadas en el genoma de *L. infantum*, de los cuales 104 corresponden a genes con función conocida; 62 de estos clones

Resultados

mapean con genes subexpresados (Tabla 15) y 42 con sobre-expresados (Tabla 16) en promastigotes metacíclicos (PNA⁻). Los 93 clones restantes mapean con secuencias de genes que codifican para proteínas hipotéticas o de función desconocida (Tablas A9 y A10). Por lo tanto, en este estudio se utilizó el programa informático *Glimmer* para anotar de nuevo los genes de la secuencia genómica, y se observó una coincidencia del 76% entre las anotaciones realizadas en el proyecto genoma de *L. infantum* (Peacock y col., 2007) y las propias. Sólo se consiguieron anotar 34 secuencias como genes, a falta de una confirmación experimental (Tabla A11). Los clones restantes (86) contienen presumiblemente genes hasta ahora no anotados (Tabla A12). Estas observaciones indican que el ensamblaje del genoma de *L. infantum* y la anotación de genes en el mismo no han sido completados.

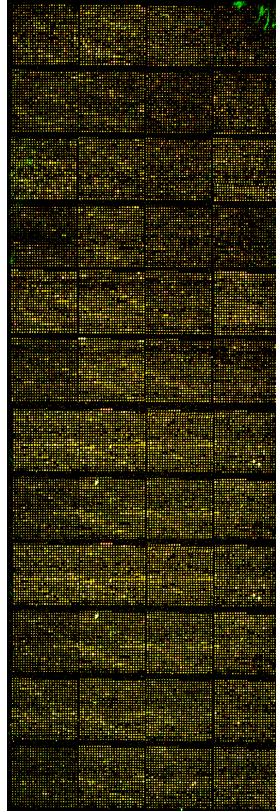


Figura 33. Microarrays de ADN de *L. infantum* hibridados con Cy3-ADNc de promastigotes procíclicos y Cy5-ADNc de promastigotes metacíclicos. Imagen de una réplica del ensayo de hibridación.

Tabla 15. Genes de función conocida sobre-expresados en promastigotes procíclicos PNA⁺ de *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes sobre-expresados en promastigotes procíclicos que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida. Los datos que se describen de cada clon son: número de clon; *fold change* o nivel de expresión diferencial ($F \leq -2$); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); *p*, valor *p* del test de la *t* con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de *GenBank* GSS; valores *e* del alineamiento en *BLAST* de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (Fw) y *downstream* (Rv); Def., definición del clon según la exactitud de su ensamblaje y mapeo (*a*, *b* o *c*; véase explicación en la sección 4.2.); anotaciones (identificadores *GeneDB*); las correspondientes funciones génicas y los códigos entre paréntesis que se relacionan con la Figura 35, donde se asocian a los términos de la base de datos *Gene Ontology* asociados a tales funciones; qRT-PCR, resultado del análisis por PCR cuantitativa relativa en tiempo real. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+). (Comienza en la página siguiente).

Resultados

Tabla 16. Genes de función conocida sobre-expresados en promastigotes metacíclicos PNA de *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes sobre-expresados en promastigotes metacíclicos que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida. Los datos que se describen de cada clon son: número de clon; *fold change* o nivel de expresión diferencial ($F \geq 2$); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); *p*, valor *p* del test de la *t* con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de *GenBank* GSS; valores *e* del alineamiento en *BLAST* de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (*Fw*) y *downstream* (*Rv*); Def., definición del clon según la exactitud de su ensamblaje y mapeo (*a*, *b* o *c*; véase explicación en la sección 4.2.); anotaciones (identificadores *GeneDB*); las correspondientes funciones génicas y los códigos entre paréntesis que se relacionan con la Figura 36, donde se asocian a los términos de la base de datos *Gene Ontology* asociados a tales funciones; qRT-PCR, resultado del análisis por PCR cuantitativa relativa en tiempo real. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+).

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada (Términos de GO en la Figura 36)	qRT-PCR	
					Fw	Rv				+/-	F ± S
Lin6E6	2,32	1,2 ± 0,4	0,040	FI103922	0	0	b	LinJ27_V3.0950	Proteína hipotética de tipo OGLEnac transfera (M1)	+	9,2 ± 0,5
Lin9F10	2,08	1,1 ± 0,2	0,007	FI103923	5e-60	1e-32	b	LinJ31_V3.2400	3,2-trans-enoil-CoA isomerasa, putativa(M7)	N.D.	
Lin14G8	2,04	1,0 ± 0,3	0,028	FI103924	5e-174	1e-88	b	LinJ34_V3.1150	Proteína de superficie de tipo amastina (M0)	+	4,3 ± 0,7
Lin22G3	2,37	1,2 ± 0,3	0,013	FI103925	2e-50	3e-41	a	LinJ32_V3.3820	Proteína de tipo 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa (M2)	N.D.	
Lin24A8	3,21	1,7 ± 0,6	0,044	FI103926	0	2e-84	b	LinJ31_V3.0910	Transportador de aminoácidos putativo (M0)	N.D.	
Lin42F3	2,19	1,1 ± 0,2	0,007	FI103927	0	0	a	LinJ19_V3.0540	Metionina aminopeptidasa 1, clan MG, familia M24, putativa (M4, M22, M32)	N.D.	
Lin51A7	2,64	1,4 ± 0,5	0,036	FI103928	0	0	b	LinJ33_V3.1510	Proteína de tipo aminoácido permeasa aap11 (M8)	N.D.	
Lin60B4	2,20	1,1 ± 0,1	0,002	FI103929	0	0	a	LinJ16_V3.1000	Proteína quinasa dependiente de ciclina (M11, M12, M20, M30, M34, M37, M38)	N.D.	
Lin63C12	2,46	1,3 ± 0,5	0,045	FI103930	0	1e-106	a	LinJ16_V3.1000	Proteína quinasa dependiente de ciclina (M11, M12, M20, M30, M34, M37, M38)	N.D.	
Lin67B1	4,36	2,1 ± 0,6	0,028	FI103931	0	0	a	LinJ20_V3.1230	Cisteína peptidasa de tipo calpaina, clan CA, familia C2, putativa (M31)	N.D.	
Lin80A6	2,00	1,0 ± 0,4	0,046	FI103932	0	0	a	LinJ14_V3.1140	Quinasa regulada por fosforilación-γ-tirosina de especificidad dual (M28, M30)	N.D.	
Lin81D6	2,92	1,5 ± 0,3	0,010	FI103933	0	0	a	LinJ32_V3.1390	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ32_V3.1400	Proteína de tipo factor de especificidad de corte y poliadenilación (M6)	+	12 ± 2
								LinJ32_V3.1410	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin83H9	2,15	1,1 ± 0,3	0,017	FI103934	0	0	c	LinJ07_V3.0940	Proteína de tipo citocromo b5	N.D.	
								LinJ14_V3.1500	Fosfoglicano β-1,3-galactosiltransferasa (M27)	+	6,9 ± 0,6
Lin91C2	2,25	1,2 ± 0,2	0,008	FI103936	4e-131	0	b	LinJ36_V3.4230	Carboxipeptidasa putativa de Zinc, clan MC, familia M14 (M25)	N.D.	
Lin91D9	2,32	1,2 ± 0,5	0,044	FI103937	0	0	a	LinJ20_V3.1230	Cisteína peptidasa de tipo calpaina, clan CA, familia C2, putativa (M31)	N.D.	
								LinJ30_V3.1240	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin91E3	2,15	1,1 ± 0,3	0,017	FI103938	4e-131	0	b	LinJ36_V3.4230	Carboxipeptidasa putativa de Zinc, clan MC, familia M14 (M25)	N.D.	
Lin106G9	2,04	1,0 ± 0,4	0,046	FI103939	0	0	a	LinJ31_V3.1980	Proteína de transcripción nupm1, putativa (M0)	+	68 ± 7
								LinJ31_V3.1990	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin111B9	2,66	1,4 ± 0,4	0,032	FI103940	2e-158	0	b	LinJ35_V3.1850	Proteína putativa de tipo proteína quinasa (M17, M30, M33)	N.D.	
Lin124E4	2,40	1,3 ± 0,5	0,043	FI103941	0	0	b	LinJ30_V3.0620	Proteína quinasa (M28, M30)	N.D.	
Lin126A4	2,01	1,0 ± 0,4	0,039	FI103942	0	0	a	LinJ28_V3.1240	Polipéptido α de flavoproteína de transferencia de electrones (M16, M21)	N.D.	
Lin129H1	2,55	1,4 ± 0,4	0,032	FI103943	0	0	b	LinJ08_V3.0960	Proteasa de tipo catepsina-L (M24)	N.D.	
Lin134D6	2,08	1,1 ± 0,3	0,032	FI103944	0	0	c	LinJ23_V3.0230	Transportador ABC putativo	-	1,0 ± 0,2
								LinJ23_V3.0240	Transportador ABC putativa	-	1,2 ± 0,4
								LinJ25_V3.2570	Fosfoglicano β-1,3-galactosiltransferasa 4, putativa (M27)	+	17 ± 3
Lin145E6	2,61	1,4 ± 0,3	0,015	FI103945	0	0	a	LinJ31_V3.3070	Serina/treonina proteína quinasa, putativa (M28, M30)	N.D.	
Lin150B8	2,34	1,2 ± 0,4	0,039	FI103946	0	0	b	LinJ32_V3.0860	Serina/treonina proteína quinasa, putativa (M9)	N.D.	
Lin169H9	2,60	1,4 ± 0,1	0,001	FI103947	2e-167	3e-169	b	LinJ36_V3.2490	Tirosina aminotransferasa, putativa (M15, M26)	N.D.	
Lin175A4	2,51	1,3 ± 0,1	0,004	FI103948	2e-43	0	b	LinJ23_V3.0720	Quinesina, familia 1b, putativa (M3, M4, M30, M36)	N.D.	
Lin183B1	2,26	1,2 ± 0,1	0,002	FI103949	0	0	a	LinJ31_V3.0350	Transportador de aminoácidos aATP11, putativo (M19)	N.D.	
Lin185F6	2,06	1,0 ± 0,3	0,024	FI103950	0	0	a	LinJ31_V3.0350	Transportador de aminoácidos aATP11, putativo (M19)	N.D.	
Lin188D10	2,10	1,1 ± 0,1	0,002	FI103951	0	0	b	LinJ19_V3.1490	Proteína de tipo oxidoreductasa	N.D.	
								LinJ19_V3.1500	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ19_V3.1510	Proteína quinasa, putativa	N.D.	
Lin194D9	2,34	1,2 ± 0,4	0,041	FI103952	0	1e-115	b	LinJ10_V3.1440	Proteína de tipo fosfatasa permeasa reprimible por fosfato (M0)	N.D.	
Lin194G1	2,46	1,3 ± 0,3	0,019	FI103953	1e-153	0	a	LinJ32_V3.1900	Serina/treonina proteína quinasa A, putativa (M5, M18)	N.D.	
Lin197F4	2,11	1,1 ± 0,4	0,038	FI103954	3e-64	3e-104	b	LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina (M0)	N.D.	
								LinJ08_V3.0700	Proteína de tipo amastina (M0)	N.D.	
Lin202D4	2,15	1,1 ± 0,3	0,019	FI103955	0	1e-106	a	LinJ11_V3.1050	Proteína de tipo SEC61 (proceso de pretranslocación) (M35)	N.D.	
Lin203A7	2,41	1,3 ± 0,1	0,001	FI103956	0	0	a	LinJ24_V3.0910	ADN polimerasa θ, dominio polimerasa, putativa (M2)	+	7,6 ± 0,8
Lin205B3	2,52	1,3 ± 0,5	0,036	FI103957	0	0	b	LinJ34_V3.2680	Subunidad reguladora de proteína de tipo proteína quinasa A (M1)	N.D.	
Lin205D11	2,36	1,2 ± 0,2	0,007	FI103958	0	0	a	LinJ29_V3.2420	Proteína de tipo enoil-CoA hidratasa-isomerasa(M7, M10)	+	15,2 ± 0,8
								LinJ29_V3.2430	Proteína quinasa activada por mitógeno	N.D.	
Lin214D1	2,42	1,3 ± 0,1	0,002	FI103959	0	0	a	LinJ30_V3.1790	Proteína con dominio DnaJ (M4, M13)	N.D.	
Lin225F9	2,19	1,1 ± 0,3	0,018	FI103960	0	0	a	LinJ34_V3.2190	Proteína de tipo glicosiltransferasa (M0)	+	7 ± 1
								LinJ34_V3.2200	Proteína de tipo DnaJ (M1)	+	13 ± 2
Lin243H2	2,51	1,3 ± 0,5	0,037	FI103961	0	4e-153	b	LinJ35_V3.4200	Proteína putativa de union a poli(A) (M5, M23)	N.D.	
Lin282E2	2,13	1,1 ± 0,3	0,023	FI103962	0	0	a	LinJ08_V3.0960	Proteasa de tipo catepsina-L (M24)	N.D.	
								LinJ08_V3.0970	Proteína de tipo histona deacetilasa	N.D.	
Lin289D9	2,08	1,1 ± 0,3	0,030	FI103963	0	4e-156	b	LinJ30_V3.3490	ADN ligasa I putativa (M14, M29, M30)	N.D.	
Lin291G1	2,27	1,2 ± 0,3	0,017	FI103964	3e-170	0	a	LinJ34_V3.0190	Proteína de tipo PPG (M0)	N.D.	

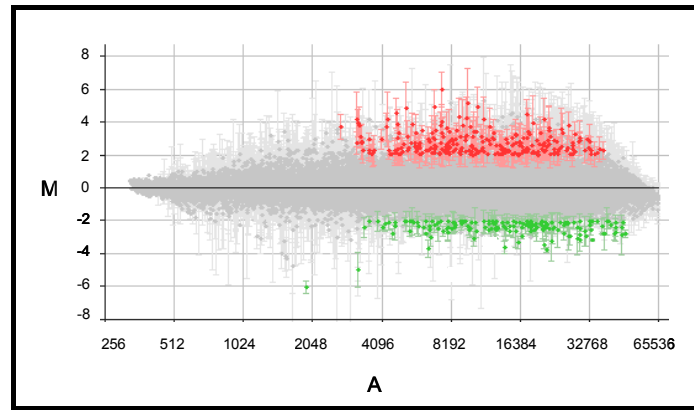


Figura 34. Análisis de hibridación de los ADNc de procíclicos PNA⁺ y metacíclicos PNA⁻ con *microarrays* de ADN. Diagrama de dispersión M/A en el que se representan las cuasidesviaciones típicas de M. $M = (\log_2 R_i - \log_2 V_i)$ y $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i)/2]$ (Ecuaciones 7 y 8), donde R y V son respectivamente los valores de intensidad de fluorescencia de Cy5 (rojo) y de Cy3 (verde). Los puntos rojos corresponden a clones que contienen genes sobre-expresados en promastigotes metacíclicos y los puntos verdes representan clones que contienen genes sub-expresados.

Tabla. 17. Resultados de la hibridación de los puntos control de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes PNA⁺ y PNA⁻. Para los controles positivos se detalla F (*fold change*) de PNA⁻/PNA⁺ y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; al ser en todos los casos $p \geq 0,05$, no hay expresión diferencial en PNA⁻/PNA⁺ en ninguno de los genes control positivo. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

Spots	F ± SD	p	Control positivo
cLin79A1	-1,4 ± 0,5	0,411	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	-1,1 ± 0,6	0,183	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	-2,2 ± 0,1	0,009	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,4 ± 0,5	0,236	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,4 ± 0,3	0,416	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,3 ± 0,3	0,596	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,5 ± 1,0	0,141	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-1,0 ± 0,1	0,170	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,1 ± 0,6	0,229	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	-2,1 ± 0,1	0,080	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,7 ± 0,2	0,128	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,0 ± 0,0	0,986	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 ± 0,1	0,161	<i>HerringS DNA</i>
	IF media (UF) ± SD		Control negativo
cLin79E1	345 ± 166		<i>Lfe nijA/hlyD</i>
cLin79E2	60 ± 32		<i>Lfe nijD/nifK</i>
cLin79E3	639 ± 344		<i>Lfe nijH</i>
cLin79F1	795 ± 266		<i>Lfe nijS/nifU</i>
cLin79F2	896 ± 339		<i>Lfe nijX/nifB</i>
cLin79F3	190 ± 91		<i>Lfe nijH/nifD</i>
cLin79G1	208 ± 49		<i>Lfe nijE</i>
cLin79G2	145 ± 74		<i>Lfe nijV/HesB</i>
cLin79G3	136 ± 56		<i>Lfe nijV</i>
cLin79H1	412 ± 174		<i>Lfe nijW/Bgene</i>
cLin79H3	62 ± 19		<i>IXSSC</i>

Al igual que en el análisis de la expresión génica diferencial global en los estadios fundamentales del ciclo biológico de *L. infantum* (sección 4.3.1.), la validación de los *microarrays* en este otro análisis del perfil de expresión génica de las subpoblaciones procíclica y metacíclica de la fase estacionaria se realizó en los niveles interno (genes conocidos del género *Leishmania* incluidos en los *microarrays* como controles positivos y genes del regulón *nif* de fijación de nitrógeno de *Le. ferrooxidans* como controles negativos) (Tabla 17) y externo (qRT-PCR del 7.25% de los clones) (Tablas 15 y 16). Además, se ha

Resultados

observado redundancia, como cabe esperar en una estrategia de *microarrays* de ADN genómico fragmentado al azar (Tablas 15 y 16), siendo el número total de genes diferencialmente expresados aproximadamente 250. La técnica de qRT-PCR ha permitido determinar también en este caso la expresión diferencial de genes detectados en el análisis de hibridación de *microarrays* que están representados en el mismo clon, conteniendo algunos de estos clones (Tablas 15 y 16) más de un gen diferencialmente expresado. Teniendo en cuenta los resultados de la qRT-PCR y la redundancia observada, el número de genes de función conocida sub-expresados es 52 (Tabla 15) y el de sobre-expresados es 36 (Tabla 16) en promastigotes metacíclicos.

4.4.2. Genes diferencialmente expresados en los promastigotes PNA⁺ y PNA⁻.

Una primera aproximación al perfil de expresión génica de los promastigotes metacíclicos, no aglutinantes con PNA, referido a los procíclicos, se ha llevado a cabo mediante la asignación de términos de funciones moleculares y procesos biológicos de GO a los genes diferencialmente expresados que se han hallado en este estudio transcriptómico. Los resultados obtenidos en el análisis de funciones moleculares se detallan en los DAGs. Concretamente, en la Figura 35 se representa el DAG correspondiente a las funciones moleculares halladas en los genes sobre-expresados en promastigotes procíclicos y el DAG de la Figura 36 corresponde a los genes sobre-expresados en metacíclicos. En los DAGs aparecen nodos de función molecular no representados en los genes diferencialmente expresados, debido a su nivel de concreción intermedio posicionado entre aquellos que corresponden a las funciones representadas en los genes. Éstas aparecen con el rectángulo que las engloba resaltado en las Figuras 35 y 36 con el código de GO; además, se han asignado códigos propios a estos nodos para poder relacionarlos de manera simplificada con los genes diferencialmente expresados en los que aparecen (Tablas 15 y 16). Estos códigos están encabezados por la letra P en el caso de los genes sobre-expresados en promastigotes procíclicos y M en metacíclicos.

Además de los términos de función molecular, se anotaron términos controlados de procesos biológicos y se realizaron diagramas multinivel de sectores circulares (Figura 37) para ambos tipos de términos en el conjunto de genes diferencialmente expresados con un mayor o menor nivel de concreción, teniendo el límite de representación en los genes una puntuación $\alpha \geq 2$. Este análisis pone de manifiesto que ciertas funciones moleculares tales como las actividades isomerasa, nucleósido-trifosfato fosfatasa y factor de elongación de la traducción, la unión a proteínas y la constitución de los ribosomas están menos activadas en promastigotes metacíclicos (PNA⁻), al contrario que la unión a ADN, nucleótidos e iones metálicos. Algunas funciones moleculares están activadas en ambos estadios, como la unión a ATP y la actividad proteína quinasa. En la Figura 37 A y B se representan los nodos de función molecular al mayor nivel de concreción posible siempre que cumplen la condición $\alpha \geq 2$.

En cuanto a los procesos biológicos representados en los genes diferencialmente expresados, existen también coincidencias entre dichas subpoblaciones (Figura 37 C y D), ya que en ambas se sobreexpresan genes relacionados con procesos metabólicos de biopolímeros, fosforilación de aminoácidos de proteínas, transporte y procesos metabólicos de los aminoácidos. Sin embargo, los niveles de transcritos relacionados con el transporte de electrones, la biogénesis y el ensamblaje de los ribosomas, la regulación de la elongación en la traducción y los procesos de desarrollo son menores en promastigotes metacíclicos, a diferencia del transporte de aminoácidos, la respuesta al estrés y la proteólisis.

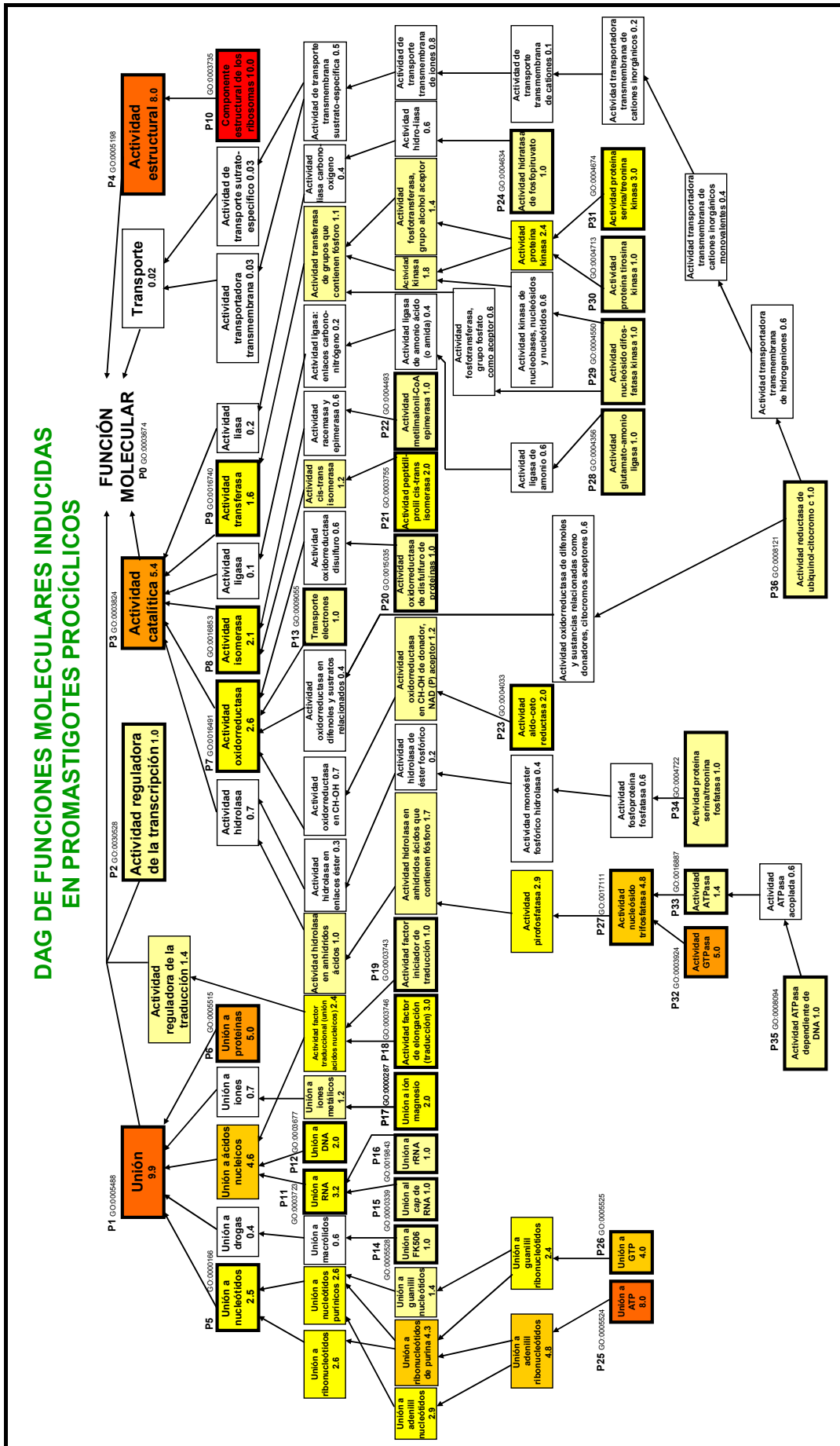


Figura 35. DAG de funciones moleculares en promastigotes procíclicos PNA+. Los nodos correspondientes a los genes diferencialmente expresados están señalados con un código propio que los relaciona con los mismos en la Tabla 15.

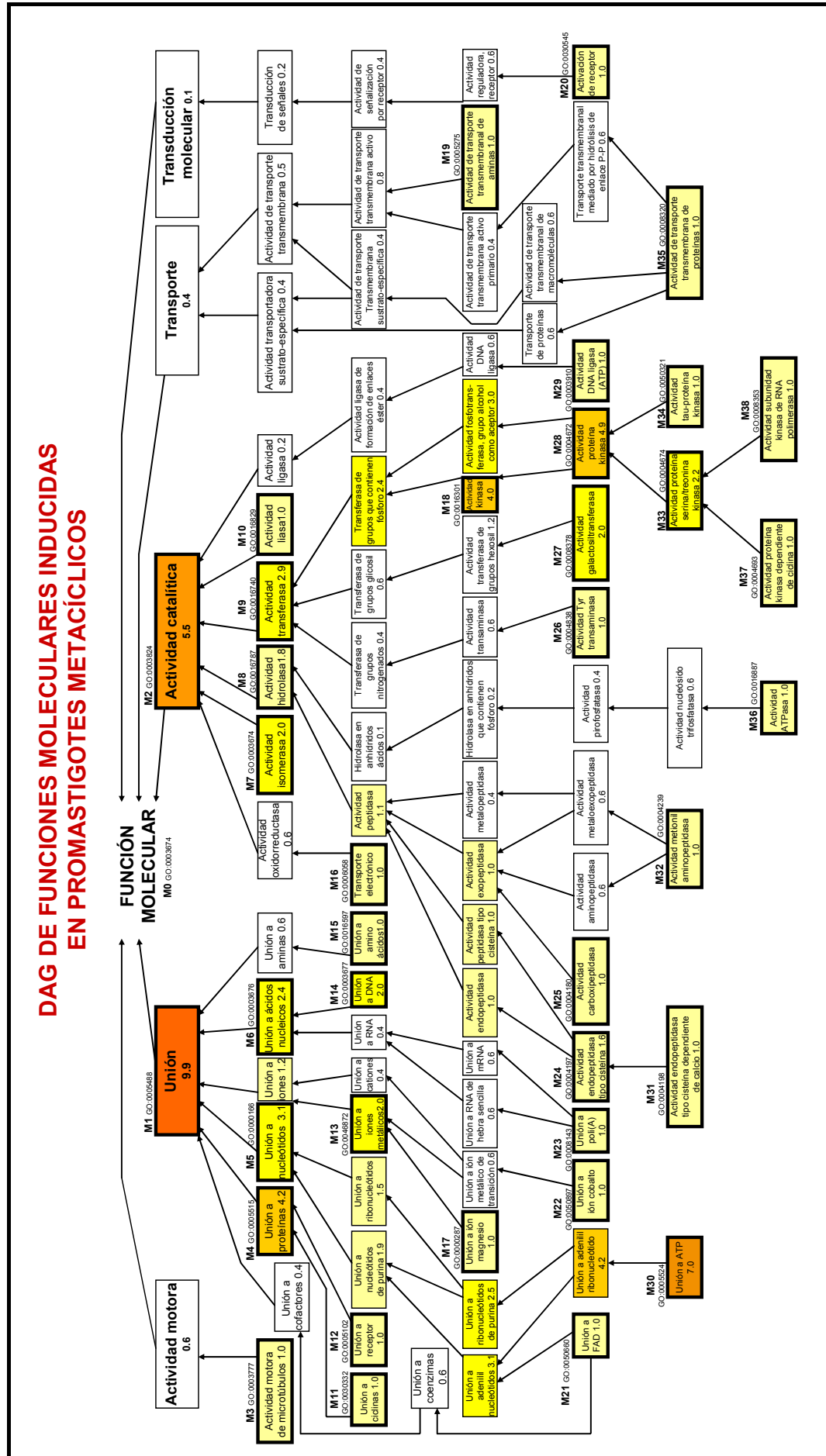


Figura 36. DAG de funciones moleculares en promastigotes metacíclicos PNA. Los nodos correspondientes a los genes diferencialmente expresados están señalados con un código propio que los relaciona con los mismos en la Tabla 16.

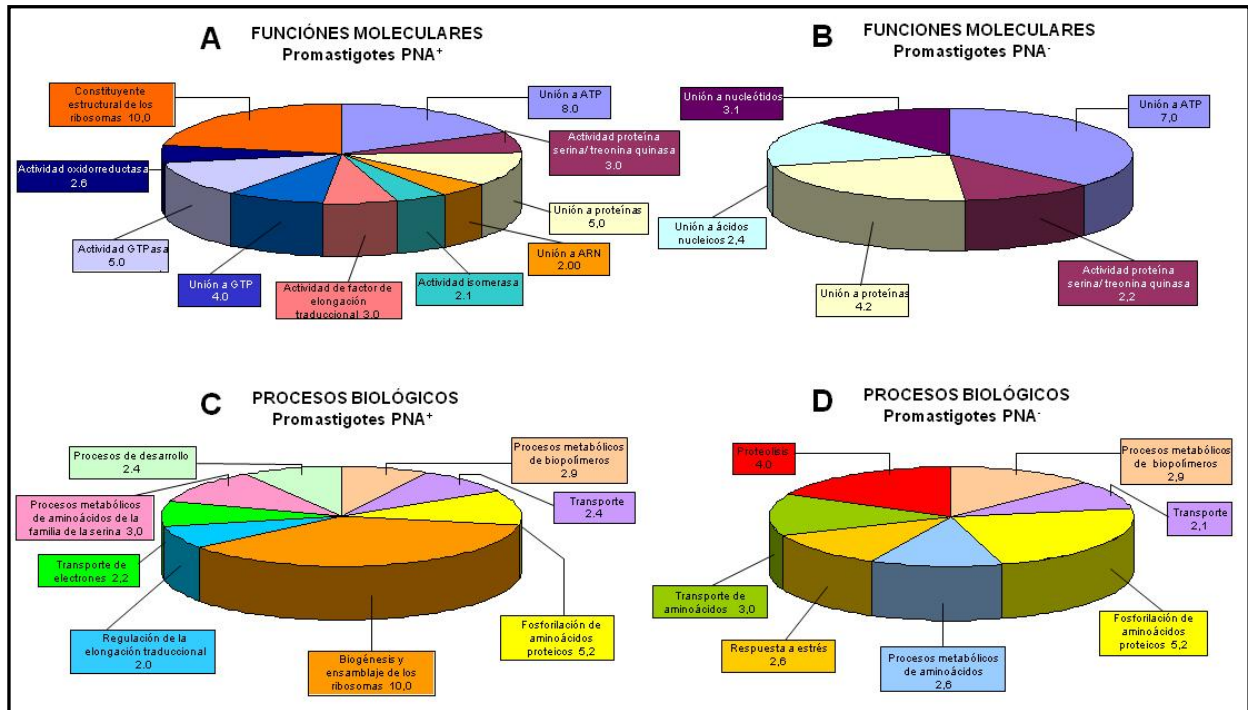


Figura 37. Diagramas de sectores circulares de las funciones moleculares y los procesos biológicos de los genes diferencialmente expresados en promastigotes PNA⁺ y PNA⁻. Los nodos de términos de GO fueron filtrados con un valor $\alpha = 2$ y representados en los diagramas de sectores circulares. (A) Términos de función molecular filtrados sobre-expresados en promastigotes procíclicos PNA⁺. (B) Términos de función molecular filtrados sobre-expresados en promastigotes metacíclicos PNA⁻. (C) Términos de procesos biológicos filtrados sobre-expresados en promastigotes PNA⁺. (D) Términos de procesos biológicos filtrados sobre-expresados en promastigotes PNA⁻.

Los perfiles de expresión génica diferencial correspondientes a genes de función conocida y su localización subcelular en los promastigotes procíclicos PNA⁺ y metacíclicos PNA⁻ se describen a continuación y se ilustran en la Figura 38.

4.4.2.1. Biosíntesis de glicoproteínas.

Algunos genes que codifican para moléculas constituyentes del glicocáliz o necesarias para su biosíntesis están sobre-expresados en promastigotes metacíclicos, de acuerdo con el análisis de hibridación con *microarrays*. En concreto, estos genes codifican para una proteína constituyente del proteofosfoglicano (PPG-Lp), dos β -1,3-galactosiltransferasas (β 1,3GalT), una glicosiltransferasa 1 (GT1) y una N-acetilglucosamina transferasa de oligosacáridos O-unidos (OGT), además de dos proteínas de la superfamilia de las amastinas (amas). Por otro lado, el gen de la fosfomanomutasa (PMM) está sub-expresado.

4.4.2.2. Proteasas.

Se han hallado cuatro genes sobre-expresados en promastigotes metacíclicos que codifican para proteasas: (i) una carboxipeptidasa de zinc de la familia M14 (Zn-M14), (ii) una cisteína endopeptidasa dependiente de calcio o calpaína μ , relacionada con la diferenciación celular, la remodelación del citoesqueleto y la transducción de señales (Ono y col., 1998; Sato y Kawashima, 2001), (iii) una

Resultados

metionina aminopeptidasa de la familia M24 (MetM24) que tiene como cofactor el cobalto y (iv) una proteína de tipo catepsina-L perteneciente a la familia A de cisteína endopeptidasas (CPA) lisosomal.

4.4.2.3. Señalización intracelular.

Al igual que la calpaína μ , varios genes relacionados con procesos de transducción de señales y progresión del ciclo celular están sobre-expresados en promastigotes metacíclicos: la proteína fosfatasa 2C (PP2C) y varias proteína kinasas A (PKA). Sin embargo, algunas proteína kinasas C y A (PKC/A) y varias proteína kinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la serina peptidasa SerP51/ciclina 1 están sub-expresadas en promastigotes metacíclicos.

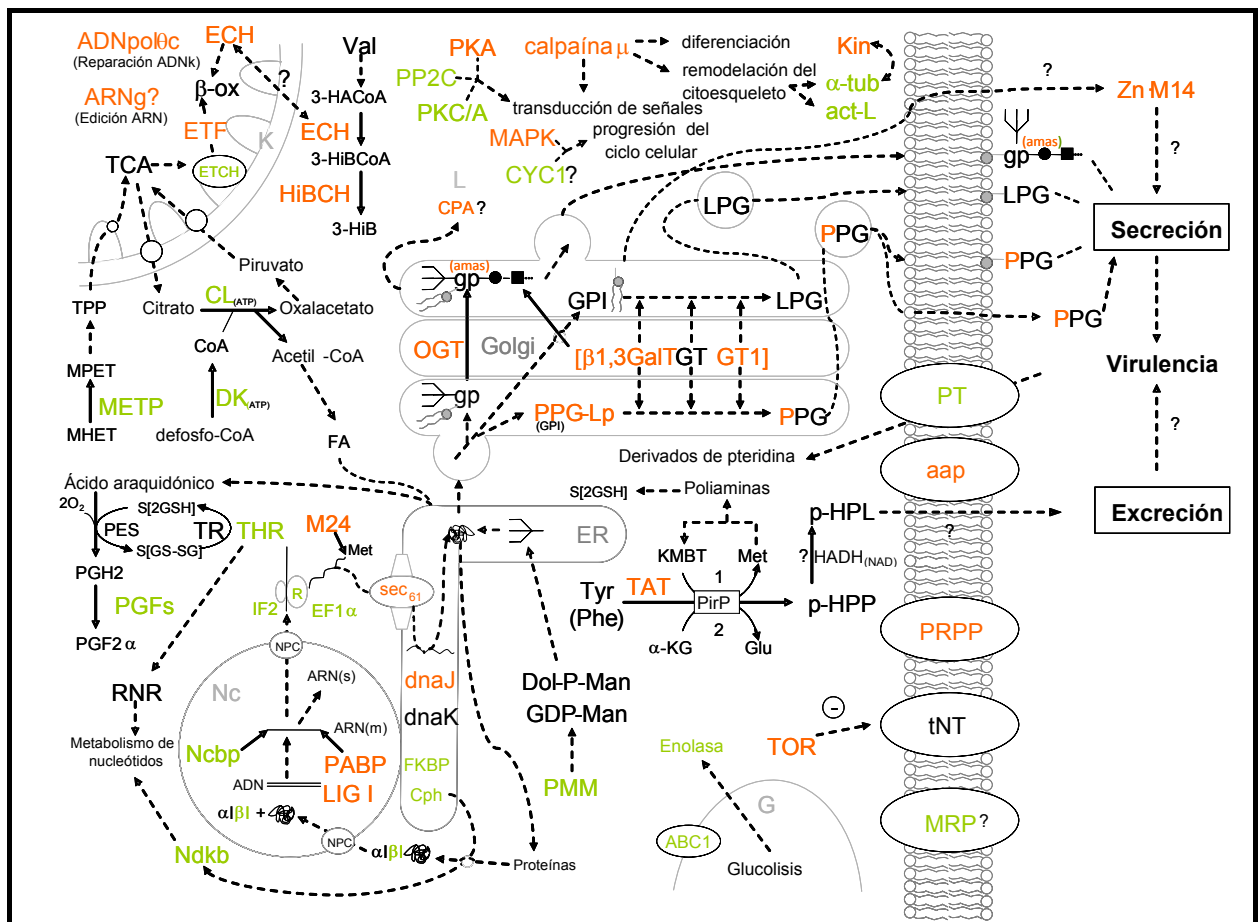


Figura 38. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial en promastigotes PNA^+ y PNA^- . Los genes sobre-expresados en promastigotes procíclicos aparecen en color verde y los sobre-expresados en metacíclicos en color rojo. Las siguientes abreviaturas no se hallan en el texto: PyrP, piridoxal fosfato; 1, transaminación de aminoácidos aromáticos (reacción de la TAT) y desaminación del KMBT a metionina; 2, desaminación del α -KG a ácido glutámico; PES, prostaglandina peróxido sintasa; TPP, tiamina pirofosfato; tNT, transportador de nucleótidos; gp, glicoproteína; R, conjunto de proteínas ribosomales diferencialmente expresadas; NPC, complejo del poro nuclear; G, glicosoma.

4.4.2.4. Metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos.

El gen de la tirosina aminotransferasa (TAT), cuya función es la desaminación de la tirosina para formar *p*-hidroxifenilpiruvato (*p*-HPP), está sobre-expresado en promastigotes PNA^- . Se ha descrito que el α -cetometiobutirato (KMBT) es capaz de actuar como aceptor del grupo amino en la reacción de

transaminación catalizada por la TAT, permitiendo así el proceso de reciclaje en la síntesis de metionina, desde donde deriva la síntesis de las poliaminas (Berger y col., 1996). El *p*-HPP es reducido a *p*-hidroxifenil-lactato (*p*-HPL), que en vez de ser degradado a succinil-CoA, como ocurre en la mayor parte de los eucariotas, es excretado en *T. cruzi*. Esta reacción de reducción es catalizada por la hidroxilácido dehidrogenasa (HADH) L-específica en este tripanosomátido. Aunque en *Leishmania* spp. no ha sido hallada esta enzima, sí se ha anotado en el genoma de *L. infantum* una HADH, aunque es D-específica. Así pues, esta vía catabólica es similar en *L. infantum* y en *T. cruzi*, salvo por la estereoespecificidad de la HADH.

Dos enoíl coenzima A hidratasa/isomerasas (ECH) están sobre-expresadas en el nivel de transcrito en promastigotes metacíclicos. Ambas participan probablemente en la β -ox, en el catabolismo de la valina o, probablemente, cada una de ellas en uno de estos procesos. Además, una flavoproteína de transferencia de electrones que participa en la etapa inicial de la β -ox está sobre-expresada en promastigotes PNA⁻. En la vía de degradación de la valina, la deshidrogenación del 3-hidroxiacil coenzima A (3-HACoA) a 3-hidroxiisobutilil coenzima A (3-HiBCoA) es catalizada por las ECH. A continuación, el 3-HiBCoA es hidrolizado mediante la hidroxiiisobutilil-CoA hidratasa (HiBCH), que también está sobre-expresada en promastigotes metacíclicos.

Sin embargo, algunos genes implicados en la síntesis de AG y algunos de sus derivados están sub-expresados en este estadio de diferenciación. Así, los niveles de transcritos de la citrato liasa aparecen sub-expresados en promastigotes metacíclicos. Este gen participa en el sistema de transporte de acetato desde la matriz mitocondrial hacia el citoplasma denominado lanzadera citrato-piruvato. Así, el citrato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) puede ser movilizado al citoplasma a través de transportadores de la mitocondria y, una vez en éste, la citrato liasa rompe un doble enlace, generando oxalacetato y acetato; además, a partir del acetato, cataliza la síntesis de acetyl-CoA, en presencia de ATP. La última reacción de síntesis de CoA es la defosforilación de la defosfocoenzima A (defosfo-CoA) mediante la defosfo-CoA kinasa (DK), cuya expresión está inducida en promastigotes metacíclicos en el nivel de transcrito. La enzima málico transforma el oxalacetato a piruvato con la intervención de la coenzima NAD(P), y el piruvato puede ser introducido en la matriz mitocondrial. Así pues, las enzimas citrato liasa y DK, que intervienen en la generación de una reserva de acetyl-CoA citosólico que se halla disponible para la síntesis *de novo* de AG, están sub-expresadas en promastigotes PNA⁻. Una vez sintetizados, los AG pueden ser desaturados en una o varias posiciones en el RE liso. Uno de los ácidos grasos poliinsaturados más importantes en cuanto al número de sus derivados biológicamente activos es el ácido araquidónico (eicosatetraenoico), del cual derivan las prostaglandinas, entre otras moléculas. Los dos genes que codifican las prostaglandina F₂ α sintasas (PGFS) se sub-expresan en promastigotes metacíclicos de *L. infantum*.

4.4.2.5. Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos, expresión génica y modificación de las proteínas.

En promastigotes metacíclicos, se sobreexpresan los genes de una proteína de unión a poli-A (PABP), una DNA ligasa I (LIG I), una proteína de unión a proteínas de choque térmico (dnaJ), una subunidad del núcleo del translocón (sec61) y la subunidad catalítica de la ADN polimerasa θ (ADNpol θ c).

Por otro lado, la tiorredoxina (THR) está sub-expresada en promastigotes PNA⁻. Esta enzima participa en la reducción de la ribonucleótido reductasa (RNR). Otros genes sub-expresados son la

Resultados

nucleósido difosfato quinasa b (Ndkb), que contiene un dominio adenosina quinasa, y dos peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas. Una de ellas es una ciclofilina (Cph) y la otra es la proteína de unión a FK-506 (FKBP). Estas dos proteínas actúan como chaperonas (Chakraborty y col., 2004) y también previenen la agregación de los dominios adenosina quinasa, como por ejemplo el contenido en la enzima Ndkb. Por último, la proteína nuclear de unión al cap (Ncbp), varias proteínas ribosomales (S2, S4 –ambas de la subunidad pequeña 40S-, L3, L7, L10a, L11, L18, L32, L36 y proteína ácida ribosomal –todas ellas de la subunidad grande 60S), el factor de iniciación de la traducción 2 (IF2) y el de elongación 1 α (EF1 α) están sobre-expresados en promastigotes PNA⁺.

4.4.2.6. Transporte y resistencia a drogas.

Los promastigotes metacíclicos muestran sobre-expresión del gen *nupm1* (TOR), que confiere resistencia a nucleósidos tóxicos de purina (Detke, 2007) mediante la inhibición de un transportador de nucleótidos (tNT). Otros genes relacionados con el transporte que aparecen sobre-expresados son una permeasa de aminoácidos (*aap*) y una fosfatasa permeasa reprimible por fosfato (PRPP), mientras que se sub-expresan dos transportadores ABC (*ABC1* y proteína de resistencia a múltiples drogas, MRP) y un gen que codifica para el dominio importina CAS/CSE o β -importina (β I), que reconoce a GTPasas Ran en el ciclo de importación a través del complejo del poro nuclear (NPC) (Vetter y col., 1999).

4.4.2.7. Generación de energía y metabolismo redox.

La expresión de algunos genes de la cadena de transporte electrónico (subunidad de 12 KDa de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa, ferredoxina 2Fe-2S y subunidad de 14 KDa del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa) disminuye en los promastigotes PNA⁺, así como una proteína de síntesis de ubiquinona. La enzima glucolítica enolasa también está sub-expresada en los promastigotes metacíclicos, al igual que la proteína de síntesis de 4-metil-5-(β -hidroxietil)-tiazol monofosfato (MPETS), que participa en la síntesis de tiamina.

Por otro lado, se ha detectado la sobre-expresión de dos genes codificantes de oxidoreductasas de función desconocida. Uno de ellos pertenece a la familia multifuncional de las oxidoreductasas de glucosa-metanol-colina (GMC), revisada por Cavener (1992).

4.4.2.8. Citoesqueleto.

En promastigotes metacíclicos, aparecen sub-expresados los transcritos de una proteína de tipo actina y una α -tubulina. Sin embargo, se sobreexpresa una kinesina (*kin*). Algunas kinesinas han sido halladas en las proximidades del bolsillo flagelar y, por lo tanto, cerca del flagelo y del kinetoplasto (Gerald y col., 2008). Además, la calpaína μ está relacionada con la remodelación del citoesqueleto, y aparece sobre-expresada en promastigotes metacíclicos, como se ha mencionado anteriormente.

4.4.2.9. ARN guía.

Los minicírculos contienen genes que codifican para pequeños ARN denominados ARN guía (ARNg). Los ARNg participan en procesos de edición de transcritos de los maxicírculos del kinetoplasto en tripanosomátidos. En el género *Leishmania*, cada molécula de minicírculo contiene un solo gen ARNg, un origen de replicación y otras secuencias conservadas (Brennicke y col., 1999). Algunos de los clones que contienen genes diferencialmente expresados en promastigotes procíclicos y metacíclicos tienen homología de secuencia con un total de cinco tipos de minicírculos (Tabla A13). Por lo tanto, algunos

ARNg están posiblemente sobre-expresados en promastigotes metacíclicos, si bien la baja complejidad de estas secuencias y su homología con algunas secuencias cromosómicas impiden afirmar que sean estos genes ARNg los diferencialmente expresados. En el Anexo VII se muestra el análisis de estas secuencias de minicírculos para la localización de los genes ARNg y el análisis de hibridación de Northern blot de uno de ellos, que sugiere también su expresión diferencial.

4.4.3. Los promastigotes PNA⁻ son más infectivos que los PNA⁺ en *L. infantum*.

Para la evaluación de los niveles de infectividad, se estimularon cultivos de la línea celular U937 con PMA y se infectaron con promastigotes PNA⁺ y PNA⁻ con una relación promastigote:macrófago 5:1. Se recogieron muestras a las 0, 24, 48 y 72 h para realizar preparaciones con Giemsa y así poder realizar recuentos para calcular el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada en cada caso (Figura 39). Para analizar las diferencias entre los dos grupos, se aplicó el test de la t de Student pareado, ya que son subpoblaciones del mismo cultivo, resultando ser significativas en cuanto a los dos parámetros a las 24 y 48 h post-infección ($p = 0.018$ y $p = 0.015$ respectivamente en cuanto al segundo parámetro) y no significativas a las 72 h ($p = 1.000$) (Figura 40).

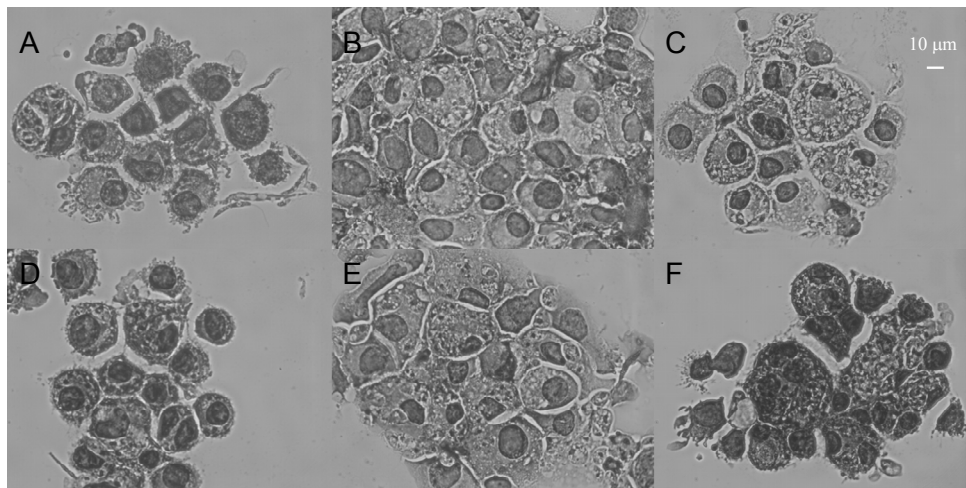


Figura 39. Infección *in vitro* de la línea celular U937 con promastigotes de *L. infantum*. (A-C) Promastigotes PNA⁺. (D-F). Promastigotes PNA⁻. (A, D) 24 h. (B, E) 48 h. (C, F) 72 h.

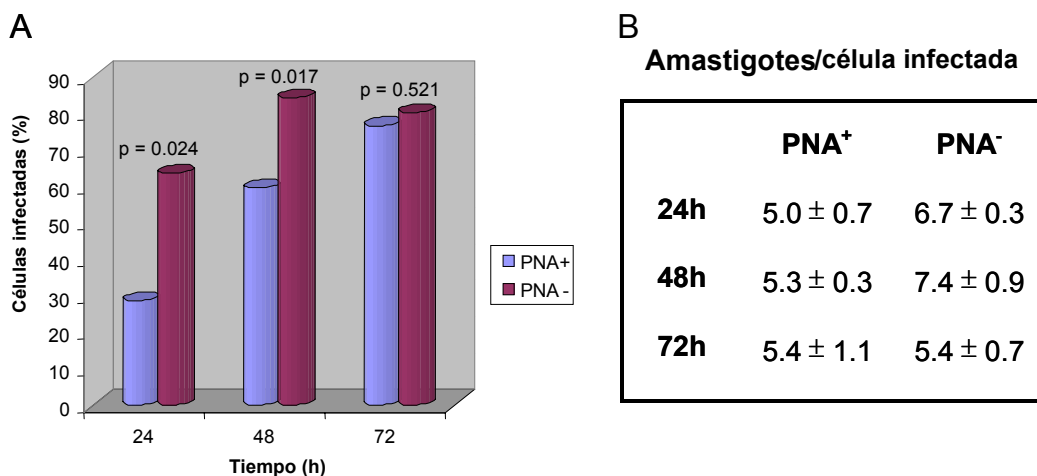


Figura 40. Infectividad de los promastigotes procíclicos y metacíclicos. (A) Proporción de células infectadas. (B) Número de amastigotes por célula.

4.5. LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL GLOBAL EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS PROMASTIGOTES A AMASTIGOTES EN *L. infantum*.

4.5.1. Crecimiento y morfología celular.

Para el análisis de la influencia de la temperatura y el pH en la variación del transcriptoma de los promastigotes, se definieron los grupos experimentales y el control del siguiente modo: 37 °C/pH4,5 ($\Delta T\Delta pH$); 37 °C/pH7,2 (ΔT); 27 °C/pH4,5 (ΔpH); y 27 °C/pH7,2, condiciones control (CC), que son las condiciones estándar de cultivo de promastigotes (27 °C, pH 7,2) (sección 3.4.3.). Cada grupo constaba de tres muestras para el análisis replicativo de hibridación con *microarrays*. Todos los cultivos correspondientes a los cuatro grupos fueron iniciados a una densidad celular de 4×10^6 promastigotes a partir de un preinóculo en fase logarítmica media. Se llevó a cabo el seguimiento diario de los cultivos con curvas de crecimiento (Figura 41) y se recuperaron los parásitos en el día 4 para su estudio. En este punto de la curva, los promastigotes del grupo CC se encontraban en fase logarítmica tardía o estacionaria temprana. Dicho grupo es el que mostró mayor crecimiento poblacional, mientras que la acidificación (grupo ΔpH) conduce a una detención de la proliferación de los parásitos. De hecho, el grupo $\Delta T\Delta pH$ mostró menor crecimiento que el grupo ΔT , por lo que la acidificación disminuye la proliferación, tanto a 27 °C como a 37 °C.

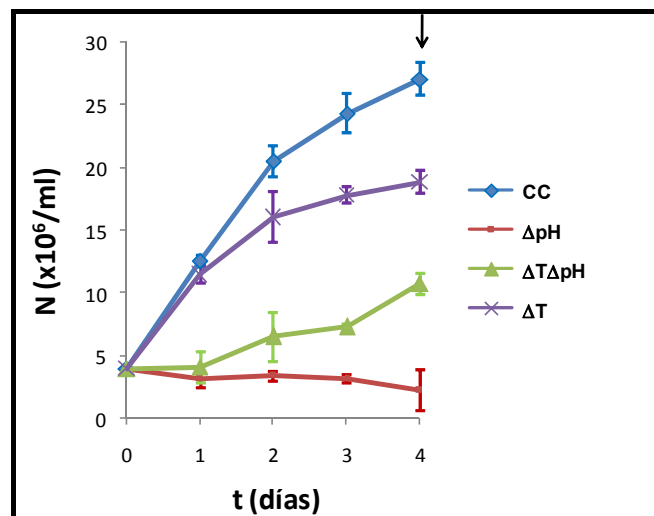


Figura 41. Curvas de crecimiento medio de los promastigotes de *L. infantum* control y los tratados con aumento de temperatura y/o acidificación. Para cada una de las condiciones, tres cultivos fueron crecidos para realizar réplicas biológicas del experimento de hibridación con *microarrays*. N es la densidad celular media. Se representa la cuasidesviación típica en cada punto de la curva. Las muestras de ARN fueron extraídas en el día 4 para tal fin. Se observa una acusada disminución del crecimiento por el efecto del pH.

La morfología de las células del grupo $\Delta T\Delta pH$ es esférica o cuasi-esférica en el día 4, si bien algunas mostraban una porción de flagelo emergente, lo que indica que la transformación al estadio amastigote no es completa (Figura 42 E-H). Estas formas generadas artificialmente cuyas características son similares pero no idénticas a las del amastigote reciben el nombre de *amastigote-like* (AL) (Somanna

y col., 2002; Pral y col., 2003). Las células del grupo ΔT pueden ser consideradas también como AL en el día 4 desde un punto de vista morfológico, si bien la longitud del flagelo y la proporción de células en las que éste emerge es mayor (Figura 42 I-L). Por último, todas las células del grupo ΔpH mostraron flagelo claramente emergente y de una longitud considerable, propia de los promastigotes en fase estacionaria. En el día 2 de cultivo se observó la detención de la proliferación y aceleración de la fase estacionaria, por lo que la acidificación inicialmente acelera la diferenciación de los promastigotes en apariencia. Sin embargo, una exposición más prolongada (día 4) da lugar a la aparición de células redondeadas, esféricas u ovoides con un contorno irregular y con un flagelo muy largo en relación con el tamaño del cuerpo celular. No obstante, persisten algunas células con la morfología del promastigote (Figura 42 M-P).

4.5.2. Expresión de la glicoproteína gp46 con el aumento de la temperatura y la acidificación.

Como primera aproximación al estudio de las formas generadas por la influencia de la temperatura y/o el pH exclusivamente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la detección de la glicoproteína de 46 KDa (gp46), también denominada antígeno de superficie del promastigote (PSA), ya que se expresa sólo en este estadio (Kahl y McMahon-Pratt, 1987). En todos los grupos excepto en $\Delta T\Delta pH$ se detectó la expresión de gp46 (Figura 42 D, H, L, P), habiendo realizado los controles pertinentes de estos ensayos. Así, ni en el grupo control ni en los experimentales se detectó fluorescencia emitida por el FITC conjugado al anticuerpo secundario cuando en la primera incubación no se añadió el anticuerpo primario (Figura 42 A, E, I, M) o cuando el que se añadió (anti-factor H del sistema del complemento de conejo) no reconoce ningún antígeno de *Leishmania* spp. (Figura 42 B, F, J, N), de modo que en ambos casos la preparación se observa de color rojo emitido por el fluoróforo de contraste azul de Evans. Sin embargo, cuando se utilizaron anticuerpos que reconocen el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA), el ensayo fue positivo, ya que se detectó la fluorescencia verde (Figura 42 C, G, K, O). Estos datos indican que $\Delta T\Delta pH$ da lugar a formas más próximas al estadio amastigote que ΔT y ΔpH a los 4 días de tratamiento.

4.5.3. Ensayos de hibridación con *microarrays* para el estudio de los perfiles de expresión génica diferencial $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH .

Se tomaron muestras de todos los cultivos de los grupos CC, $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH en el día 4 para el aislamiento de ARN total, cuya integridad y la ausencia de ADN contaminante fueron confirmadas mediante electroforesis capilar (Figura 43). Siguiendo la misma metodología que para los experimentos descritos en las secciones 4.3 y 4.4., se amplificó a continuación el ARNm (Figura 44) y se sintetizaron las mezclas de (aminoalil)_n-ADNc, a las que se acopló Cy3 en el caso del grupo CC y Cy5 en los grupos $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH . Una vez realizado el análisis de hibridación con los *microarrays* (Figura 45), se consideraron los siguientes criterios de expresión diferencial: (i) $F \geq 1.7$ (Cy5/Cy3 si Cy5 > Cy3) ó ≤ -1.7 (-Cy3/Cy5 si Cy3 > Cy5), (ii) intensidad de fluorescencia total > 5000 UF y (iii) $p < 0.05$ (Figura 46). A excepción del gen A2, que está sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$, ninguno de los genes control positivo está expresado diferencialmente; las intensidades de fluorescencia de los genes control negativo son del orden de las del *background* local medio (Tabla 18).

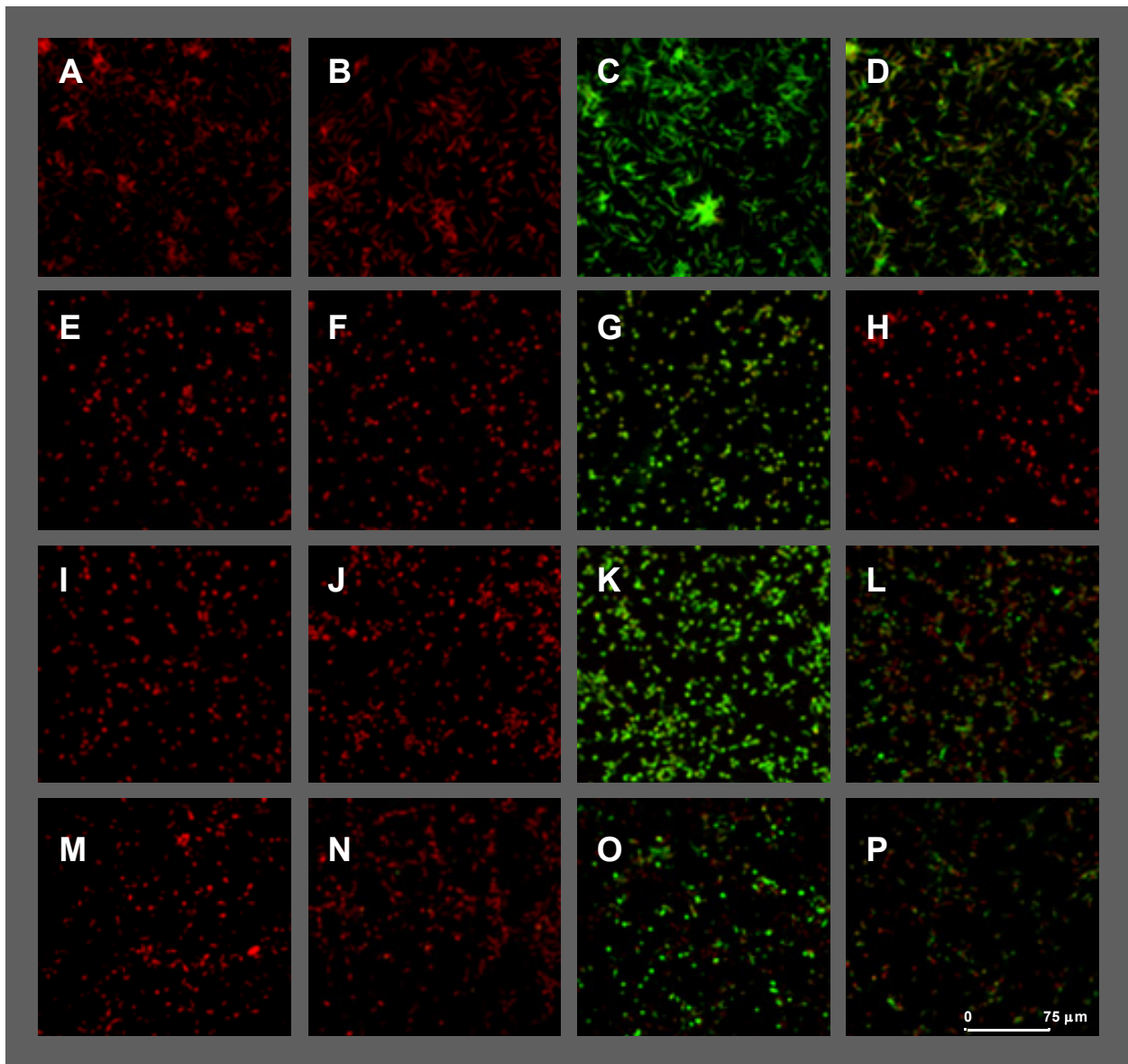


Figura 42. Inmunofluorescencia indirecta de gp46 en promastigotes control y tratados con ΔT y/o ΔpH . Las muestras de los cultivos de todas las condiciones experimentales aquí descritas (CC, $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH) fueron tomadas en el día 4 para el análisis por IFI. (A-D) CC; (E-H) $\Delta T\Delta pH$; (I-L) ΔT ; (M-P) ΔpH . Las incubaciones se realizaron como se detalla a continuación: PBS como control negativo del anticuerpo secundario (anticuerpo monoclonal FITC-anti-IgG de ratón) (A, E, I, M); anticuerpo monoclonal anti-factor H de conejo como control negativo del anticuerpo primario (B, F, J, N); anticuerpo monoclonal SIM110 anti-SLA como control positivo (C, G, K, O); y anticuerpo monoclonal anti-gp46 (D, H, L, P). La glicoproteína gp46 se expresa en CC y con ΔT y ΔpH , pero no con $\Delta T\Delta pH$.

Se secuenciaron los extremos de los clones correspondientes a los puntos seleccionados utilizando los oligonucleótidos cebadores m13pUC18 y se alinearon con la secuencia genómica de *L. infantum* con el fin de identificar secuencias génicas en dichos clones. Los datos de expresión génica diferencial en los tres experimentos se detallan en las Tablas 21-25 en el caso de los genes de función conocida. Concretamente, las Tablas 21 y 22 corresponden al perfil de expresión $\Delta T\Delta pH$, las Tablas 23 y 24 al perfil ΔT y la Tabla 25 al perfil ΔpH . Los genes que aparecen en dichas tablas tienen una o más funciones conocidas. Los genes hipotéticos o de función desconocida correspondientes a los perfiles de expresión inducidos por los dos factores analizados de forma combinada y aislada se describen en las

Tablas A14, A16 y A18 y los clones en los que no se ha resuelto qué gen está diferencialmente expresado se encuentran en las Tablas A15, A17 y A19.

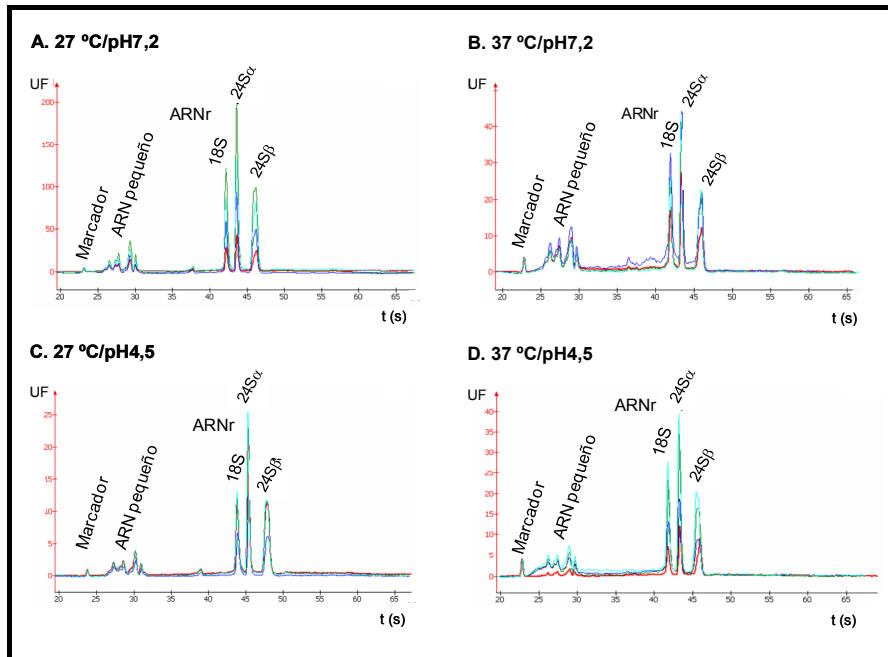


Figura 43. Electroferogramas de las muestras de ARN total obtenidas de los promastigotes tratados con $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH . El primer pico corresponde al marcador *RNA 6000 Nano Marker* (Agilent Technologies). Se aprecia la integridad del ARN por la presencia de los picos de ARNr 18S y 24S α y β con una ratio 24S/18S de aproximadamente 2,3 y ausencia de *smear* bajo delante del pico 18S. (A) CC. (B) $\Delta T\Delta pH$. (C) ΔT . (D) ΔpH . (E) ARN de las tres muestras de cada una de las condiciones experimentales.

En algunos de los clones que cumplen los requisitos fijados para ser considerados como diferencialmente expresados, aparece más de un fragmento génico y/o secuencia génica completa. Para averiguar qué gen/es de tal/es clon/es está/n diferencialmente expresado/s, se realizaron análisis por qRT-PCR. El método de cuantificación aplicado fue el ΔCt corregido con el valor de la eficiencia, que fue calculada a partir de la recta de regresión lineal. Asimismo, se realizaron análisis adicionales por este procedimiento para validar los datos de expresión génica obtenidos con los *microarrays* genómicos. Concretamente, se validó un 15% de los clones seleccionados, que supone un 12% de los genes expresados diferencialmente, dada la redundancia esperada en la estrategia de hibridación con *microarrays* genómicos obtenidos por fragmentación al azar.

Una vez analizado el efecto del aumento de temperatura y de la acidificación sobre el transcriptoma de forma individual y combinada, se realizó el análisis de significación de *microarrays* (SAM) para comparar simultáneamente los tres perfiles de expresión observados, correspondientes a $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH . De este modo, se agruparon todos los clones seleccionados en los tres análisis de *microarrays* y los genes control positivo incluidos en ellos en dos grupos: aquellos en los que existen diferencias significativas del valor de expresión génica relativa ($\text{Log}_2F \pm S$) entre los grupos experimentales y aquellos en los que no las hay. La mayor parte de los clones pertenecen al primero de los grupos. A continuación, se realizó un análisis de *clustering* jerárquico iterativo con dendrograma de soporte (HCL-ST) para cada grupo de clones que representaban genes diferencialmente expresados. Este análisis permitió confirmar lo que se puede intuir al observar la Figura 47: los perfiles de expresión

Resultados

$\Delta T\Delta pH$ y ΔT tienen un considerable parecido y son sensiblemente diferentes al perfil ΔpH . Por lo tanto, la distancia relativa de los dos primeros grupos es menor que la distancia entre $\Delta T\Delta pH$ y ΔpH .

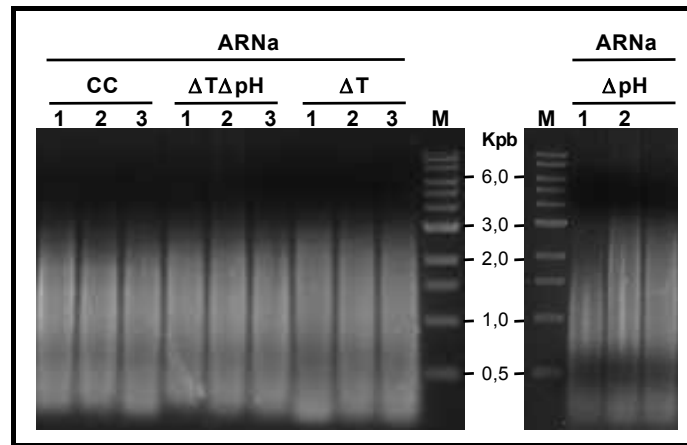


Figura 44. Análisis del ARNa a los 4 días de la exposición de los promastigotes a $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH .

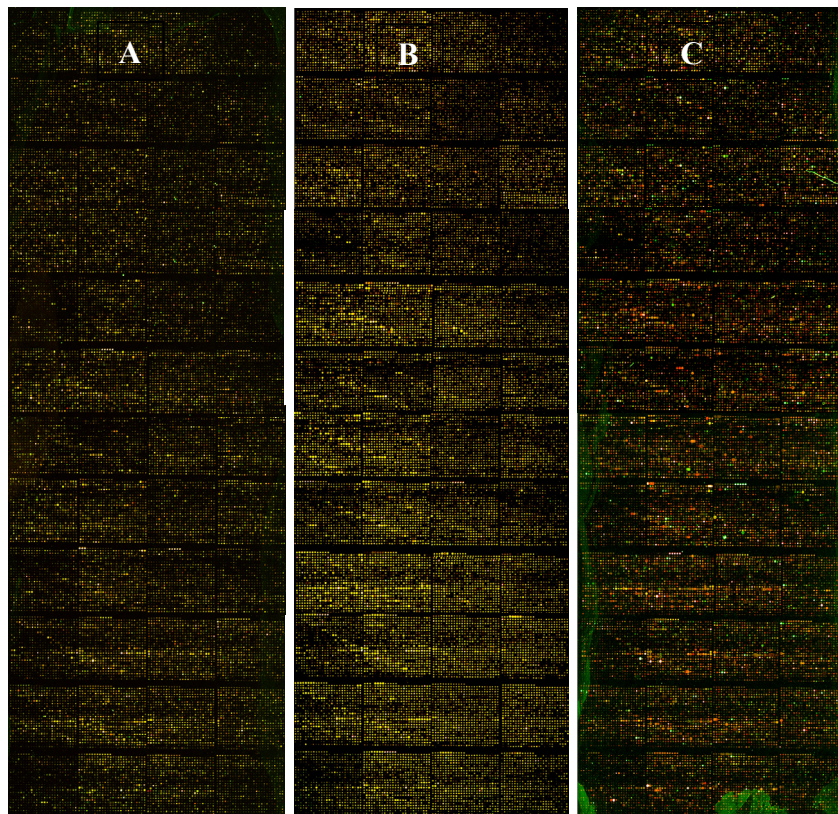


Figura 45. Imágenes de los análisis de hibridación de los ADNc de los promastigotes de *L. infantum* tratados con aumento de temperatura y/o acidificación con el de promastigotes control en *microarrays* de ADN. Se expone una réplica de cada experimento. (A) *Microarrays* de ADN de *L. infantum* hibridado con Cy3-ADNc de CC y Cy5-ADNc de $\Delta T\Delta pH$, (B) de ΔT y (C) de $\Delta T\Delta pH$.

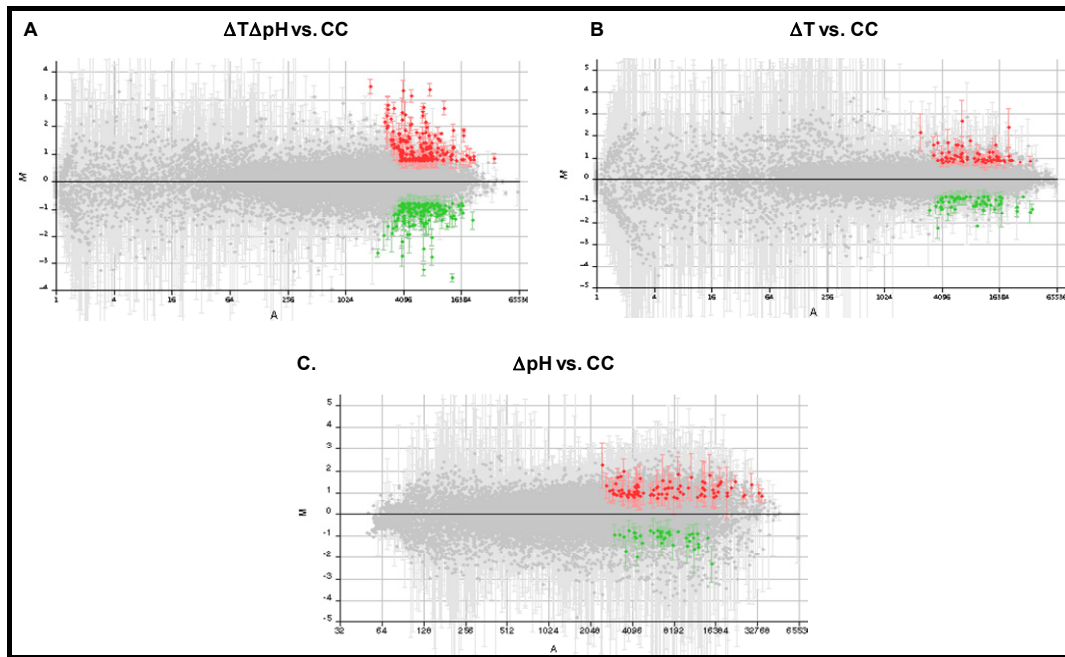


Figura 46. Diagramas de dispersión M/A de tres réplicas de los experimentos de hibridación con *microarrays* para cada una de las condiciones experimentales ($\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH). $M = (\log_2 R_i / \log_2 V_i)$ y $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i) / 2]$ (Ecuaciones 7 y 8), donde R y V son respectivamente la intensidad de fluorescencia del rojo (Cy5) y del verde (Cy3). Los puntos rojos corresponden a los puntos seleccionados que contienen fragmentos de ADN con una secuencia génica sobre-expresada en al menos 1,7 veces ($F \geq 1,7$) y los puntos verdes a sub-expresada en al menos 1,7 veces ($F \leq -1,7$) en cada condición referida a los promastigotes control (CC), cumpliendo también los requisitos de intensidad de fluorescencia de $p < 0,05$.

Tabla 18. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de los grupos $\Delta T\Delta pH$ y CC. Para los controles positivos se detalla F y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de p del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; al ser en todos los casos $p \geq 0,05$ excepto en el caso del gen A2 y el gen p36, aunque éste último presenta un valor de F menor del establecido. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	p	Control positivo
cLin79A1	-1,8 \pm 0,7	0,124	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	-1,5 \pm 0,6	0,147	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	-1,2 \pm 0,3	0,296	<i>Li p36</i>
cLin79B1	-1,3 \pm 0,1	0,010	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	-1,2 \pm 0,2	0,110	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	-1,6 \pm 0,5	0,158	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	-1,1 \pm 0,3	0,409	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	6,4 \pm 0,3	0,000	<i>Li A2</i>
cLin79C3	2,5 \pm 0,5	0,021	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	-1,3 \pm 0,4	0,249	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,2 \pm 0,2	0,163	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,1 \pm 0,3	0,576	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 \pm 0,3	0,365	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	280 \pm 113		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	65 \pm 14		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	143 \pm 25		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	215 \pm 38		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	482 \pm 108		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	199 \pm 45		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	230 \pm 171		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	83 \pm 14		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	27 \pm 7		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	45 \pm 16		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	8 \pm 3		<i>IXSSC</i>

Resultados

Tabla 19. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de los grupos ΔT y CC. Para los controles positivos se detalla F y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de p del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; como $p \geq 0,05$ en todos los casos, ninguno de los genes control positivo están diferencialmente expresados. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	p	Control positivo
cLin79A1	-1,1 \pm 0,3	0,412	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	1,1 \pm 0,4	0,385	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	-1,5 \pm 0,6	0,280	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,3 \pm 0,6	0,432	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,2 \pm 0,3	0,293	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,1 \pm 0,4	0,504	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,2 \pm 0,6	0,588	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-1,2 \pm 0,6	0,453	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,2 \pm 0,2	0,184	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,1 \pm 0,3	0,524	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	1,0 \pm 0,6	0,803	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,0 \pm 0,2	0,704	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 \pm 0,9	0,139	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	481 \pm 197		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	205 \pm 48		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	738 \pm 310		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	314 \pm 47		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	105 \pm 41		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	108 \pm 25		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	593 \pm 216		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	528 \pm 23		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	364 \pm 51		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	149 \pm 36		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	5 \pm 4		<i>IXSSC</i>

Tabla 20. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de los grupos ΔpH y CC. Para los controles positivos se detalla F y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de p del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; al ser en todos los casos $p \geq 0,05$, no hay expresión diferencial en ninguno de los genes control positivo. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	P	Control positivo
cLin79A1	-2,1 \pm 0,7	0,067	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	1,2 \pm 0,2	0,135	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	1,0 \pm 0,4	0,539	<i>Li p36</i>
cLin79B1	-4,2 \pm 0,4	0,004	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	-4,6 \pm 0,2	0,028	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,0 \pm 0,3	0,403	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	-3,8 \pm 0,4	0,017	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	2,0 \pm 1,0	0,244	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,0 \pm 0,3	0,339	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,2 \pm 0,2	0,511	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,1 \pm 0,1	0,193	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	-1,1 \pm 0,2	0,391	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,0 \pm 0,1	0,246	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	30 \pm 13		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	41 \pm 25		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	257 \pm 43		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	288 \pm 152		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	390 \pm 26		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	173 \pm 91		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	395 \pm 162		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	143 \pm 32		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	257 \pm 108		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	13 \pm 7		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	20 \pm 16		<i>IXSSC</i>

4.5.4. El perfil de expresión génica $\Delta T\Delta pH$: la exposición concomitante al aumento de temperatura y a la acidificación conduce a la diferenciación de los promastigotes a AL.

En la Figura 42 E-H se observa que el flagelo emerge ligeramente del blefaroplasto en una pequeña proporción de la población, si bien la morfología es generalmente esférica, típica de los amastigotes. Estas micrografías se tomaron a los cuatro días del inicio de la estimulación de los promastigotes con el aumento de temperatura y la acidificación, cuando los promastigotes control se encontraban en fase logarítmica tardía o estacionaria temprana en el cultivo axénico (Figura 41). Al analizar el perfil de expresión de estas formas correspondientes al grupo experimental $\Delta T\Delta pH$ respecto del grupo de promastigotes control (CC), se ha detectado la sobre-expresión del gen A2, que se incluyó como control positivo específico de los amastigotes en los *microarrays*, y la sub-expresión de los genes SbGRP y 3'NT/Nasa, lo cual coincide con los datos revisados por Zilberstein (2008) para amastigotes intracelulares. Estos datos junto a la ausencia de expresión de gp46 con $\Delta T\Delta pH$ y a las observaciones morfológicas indican que $\Delta T\Delta pH$ conduce a la diferenciación de los promastigotes a AL.

Todos los genes diferencialmente expresados por el efecto de $\Delta T\Delta pH$ fueron analizados mediante el programa informático *BLAST2GO* para asignarles términos de funciones moleculares y procesos biológicos de la base de datos GO en función de su correspondiente secuencia aminoacídica, al igual que en los análisis descritos en las secciones 4.3. y 4.4. De este modo, se puede realizar una aproximación global a la acción concomitante de estos factores sobre el transcriptoma de *L. infantum*. Este análisis ha permitido anotar funciones moleculares en algunos genes codificantes de proteínas hipotéticas. Sin embargo, la base de datos GO carece de términos de funciones moleculares y procesos biológicos correspondientes a otros genes no caracterizados funcionalmente pero conocidos en cuanto a algún criterio. Un importante ejemplo es el gen A2, incluido en los *microarrays* de *L. infantum* como gen control positivo específico de los amastigotes. Los nodos representados en los DAGs (Figura 48 y 49) que han sido directamente anotados en genes y, por lo tanto, no representan sólo la transición de unos a otros niveles de concreción, han sido numerados con códigos propios (uTPS para sobre-expresión con $\Delta T\Delta pH$, dTPS para sub-expresión con $\Delta T\Delta pH$) para poder ser relacionados directamente con los genes que los contienen (columna *Función génica anotada* de las Tablas 21 y 22).

El análisis de funciones moleculares de GO asociadas al patrón de expresión $\Delta T\Delta pH$ (Fig 50 A y B) indica que se produce un aumento de actividad galactosiltransferasa, actividad nucleósido trifosfatasa y actividad de transporte transmembranal de aminas, así como un descenso de actividad ciclasa, proteína quinasa, cisteína peptidasa relacionada a calcio (estas tres primeras actividades relacionadas con procesos de transducción de señales), factor de iniciación y de elongación de la traducción y oxidorreductasa asociada al transporte de electrones. Estos términos de función molecular anotados en genes diferencialmente expresados se pueden relacionar con los términos de procesos biológicos (Figura 50 C y D): la sub-expresión de genes relacionados con la iniciación de la traducción, la elongación y la modificación post-traduccionál indica que $\Delta T\Delta pH$ produce un descenso de los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis y la modificación de proteínas; la misma correlación entre los dos tipos de términos de GO se produce con la transducción de señales y la biosíntesis de prostaglandina F y porfirinas. También se han anotado procesos metabólicos de biopolímeros y de lípidos, de glicosilación de proteínas y de regulación de procesos celulares en genes sobre-expresados en $\Delta T\Delta pH$. Otros términos de función molecular aparecen tanto en genes sobre-expresados como sub-expresados. Dichos términos se refieren, obviamente, a diferentes genes en cada caso: la actividad transportadora de electrones se refiere

Resultados

a la citocromo b5 reductasa, sub-expresada con $\Delta T\Delta pH$, y también a la tripanotión reductasa (TR) y al transportador ABC de la subfamilia E con actividad inhibidora de ribonucleasa-L (ABCE), que están sobre-expresados; y el transporte de aminoácidos se refiere a tres transportadores, dos de los cuales están sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$ y el otro sub-expresado.

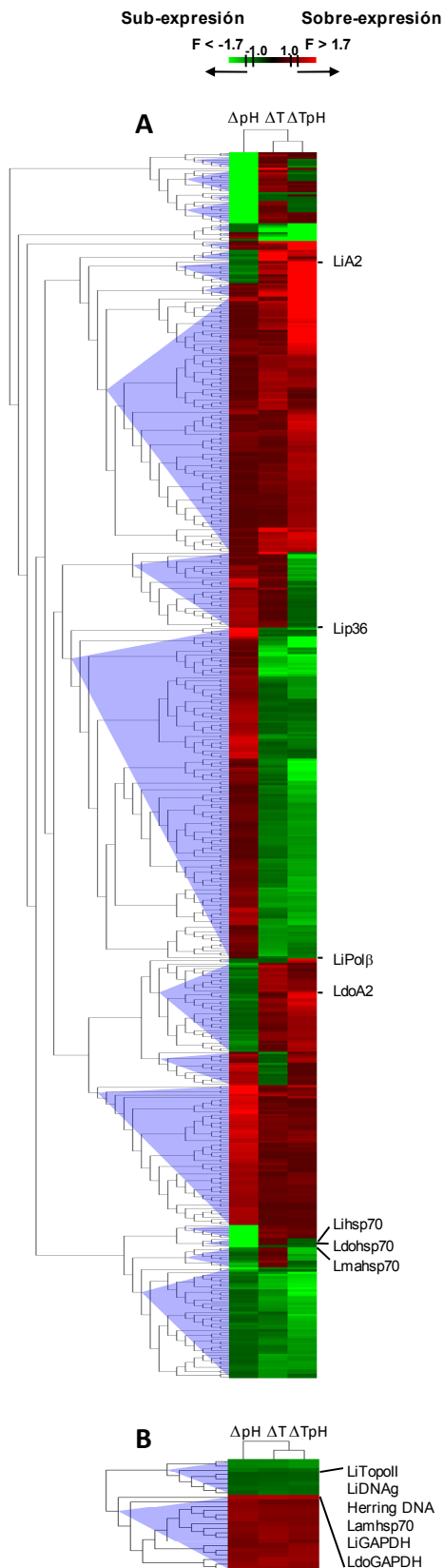


Figura 47. Análisis en serie de *microarrays* y *clustering* jerárquico de los genes diferencialmente expresados con ΔpH , ΔT y $\Delta T\Delta pH$. Después de llevar a cabo el (análisis de significación de *microarrays*) SAM para todos los grupos experimentales, se realizó el *clustering* jerárquico iterativo con dendrograma de soporte (HCL-ST) de manera independiente para (A) los genes con diferencias significativas y (B) los genes sin diferencias significativas entre los grupos según el SAM. El algoritmo ST con 100 iteraciones para la construcción y el *clustering* de la matriz de expresión génica fue aplicado en el análisis HCL-ST. Los genes con diferencias significativas en expresión génica (A) fueron agrupados en 26 *clusters* y los que presentan ausencia de diferencias significativas (B) en 2. Este análisis confirma que la similitud en el perfil de expresión génica es mayor entre $\Delta T\Delta pH$ y ΔT que entre $\Delta T\Delta pH$ y ΔpH . Los puntos control LiA2, LdoA2, Lip36, Lihsp70, Ldohsp70 y Lmahsp70 muestran diferencias significativas en la expresión génica entre los grupos experimentales (el gen A2 está sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$ y hsp70 con ΔpH), mientras que LiTopoII, LiDNAg, Lamhsp70, LiGAPDH y LdoGAPDH y *HerringDNA* no las presentan. Los clones diferencialmente expresados, todos ellos analizados con SAM y HCL-ST, se identifican en el Anexo VIII.

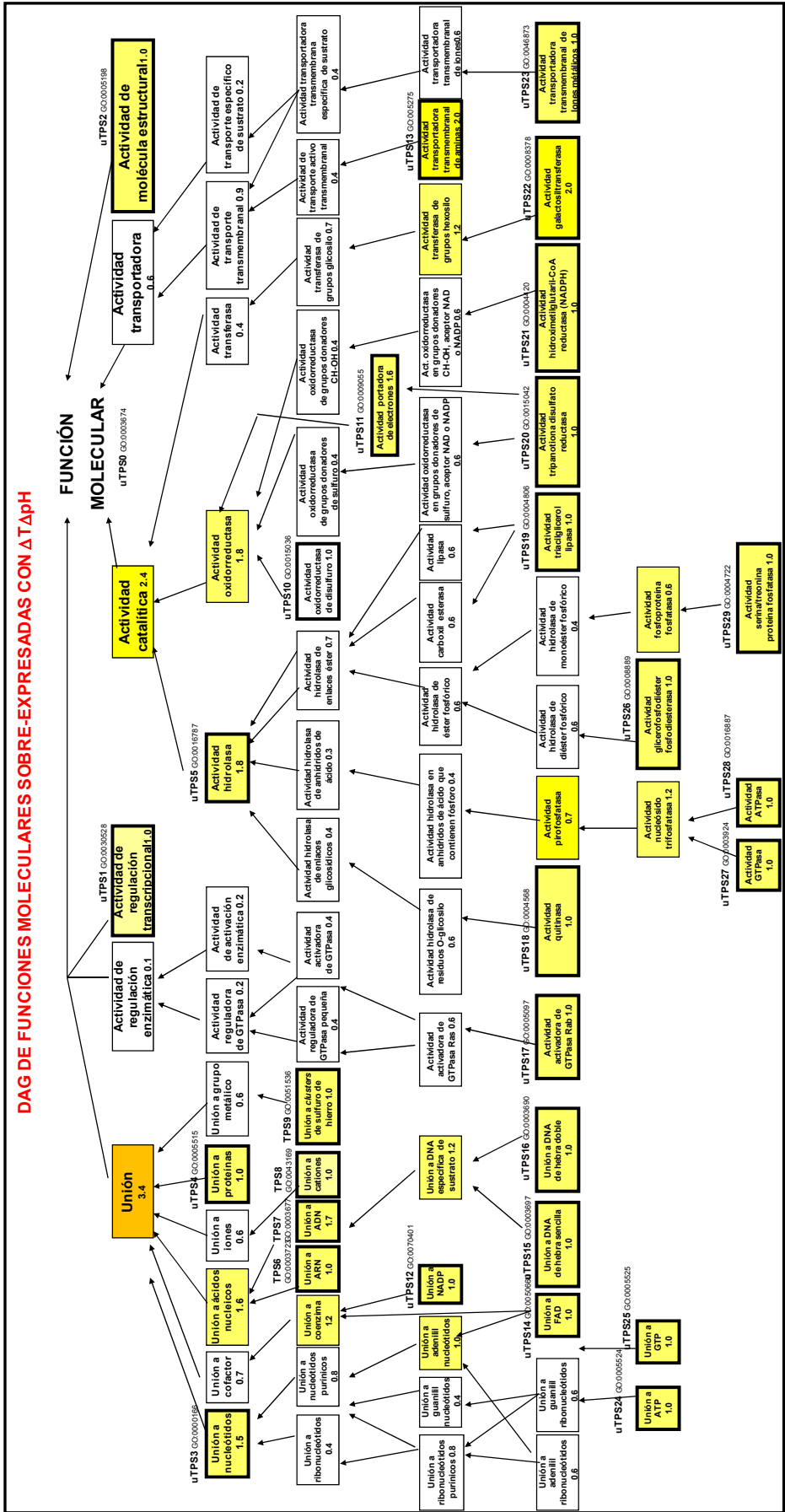


Figura 48. DAG de funciones moleculares combinadas de GO de los genes sobre-expresados con ΔTApH. Adaptados del correspondiente DAG obtenido con BLAST2GO. En este gráfico, cada nodo representa un término de función molecular de GO con un valor α, ambos en el interior de cada cuadro. Los cuadros con perímetro resaltado con trazo grueso representan los términos de GO asociados directamente a los genes sobre-expresados, mientras que los de trazo fino corresponden a los que no están directamente asociados a ninguno de tales genes pero tienen cierto parentesco en la ontología de los términos específicos de GO relacionados directamente. Se muestran los números de identificación de GO sólo de aquellos términos asociados directamente a los genes (cuadros de trazo grueso) y un código propio para identificar tales genes en la Tabla 21.

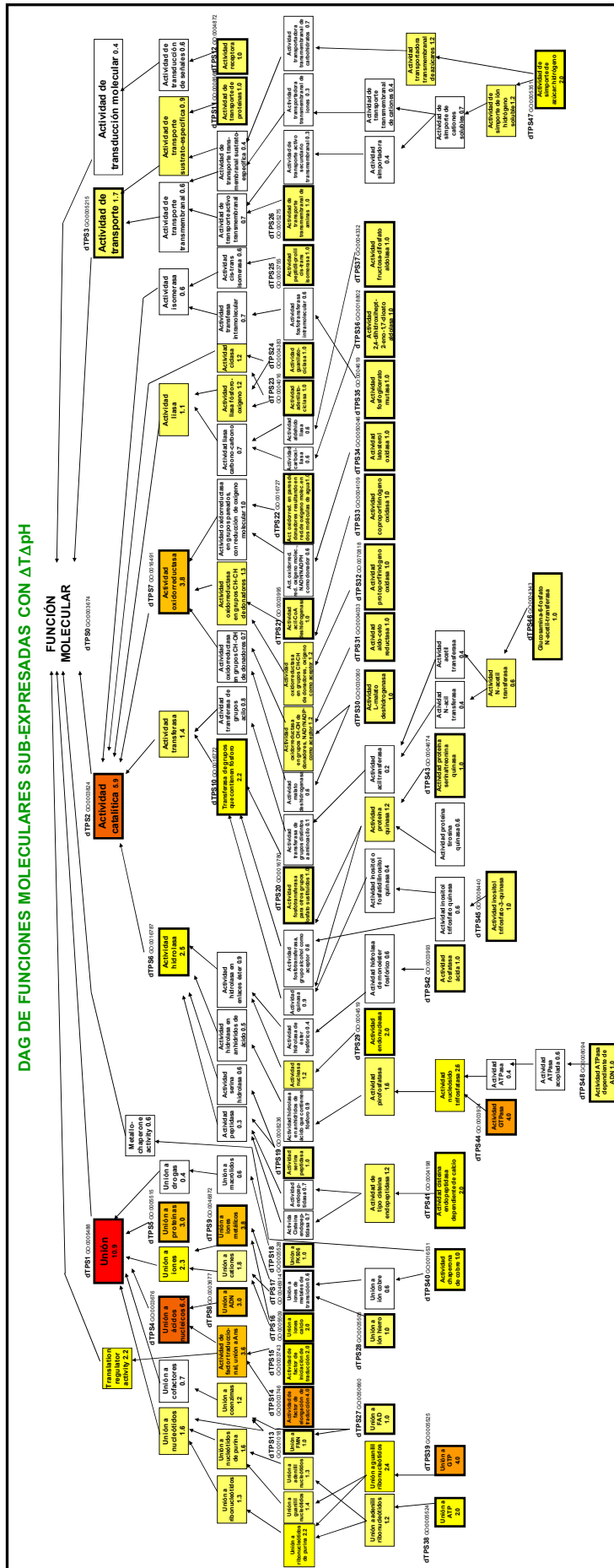


Figura 49. DAG de funciones moleculares combinadas de GO de los genes sub-expresados con ΔTaphH. Adaptados del correspondiente DAG obtenido con BLAST2GO. En este gráfico, cada nodo representa un término de función molecular de GO con un valor α , ambos en el interior de cada cuadro. Los cuadros con perimetro resaltado con trazo grueso representan los términos de GO asociados directamente a los genes sub-expresados, mientras que los de trazo fino corresponden a los que no están directamente asociados a ninguno de tales genes pero tienen cierto parentesco en la ontología de los términos específicos de GO relacionados directamente. Se muestran los números de identificación de GO sólo de aquellos términos asociados directamente a los genes (cuadros de trazo grueso) y un código propio para identificar tales genes en la Tabla 22.

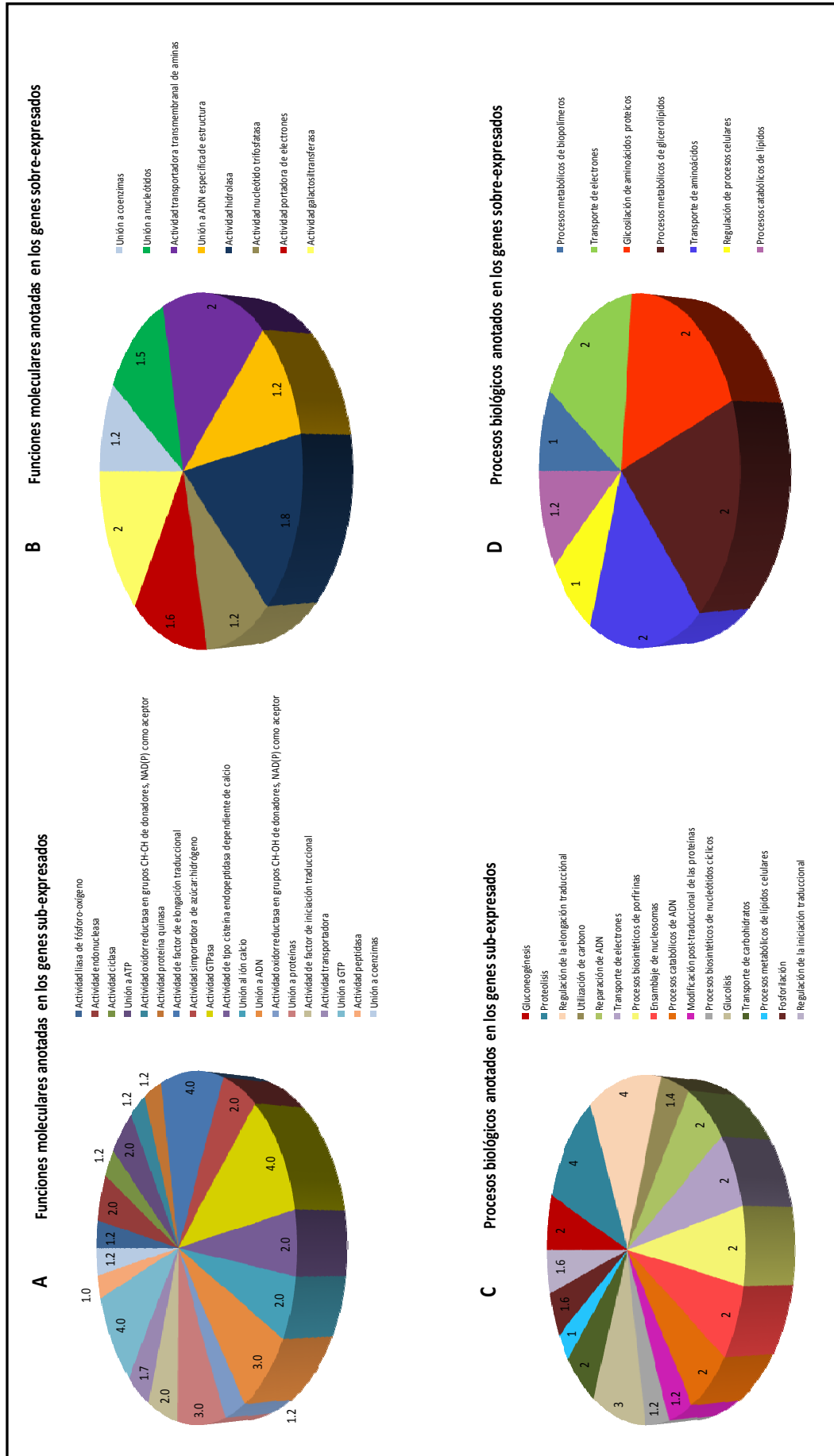


Figura 50. Diagramas de sectores multinivel de los valores α de las funciones moleculares y los procesos biológicos de GO anotadas en los genes diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$. (A) Términos de funciones moleculares de GO anotados en los genes sub-expresados con $\Delta T\Delta pH$. (B) Términos de funciones moleculares de GO anotados en los genes sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$. (C) Términos de procesos biológicos de GO anotados en los genes sub-expresados con $\Delta T\Delta pH$. (D) Términos de procesos biológicos de GO anotados en los genes sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$.

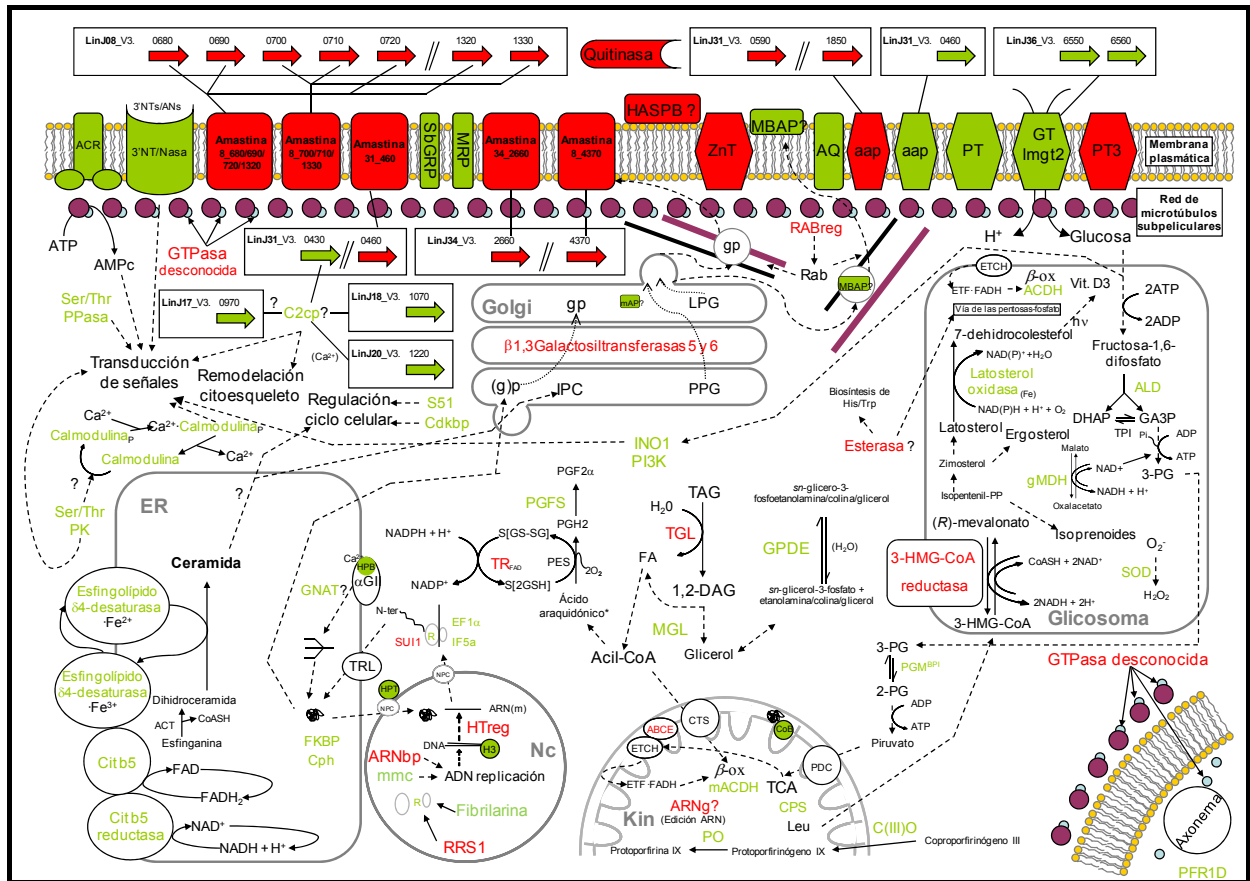


Figura 51. Esquema que representa los genes diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$ y la localización subcelular y/o relaciones funcionales de las proteínas que codifican. Los genes sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$ se representan en rojo (Cy5) y los sub-expresados en verde (Cy3).

4.5.5. Genes diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$. Los datos del análisis de hibridación con *microarrays* (Tablas 21 y 22) se exponen a continuación, teniendo en cuenta los resultados de los análisis SAM, HCL-ST (Figura 47) y de anotación de términos funcionales con *BLAST2GO* (Figura 48-50). Los genes diferencialmente expresados se ilustran en la Figura 51 según su localización subcelular y su función: superficie, citoesqueleto, rutas de secreción y procesos metabólicos y de señalización.

4.5.5.1. *Superfamilia de las amastinas*. Once genes de amastinas están sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$, diez de los cuales también lo están con ΔT , pero ninguno está diferencialmente expresado por ΔpH , como se puede observar con el análisis HCL-ST aislado para estos genes (Figura 52 A), que presentan diferencias de expresión entre los perfiles $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH según el SAM, debido exclusivamente a ΔpH en los diez genes de amastinas que se activan específicamente por ΔT y a la falta de concurrencia simultánea de ambos factores en el restante. De acuerdo con lo descrito previamente (Rochette y col., 2005), las predicciones realizadas con el programa informático *TMHMM* muestran que estas amastinas contienen cuatro dominios transmembrana, tres intracelulares y dos extracelulares, excepto el gen LinJ34_V3.1720, que contiene un largo dominio N-terminal seguido de uno transmembrana adicional a los anteriores. Los dominios externos son variables entre clases diferentes de amastinas, tanto aisladas como en *clusters* en tándem, si bien la homología es elevada dentro de una misma clase (Figura 52 B y C).

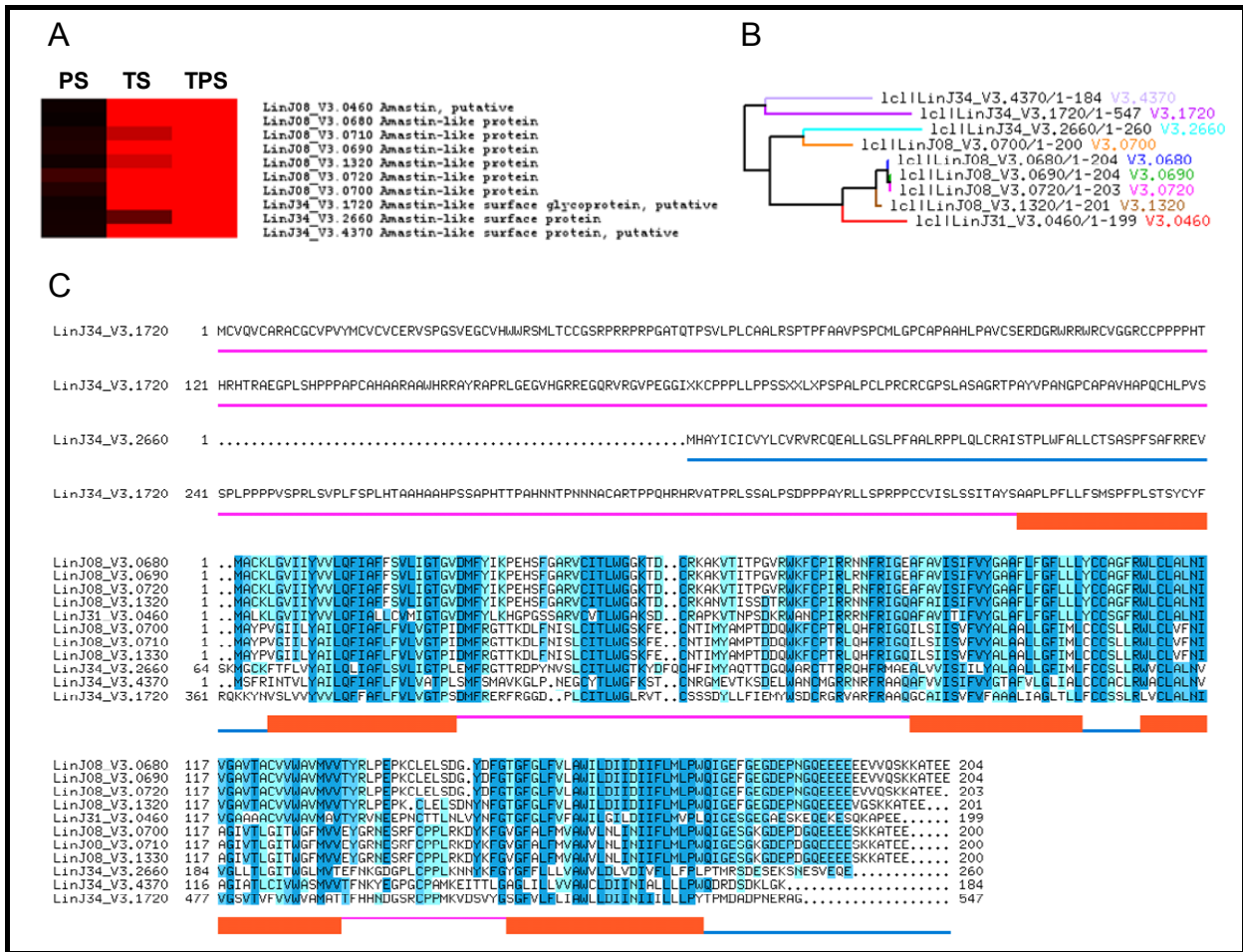


Figura 52. Secuencias de aminoácidos y análisis de los dominios de los genes de amastinas diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$ y ΔT . (A) Comparación con el programa MEV de la expresión diferencial de las once amastinas por $\Delta T\Delta pH$ y ΔT . (B) Árbol de similitud de secuencias que representa las distancias relativas entre las amastinas diferencialmente expresadas. (C) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las once amastinas con *CLUSTALW*. Cuanto mayor es el sombreado de un residuo aminoacídico, mayor es su grado de conservación. También se representan debajo del alineamiento los extremos de las regiones extracelulares, transmembranales y extracelulares predichas con *TMHMM*.

4.5.5.2. *Cluster A2-A2rel.*

La sobre-expresión del gen A2 inducida por $\Delta T\Delta pH$ es una de las evidencias a favor de que la concurrencia de ambos factores es suficiente para la diferenciación de los promastigotes a AL. Además, el análisis del perfil de expresión $\Delta T\Delta pH$ ha revelado que el gen 3' A2rel está también inducido.

4.5.5.3. *Replicación del ADN, expresión génica y vías de secreción.*

Un gen de la familia 2/3/5 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (*mmc*) está sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$ y una proteína de unión a ARN (ARNbp) está sobre-expresado. Ambos genes están relacionados con la replicación del ADN, según las anotaciones de la base de datos GO. El gen de la histona H3 LinJ16_V3.0600 está sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$. Este gen está relacionado con en el ensamblaje de los nucleosomas y la reparación del ADN (GO).

Resultados

El gen de la proteína nucleolar fibrilarina (ARNr 2'-O-metiltransferasa), que participa en el procesamiento del ARNr, está sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$. Por el contrario, el gen de la proteína reguladora de la biogénesis de los ribosomas RRS1 está sobre-expresado y, además, es suficiente la participación de ΔT para su sobre-expresión. Un gen hipotético de regulación de la transcripción (HTreg) presenta el mismo patrón de regulación con $\Delta T\Delta pH$. Su función se describe aquí por primera vez gracias al análisis basado en GO, ya que este gen figura anotado en la secuencia genómica con el nombre de proteína hipotética conservada. El factor de transcripción SUI1 (TFSUI1) está también sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH , mientras que el factor de iniciación de la traducción 5a (eIF5a) y el de elongación 1 α (eEF1 α) están sub-expresados en $\Delta T\Delta pH$. Al igual que en amastigotes intracelulares, se han detectado posibles secuencias de minicírculos con genes ARNg sobre-expresados en AL generados por $\Delta T\Delta pH$ (Tabla A20, Anexo VII).

En cuanto al procesamiento de las proteínas, $\Delta T\Delta pH$ da lugar a la sub-expresión de las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas Cph y FKBP. Estas proteínas están relacionadas con el plegamiento de las proteínas en el RE. Además, el gen de una proteína hipotética (α -GII-HPB) relacionada con la unión a calcio y la de proteínas (GO) localizada en el complejo α -glucosidasa II (término de GO de componente celular) está sub-expresada por $\Delta T\Delta pH$, al igual que el de la GNAT, que participa en la biosíntesis de oligosacáridos en el lumen del RE.

4.5.5.4. *Metabolismo energético.*

Dos transportadores de glucosa localizados en tándem en el cromosoma 36 (GT) están sub-expresados por la acción de $\Delta T\Delta pH$. Uno de los genes posee una región 5' más larga, según los alineamientos realizados mediante *CLUSTALW*. Para discernir los niveles de expresión de ambos genes mediante qRT-PCR, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos (Figura A1), uno correspondiente a esa región 5' específica de uno de ellos y otro en la secuencia común. Como resultado, se halló que ambos genes están co-regulados. $\Delta T\Delta pH$ también produce la sub-expresión de dos genes glucolíticos: la ALD y la PGM^{BPI}. Las proteínas codificadas por ambos genes son independientes de regulación por catabolito y están localizadas en el glicosoma y en el citosol respectivamente. El gen de la gMDH está también sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$, al igual que el precursor de la acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial (mACDH). El transportador ABCE, sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$, participa en el transporte electrónico (GO).

4.5.5.5. *Metabolismo de lípidos.*

La triacilglicerol lipasa (TGL) LinJ31_V3.2540 está sobre-expresada por el efecto de $\Delta T\Delta pH$ y participa en la hidrólisis de los TAGs en las posiciones *sn*-2 y *sn*-3. Cada AG liberado puede conjugarse con una molécula de CoA e ingresar en la β -ox. En este proceso catabólico, la mACDH y la Tiol I están sub-expresados. TGL tiene también como sustratos los 1,2-DAG. La monoglicérido lipasa (MGL) está sub-expresada al contrario que la TGL, pero la glicerolfosfodiéster fosfodiesterasa (GPDE) presenta el mismo patrón de regulación que MGL. Otro posible destino del exceso de AG generados por la sobre-expresión de TGL podría ser la síntesis de derivados lipídicos. Sin embargo, el gen que codifica para la esfingolípido- Δ 4-desaturasa, que oxida la dihidroceramida a ceramida en presencia de O₂ y Fe como cofactor (que pasa de estado oxidado Fe³⁺ a reducido Fe²⁺) en el RE (Ternes y col., 2002), está sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$, al igual que la citocromo b5 reductasa, que proporciona el poder reductor necesario en la reacción de la esfingolípido- δ -4 desaturasa. Otro posible destino del exceso de AG podría

ser la síntesis de derivados insaturados, como los derivados del ácido araquidónico. En el caso de las prostaglandinas, se ha sub-expresado en $\Delta T\Delta pH$ el gen PGFS LinJ31_V3.2210. En la reacción precedente, la del complejo prostaglandina peróxido sintasa (PES), se requiere la participación del tripanotión reducido, cuyo recambio es facilitado por la TR. El gen que codifica para la TR presenta, sin embargo, un perfil de expresión contrario al de PGFS, ya que se sobre-expresa con $\Delta T\Delta pH$. Las moléculas de 1,2-DAG pueden entrar en el metabolismo de los inositolfosfolípidos, en el cual participa la fosfatidil inositol trifosfato quinasa (PI3K), que está sub-expresada con $\Delta T\Delta pH$ y ΔT .

El gen de la 3- HMG-CoA reductasa está sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$. Esta reacción es limitante en la síntesis de esteroides e isoprenoides. Por su parte, el gen de la latosterol oxidasa está sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$. El producto de la reacción de la latosterol oxidasa es el 7-dehidrocolesterol, precursor del colesterol; sin embargo, estos parásitos no poseen la enzima colesterol:NAPD⁺- Δ -7 oxidorreductasa, por lo que acumulan el 7-dehidrocolesterol en el estadio promastigote (CC) (base de datos KEGG para *L. major* (Kanehisa y Goto, 2000)). Al excitar a este producto con un fotón (hv), se transforma en vitamina D3 o colecalciferol.

4.5.5.6. *Biosíntesis de porfirinas.*

De los tres genes de síntesis de porfirinas que contiene el genoma de *L. infantum*, sólo C(III)O y PO están diferencialmente expresados, concretamente sub-expresados por el efecto de $\Delta T\Delta pH$, según los datos obtenidos mediante los análisis de hibridación con *microarrays*, habiéndose detectado también la sub-expresión en amastigotes intracelulares (sección 4.3.2.4.).

4.5.5.7. *Transporte.*

Dos genes que codifican para 3'NT/Nasa localizados en tándem en el cromosoma 31 están sub-expresados en AL obtenidos por $\Delta T\Delta pH$ y ΔT . Como se ha hallado la sub-expresión en $\Delta T\Delta pH$ y ΔT , el aumento de temperatura es suficiente para desencadenar la sub-expresión de estos genes.

Además de los transportadores GT previamente mencionados, se han hallado otros diferencialmente expresados. Un gen codificante para la acuaporina (AQ) y un transportador de Zn (ZnT) están sub-expresados con $\Delta T\Delta pH$. La AQ está relacionada con cambios en el volumen y la morfología celular durante el ciclo biológico del parásito y actúa como sensor osmótico y en el transporte pasivo de solutos. Podría estar relacionado con la respuesta osmotáctica mostrada por el promastigote en el interior del tubo digestivo del vector para su migración hacia el tubo digestivo anterior (Figarella y col., 2007). Cuatro genes de permeasas de aminoácidos están diferencialmente expresados; dos de ellos están sobre-expresados (LinJ31_V3.0590 y LinJ31_V3.1580) y otros dos sub-expresados (LinJ27_V3.0530 y LinJ31_V3.0610) con $\Delta T\Delta pH$. Además, tres genes diferentes de transportadores de pteridina están también diferencialmente expresados: PT3 LinJ10_V3.0410 y PT LinJ14_V3.1440 están sobre-expresados, mientras que PT LinJ06_V3.1320 está sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$. PT3 presenta el mismo patrón de regulación sólo con ΔT . Los tripanosomátidos son auxotrofos para la pteridina y sus derivados, y por lo tanto, necesitan fuentes exógenas para estos compuestos. Por último, se ha detectado la sub-expresión de la vH⁺-PPasa con $\Delta T\Delta pH$.

Resultados

4.5.5.8. Señalización intracelular.

Se ha detectado la sub-expresión en AL generados por $\Delta T\Delta pH$ de una adenilato ciclasa de tipo receptor (ACR) y de una serina/treonina proteína fosfatasa (Ser/Thr PPasa) y tres cisteína peptidasas o calpaínas de la familia C2 (calpaína μ o C2cp). Además, los genes que codifican la calmodulina y una serina/treonina proteína quinasa (Ser/Thr PK) están sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$, los cuales podrían estar relacionados. La Ser/Thr PK mencionada está también sub-expresada por ΔT .

4.5.6.9. Citoesqueleto y flagelo.

Ciertos genes relacionados con la estructura flagelar y el vástago paraflagelar están sub-expresados por $\Delta T\Delta pH$: la coronina, el gen DynLC LinJ36_V3.2010 y LinJ26_V3.1000 y la PFR1D. Ésta última está también sub-expresada con ΔT . Un gen desconocido que codifica para una GTPasa asociada a tubulina según el análisis de GO está sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$, así como una proteína reguladora de una GTPasa Rab (RABreg). Se ha descrito que un análogo de la Rab GTPasa en *L. major* está relacionado con la patogenia probablemente, ya que el transporte vesicular es esencial para la obtención de nutrientes, la liberación de factores de virulencia, la resistencia a agentes microbicidas y la evasión de la respuesta inmunológica (Chenik y col., 2006). Además, las calpaínas están relacionadas con la remodelación del citoesqueleto y la transducción de señales en parásitos kinetoplástidos (Ono y col., 1998; Sato y Kawashima, 2001; Ersfeld y col., 2005). C2cp LinJ20_V3.1230 está sub-expresada en $\Delta T\Delta pH$ y sobre-expresada en promastigotes metacíclicos como se ha visto con anterioridad. La C2cp LinJ20_V3.1230 está sub-expresada en $\Delta T\Delta pH$.

Tabla 21. Genes de función conocida sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$ (día 4) en *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes sobre-expresados que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida con el efecto combinado del aumento de la temperatura y del descenso del pH. Las características que se describen de cada clon son: número de clon; cociente de intensidades ($F \geq 1,7$); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); p , valor p del test de la t con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de GenBank GSS; valores e del alineamiento en BLAST de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (F_w) y *downstream* (R_v); definición del clon (Def.) en función de su alineamiento y ensamblaje (a , b o c ; sección 4.2.); anotaciones (identificadores GeneDB), las correspondientes funciones génicas y los códigos entre paréntesis que se relacionan con la Figura 48, donde se asocian a los términos de la base de datos Gene Ontology asociados a tales funciones; resultados de la qRT-PCR. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+). Los genes en negrita están también sobre-expresados con ΔT . (Comienza en la pág. siguiente).

Resultados

Tabla 22. Genes de función conocida sub-expresados con $\Delta T\Delta pH$ (día 4) en *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes sub-expresados que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida con el efecto combinado del aumento de la temperatura y del descenso del pH. Las características que se describen de cada clon son: número de clon; cociente de intensidades ($F \leq -1,7$); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); p , valor p del test de la t con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de *GenBank* GSS; valores e del alineamiento en *BLAST* de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (Fw) y *downstream* (Rv); definición del clon (Def.) en función de su alineamiento y ensamblaje (a , b o c ; sección 4.2.); anotaciones (identificadores *GeneDB*), las correspondientes funciones génicas y los códigos entre paréntesis que se relacionan con la Figura 49, donde se asocian a los términos de la base de datos *Gene Ontology* asociados a tales funciones; resultados de la qRT-PCR. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+). Los genes en **negrita** están también sobre-expresados con ΔT .

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada (Términos de GO en la Figura 49)	qRT-PCR	
					Fw	Rv				+/-	F ± S
Lin1G8	-1,80	-0,8 ± 0,1	0,009	GS598905	5e-35	8e-31	b	LinJ22_V3.1340	Serina/treonina proteína fosfatasa, putativa (dTPS6)	N.D.	
Lin4F4	-2,27	-1,2 ± 0,3	0,016	GS598906	0	0	a	LinJ31_V3.0430	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C2, putativa (dTPS0)	+	-3,3 ± 0,1
Lin9B9	-1,71	-0,8 ± 0,2	0,015	GS598907	5e-26	0	a	LinJ36_V3.1010	Cadena pesada de la dineína, putativa (dTPS0)	N.D.	
Lin15D6	-2,05	-1,0 ± 0,2	0,042	GS598908	0	0	a	LinJ31_V3.0610	Transportador de aminoácidos aATP11, putativa (dTPS0)	N.D.	
Lin22B1	-2,03	-1,0 ± 0,2	0,016	GS598909	0	0	a	LinJ23_V3.1390 LinJ23_V3.1400	Proteína hipotética conservada Coronina, putativa (dTPS0)	N.D. +	-4,9 ± 0,7
Lin21H10	-1,90	-0,9 ± 0,1	0,001	GS598910	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido A4-desaturasa, putativa (dTPS22)	N.D.	
Lin24E10	-1,80	-0,8 ± 0,3	0,038	GS598911	0	0	b	LinJ22_V3.1310 LinJ22_V3.1320	Proteína de tipo autoantígeno I/6 (dTPS0) Proteína hipotética conservada	+	-6,7 ± 0,9
Lin27B2	-1,80	-0,8 ± 0,3	0,034	GS598912	0	-	c	LinJ35_V3.1230	Deshidrogenasa de cadena corta, putativa (dTPS1, dTPS7)	+	-3,2 ± 0,7
Lin28C5	-1,81	-0,9 ± 0,1	0,005	GS598913	0	2e-154	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido A4-desaturasa, putativa (dTPS22)	N.D.	
Lin31H9	-1,94	-1,0 ± 0,1	0,006	GS598914	0	0	b	LinJ26_V3.0980 LinJ26_V3.0990 LinJ26_V3.1000	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética Cadena pesada de la dineína, putativa (dTPS0)	N.D. N.D. +	-6,2 ± 0,8
Lin36A9	-2,15	-1,1 ± 0,2	0,009	GS598915	0	0	b	LinJ26_V3.0980 LinJ26_V3.0990 LinJ26_V3.1000	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética Cadena pesada de la dineína, putativa (dTPS0)	N.D. N.D. +	-6,2 ± 0,8
Lin40G12	-1,92	-0,9 ± 0,2	0,013	GS598916	2e-161	0	b	LinJ23_V3.1550 LinJ23_V3.1560	Proteína hipotética de función desconocida Proteína de tipo latosterol oxidasa (dTPS28, dTPS30)	N.D. +	-14,3 ± 1,7
Lin47D8	-4,00	-2,0 ± 0,5	0,023	GS598917	0	0	a	LinJ06_V3.1330 LinJ06_V3.1340	Coproporfirinógeno III oxidasa, putativa (dTPS33) Proteína de tipo protoporfirinógeno oxidasa (dTPS13, dTPS32)	+	-5,8 ± 0,1
Lin49B7	-4,38	-2,1 ± 0,0	0,000	GS598918	0	4e-64	a	LinJ34_V3.4160	Proteína de tipo fosfatidilinositol-3-kinasa (tor2) (dTPS0)	N.D.	
Lin50H7	-2,32	-1,2 ± 0,1	0,005	GS598919	7e-164	0	b	LinJ28_V3.2380	Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-difosfoglicerato (dTPS9, dTPS35)	+	-3,4 ± 0,3
Lin60B1	-3,84	-1,9 ± 0,1	0,001	GS598920	0	0	c	LinJ28_V3.2390 LinJ31_V3.2370 LinJ36_V3.7040	Proteína de unión a quinasa dependiente de ciclina (dTPS0) 3'-nucleotidasa/nucleasa (dTPS4, dTPS29) Proteína hipotética conservada	+	-127,4 ± 7,4
Lin60E5	-1,80	-0,8 ± 0,3	0,035	GS598921	0	0	b	LinJ26_V3.0970	Proteína hipotética conservada/HPB (dTPS5, dTPS16)	N.D.	
Lin63F3	-2,95	-1,6 ± 0,4	0,018	GS598922	0	0	b	LinJ36_V3.6550 LinJ36_V3.6560	Transportador de glucosa lmg2, putativo (dTPS47) Transportador de glucosa, putativo (dTPS47)	+	-8,1 ± 1,1
Lin66F10	-2,18	-1,1 ± 0,0	0,000	GS598923	0	0	b	LinJ36_V3.6550 LinJ36_V3.6560	Transportador de glucosa lmg2, putativo (dTPS47) Transportador de glucosa, putativo (dTPS47)	+	-8,1 ± 1,1
Lin80B3	-2,06	-1,0 ± 0,3	0,024	GS598924	0	0	b	LinJ28_V3.3250	Glucosa-6-fosfato-N-acetiltransferasa, putativa (dTPS46)	N.D.	
Lin82C6	-1,74	-0,8 ± 0,3	0,038	GS598925	0	-	c	LinJ31_V3.0440	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C2, putativa (dTPS0)	+	-3,3 ± 0,1
Lin84E8	-2,26	-1,2 ± 0,2	0,007	GS598926	0	0	a	LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29) Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativo (dTPS4, dTPS29)	+	-4,6 ± 0,4
Lin86H3	-2,17	-1,1 ± 0,1	0,004	GS598927	0	8e-130	b	LinJ31_V3.0950	Proteína de resistencia a estibogluconato sódico, putativa (dTPS)	N.D.	
Lin89F9	-2,93	-1,6 ± 0,4	0,026	GS598928	0	0	b	LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29) Precursor de 3'-nucleotidase/nuclease, putativo (dTPS4, dTPS29)	+	-4,6 ± 0,4
Lin92D7	-2,27	-1,2 ± 0,2	0,005	GS598929	0	0	b	LinJ31_V3.2390 LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	Proteína de tipo helicasa 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29) Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29)	N.D. +	-2,7 ± 0,6
Lin92G9	-2,29	-1,2 ± 0,1	0,004	GS598930	0	0	a	LinJ31_V3.2390 LinJ06_V3.1320 LinJ06_V3.1330	Proteína de tipo helicasa Transportador de pteridina, putativa (dTPS0) Coproporfirinógeno III oxidasa, putativa (dTPS33)	N.D. +	-2,1 ± 0,3
Lin97D1	-11,57	-3,5 ± 0,2	0,001	GS598931	0	0	a	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo (dTPS0)	+	-2,1 ± 0,3
Lin97F6	-1,80	-0,8 ± 0,3	0,029	GS598932	0	0	b	LinJ26_V3.0460	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin98C7	-2,12	-1,1 ± 0,5	0,044	GS598933	0	0	b	LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29) Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativo (dTPS4, dTPS29)	+	-4,6 ± 0,4
Lin98F9	-2,43	-1,3 ± 0,3	0,016	GS598934	2e-190	1e-101	b	LinJ31_V3.2390 LinJ32_V3.3120	Proteína de tipo helicasa Subunidad del complejo de mantenimiento de micromosomas (mmc), putativa (dTPS8, dTPS38, dTPS48)	N.D. N.D.	
Lin98G10	-2,13	-1,1 ± 0,2	0,015	GS598935	0	0	b	LinJ30_V3.2770 LinJ30_V3.2780	Proteína hipotética conservada Superóxido dismutasa, putativa (dTPS0)	N.D. +	-3,7 ± 0,1
Lin101B5	-2,62	-1,4 ± 0,3	0,011	GS598936	0	0	b	LinJ09_V3.0650	Serina peptidasa familia S51, peptidasa E, putativa (dTPS19)	N.D.	
Lin105A3	-2,22	-1,1 ± 0,1	0,005	GS598937	0	0	b	LinJ36_V3.1320	Fructosa-1,6-difosfato aldolasa (dTPS37)	N.D.	
Lin105B9	-6,13	-2,6 ± 0,2	0,001	GS598938	0	0	a	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo (dTPS0)	+	-2,1 ± 0,3
Lin109F4	-3,16	-1,7 ± 0,5	0,024	GS598939	0	0	a	LinJ06_V3.1330	Coproporfirinógeno III oxidasa, putativa (dTPS33)	+	-5,8 ± 0,1
Lin111C2	-3,14	-1,7 ± 0,1	0,001	GS598940	0	0	b	LinJ09_V3.0650	Proteína de tipo protoporfirinógeno oxidasa (dTPS13, dTPS32)	+	-2,2 ± 0,4
Lin111F3	-2,09	-1,1 ± 0,4	0,035	GS598941	0	0	a	LinJ09_V3.0650	Serina peptidasa familia S51, peptidasa E, putativa (dTPS19)	N.D.	
Lin125H5	-1,95	-1,0 ± 0,2	0,022	GS598942	0	0	b	LinJ31_V3.2210	Prostaglandina F2α sintetasa (dTPS31)	N.D.	
Lin144F11	-2,28	-1,2 ± 0,1	0,004	GS598943	0	0	a	LinJ36_V3.1590	Serina/treonina proteína fosfatasa, putativa (dTPS43)	N.D.	
Lin144H10	-1,85	-0,9 ± 0,1	0,007	GS598944	0	0	a	LinJ31_V3.2210 LinJ22_V3.1300	Prostaglandina F2α sintetasa (dTPS31) Ciclofilina, putativa (dTPS0)	N.D. +	-4,1 ± 0,6
Lin144H11	-2,32	-1,2 ± 0,1	0,003	GS598945	0	0	b	LinJ19_V3.1310	Proteína de tipo autoantígeno I/6 (dTPS0)	N.D.	
Lin150E4	-1,86	-0,9 ± 0,4	0,048	GS598946	0	0	b	LinJ36_V3.2700	Fosfatasa ácida unida a la membrana (dTPS42)	N.D.	
Lin153D1	-1,80	-0,8 ± 0,1	0,002	GS598947	0	0	b	LinJ13_V3.1060	Calmodulina, putativa (dTPS16)	N.D.	
Lin155H12	-2,52	-1,3 ± 0,4	0,024	GS598948	0	0	a	LinJ27_V3.0530	Aminoácido permeasa, putativa (dTPS26)	N.D.	
Lin157D8	-2,78	-1,5 ± 0,2	0,005	GS598949	0	0	b	LinJ36_V3.0250	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, putativa (dTPS18, dTPS25)	N.D.	
Lin158A10	-2,40	-1,3 ± 0,2	0,008	GS598950	0	0	b	LinJ31_V3.2370 LinJ23_V3.0870	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29) Proteína hipotética conservada	+	-4,6 ± 0,4

Continuación Tabla 22

Lin177E10	-1,72	-0,8 ± 0,3	0,042	GS598951	7e-167	0	b	LinJ16_V3.0600 LinJ16_V3.0610	Histona H3, putativa (dTPS8) Histona H3, putativa (dTPS8)	N.D. N.D.
Lin182F2	-2,18	-1,1 ± 0,3	0,022	GS598952	0	0	b	LinJ25_V3.0740 LinJ25_V3.0750	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 5a, putativo (dTPS15) Factor eucariótico de iniciación de la traducción 5a, putativo (dTPS15)	N.D. N.D.
Lin187C10	-4,02	-2,0 ± 0,3	0,003	GS598953	0	0	b	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativa (dTPS0)	+ -2,1 ± 0,3
Lin193E6	-2,00	-1,0 ± 0,4	0,040	GS598954	0	0	b	LinJ23_V3.1230	SHERP (dTPS0)	N.D.
Lin194A4	-1,70	-0,8 ± 0,2	0,016	GS598955	0	1e-11	b	LinJ22_V3.1270	Acuaporina, putativa (dTPS3)	N.D.
Lin197D2	-3,32	-1,7 ± 0,3	0,007	GS598956	0	0	b	LinJ07_V3.0150	Precursor mitocondrial de la acil-CoA deshidrogenasa, putativo (dTPS21, dTPS27)	+ -2,4 ± 0,2
								LinJ07_V3.0160	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ07_V3.0170	Proteína de la familia <i>maoc</i>	- -1,1 ± 0,3
Lin206C10	-1,99	-1,0 ± 0,3	0,032	GS598957	6e-69	1e-82	b	LinJ07_V-0930	N-acetilglucosamina fosfato mutasa, putativa	N.D.
								LinJ07_V3.0940	Proteína de tipo citocromo b5 (dTPS0)	+ -1,7 ± 0,0
Lin206H7	-1,90	-0,9 ± 0,2	0,015	GS598958	0	0	b	LinJ31_V3.1240	Pirofosfatasa traslocadora de protones de tipo vacuolar 1, putativa (dTPS0)	+ -3,4 ± 0,7
								LinJ31_V3.1250	Proteína hipotética de función desconocida	N.D.
Lin208F2	-2,10	-1,1 ± 0,3	0,026	GS598959	2e-86	3e-64	b	LinJ31_V3.1240	Pirofosfatasa traslocadora de protones de tipo vacuolar 1, putativa (dTPS0)	+ -3,4 ± 0,7
								LinJ31_V3.1250	Proteína hipotética de función desconocida	N.D.
Lin208H10	-2,68	-1,4 ± 0,4	0,010	GS598960	0	0	a	LinJ18_V3.1070	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C2, putativa (dTPS0)	+ -3,3 ± 0,1
								LinJ18_V3.1080	Subunidad del complejo vacuolar de clasificación de proteínas (dTPS 0)	- -1,2 ± 0,3
Lin219A10	-1,89	-0,9 ± 0,1	0,004	GS598961	0	0	b	LinJ19_V3.0710	Malato deshidrogenasa glicosomal (dTPS1, dTPS30)	+ -2,3 ± 0,0
								LinJ19_V3.0720	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin228D4	-1,86	-0,9 ± 0,2	0,014	GS598962	0	0	a	LinJ19_V3.0080	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ19_V3.0090	Fibrilarina, putativa (dTPS0)	+ -4,1 ± 0,8
Lin229E6	-9,63	-3,3 ± 0,2	0,002	GS598963	0	0	a	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo (dTPS0)	+ -2,1 ± 0,3
								LinJ06_V3.1330	Coproporfirinógeno III oxidasa, putativa (dTPS33)	+ -5,8 ± 0,1
Lin231G4	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,013	GS598964	0	0	b	LinJ31_V3.1240	Pirofosfatasa traslocadora de protones de tipo vacuolar 1, putativa (dTPS0)	+ -
								LinJ31_V3.1250	Proteína hipotética de función desconocida	N.D.
Lin234C9	-1,77	-0,8 ± 0,3	0,038	GS598965	0	0	b	LinJ20_V3.1220	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C2, putativa (dTPS41)	+ -3,3 ± 0,1
Lin242E2	-2,85	-1,5 ± 0,4	0,025	GS598966	0	0	b	LinJ31_V3.2370	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa (dTPS4, dTPS29)	+ -4,6 ± 0,4
								LinJ31_V3.2380	Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativo (dTPS4, dTPS29)	+ -2,7 ± 0,6
Lin252B11	-2,12	-1,1 ± 0,3	0,028	GS598967	0	0	b	LinJ17_V3.0170	Factor de elongación 1α (dTPS14, dTPS39, dTPS44)	N.D.
								LinJ17_V3.0180	Factor de elongación 1α (dTPS14, dTPS39, dTPS44)	N.D.
								LinJ17_V3.0190	Factor de elongación 1α (dTPS14, dTPS39, dTPS44)	N.D.
								LinJ17_V3.0200	Factor de elongación 1α (dTPS14, dTPS39, dTPS44)	N.D.
Lin265E2	-1,89	-0,9 ± 0,3	0,042	GS598968	1e-165	0	b	LinJ29_V3.1880	Proteína del vástago paraflagelar 1D, putativa (dTPS0)	N.D.
Lin270H10	-1,96	-1,0 ± 0,2	0,010	GS598969	0	0	b	LinJ31_V3.1130	N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa, putativa	N.D.
								LinJ31_V3.1140	N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa, putativa	N.D.
								LinJ31_V3.1150	Monoglicérido lipasa, putativa (dTPS0)	+ -1,9 ± 0,0
Lin271C2	-1,9	-0,9 ± 0,3	0,043	GS598970	0	0	b	LinJ28_V3.0090	Proteína de tipo adenilato ciclasa (dTPS9, dTPS12, dTPS23, dTPS24)	+ -2,3 ± 0,0
								LinJ28_V3.0100	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin285H1	-2,12	-1,1 ± 0,2	0,012	GS598971	0	0	b	LinJ36_V3.6550	Transportador de glucosa lmg2, putativa (dTPS47)	+ -8,1 ± 1,1
								LinJ36_V3.6560	Transportador de glucosa, putativa (dTPS47)	+ -6,3 ± 1,4
Lin294G4	-2,00	-1,0 ± 0,2	0,013	GS598972	0	0	b	LinJ31_V3.1640	Diflina sintasa, putativa	-
								LinJ31_V3.1650	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ31_V3.1660	Proteína putativa de tipo 3-cetoacil-CoA tiolasa (dTPS0)	+ -3,6 ± 0,5

4.5.6. ΔT conduce a un patrón de expresión similar al producido por ΔTΔpH.

En la Figura 42 M-P, se puede observar que parte de las células tienen una morfología esférica de tipo AL, similar a ΔT/ΔpH, mientras que en el resto se observa que no se ha perdido completamente la morfología del promastigote. Además, se observa que el flagelo emerge del cuerpo celular en una mayor proporción de células que en ΔTΔpH y que los promastigotes expuestos a ΔT expresan gp46 en su superficie. En este estudio se describe por primera vez el efecto de este factor sobre el transcriptoma del parásito (Tablas 23, 24, A16 y A17). Al comparar estos datos con los del patrón de expresión ΔT/ΔpH, se observa a simple vista una serie de analogías, es decir, de genes cuya expresión se regula de manera similar en ambos casos. Dichos genes aparecen en negrita en las Tablas 21-24, de los cuales están sobre-expresados los siguientes: proteína 3'a2rel, algunos genes de la superfamilia de las amastinas (Figura 52), *mio*-inositol-3-fosfato sintetasa (INO1), transportador de aminoácidos aATP11, tres proteínas hipotéticas conservadas y ocho clones de la genoteca que presumiblemente contienen genes diferencialmente expresados que no están anotados en la secuencia genómica de *L. infantum*; y sub-expresados: 3'-nucleotidasa/nucleasa (3'NT/Nasa), PT LinJ06_V3.1320, GT, proteína del vástago paraflagelar 1D (PFR1D), superóxido dismutasa (SOD), PI3K de tipo tor2, peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa FKBP LinJ36_V3.0250, calmodulina, latosterol oxidasa, una proteína hipotética de función desconocida, tres proteínas hipotéticas conservadas y siete clones que alinean con la secuencia genómica pero no contienen

Resultados

genes anotados en el proyecto genoma de *L. infantum*. Los análisis globales de los perfiles de expresión génica (SAM y HCL-ST) indican que la similitud entre los perfiles de expresión $\Delta T\Delta pH$ y ΔT es estadísticamente significativa respecto del perfil ΔpH (Figura 47). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con $\Delta T\Delta pH$, no se observa sobre-expresión del gen A2 (Tabla 23), específico de los amastigotes, lo cual indica junto al perfil de expresión de gp46 que el grado de diferenciación a amastigotes de los promastigotes expuestos a ΔT es menor que en el caso de $\Delta T\Delta pH$.

Tabla 23. Genes de función conocida sobre-expresados con ΔT (día 4) en *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes sobre-expresados que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida con el efecto del aumento de la temperatura. Las características que se describen de cada clon son: número de clon; cociente de intensidades ($F \geq 1,7$); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); p , valor p del test de la t con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de *GenBank* GSS; valores e del alineamiento en *BLAST* de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (Fw) y *downstream* (Rv); definición del clon (Def.) en función de su alineamiento y ensamblaje (a , b o c ; sección 4.2.); anotaciones (identificadores *GeneDB*) y las correspondientes funciones génicas; resultados de la qRT-PCR. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+). Los genes en negrita están también sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada	qRT-PCR	
					Fw	Rv				+/-	F ± S
Lin11D7	2,37	1,2 ± 0,1	0,004	GS598854	-	0	c	LinJ31_V3.0460	Amastina, putativa	+	4,7 ± 1,2
Lin17C6	1,92	0,9 ± 0,1	0,006	GS598973	0	0	b	LinJ36_V3.0640	Proteína de tipo $\Delta 8$ ácido graso desaturasa	N.D.	
Lin19D1	1,88	0,9 ± 0,3	0,028	GS598855	3e-18	0	b	LinJ08_V3.0680	Proteína de tipo amastina	N.D.	
								LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin33G2	2,29	1,2 ± 0,8	0,046	GS598857	6e-118	6e-118	b	LinJ34_V3.4370	Proteína de superficie de tipo amastina, putativa	N.D.	
Lin70F5	2,03	1,0 ± 0,4	0,045	GS598974	0	0	b	LinJ36_V3.7290	Proteína de tipo $\Delta 8$ ácido graso desaturasa	N.D.	
Lin77H8	2,89	1,5 ± 0,4	0,022	GS598975	3e-175	0	b	LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin86H7	2,03	1,0 ± 0,2	0,005	GS598867	0	2e-101	b	LinJ08_V3.0700	Proteína de tipo amastina	+	6,8 ± 0,9
Lin87H2	1,89	0,9 ± 0,1	0,007	GS598868	3e-15	3e-33	b	LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin89D9	1,70	0,8 ± 0,3	0,040	GS598869	0	0	b	LinJ21_V3.0770	Proteína de la subfamilia E de proteínas ABC	N.D.	
Lin90B6	1,95	1,0 ± 0,3	0,032	GS598976	0	0	a	LinJ30_V3.0640	Proteína reguladora de la biosíntesis de ribosomas (RRS1), putativa	+	1,9 ± 0,2
								LinJ30_V3.0650	Histidil-ARNt sintetasa, putativa	N.D.	
								LinJ30_V3.0660	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin91B12	1,75	0,8 ± 0,1	0,003	GS598872	0	0	b	LinJ34_V3.2660	Proteína de superficie de tipo amastina	N.D.	
Lin100B2	1,84	0,9 ± 0,3	0,034	GS598977	0	9e-27	b	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal	N.D.	
Lin104B11	1,77	0,8 ± 0,2	0,022	GS598978	0	0	b	LinJ04_V3.0570	Espermidina sintasa 1, putativa	N.D.	
Lin104C10	1,82	0,9 ± 0,2	0,015	GS598979	0	0	b	LinJ08_V3.1320	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin106A1	2,43	1,3 ± 0,0	0,000	GS598980	0	0	c	LinJ06_V3.1200	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ31_V3.0590	Transportador de aminoácidos aATP11, putativa	+	2,4 ± 0,3
Lin109B3	1,89	0,9 ± 0,2	0,024	GS598981	0	0	b	LinJ21_V3.2130	Proteína de unión a centrómero/microtúbulos (cbf5), putativa	N.D.	
Lin113C3	2,99	1,6 ± 0,3	0,010	GS598876	3e-74	0	a	LinJ14_V3.1440	Transportador de pteridina	+	2,5 ± 0,3
								LinJ14_V3.1450	Mio-inositol-1-fosfato sintetasa	+	4,2 ± 0,1
Lin137A10	1,98	1,0 ± 0,3	0,039	GS598982	0	0	b	LinJ24_V3.1230	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ24_V3.1240	Factor de traducción SUI1, putativo	+	1,8 ± 0,1
Lin146E3	2,52	1,3 ± 0,3	0,043	GS598882	0	0	b	LinJ31_V3.0590	Transportador de aminoácidos aATP11, putativo	+	2,4 ± 0,3
Lin162E6	1,92	0,9 ± 0,3	0,044	GS598983	0	0	a	LinJ14_V3.1430	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ14_V3.1440	Transportador de pteridina	+	2,5 ± 0,3
								LinJ14_V3.1450	Mio-inositol-1-fosfato sintetasa	+	4,2 ± 0,1
Lin168A2	1,87	0,9 ± 0,2	0,017	GS598984	1e-78	0	b	LinJ22_V3.0670	Proteína hipotética	N.D.	
								LinJ22_V3.0680	Proteína 3'a2rel	+	3,5 ± 0,6
Lin175D6	2,20	1,2 ± 0,4	0,023	GS598985	0	0	b	LinJ31_V3.0460	Amastina, putativa	+	4,7 ± 1,2
Lin185A10	2,04	1,0 ± 0,3	0,036	GS598986	0	0	a	LinJ28_V3.0620	MAP quinasa, putativa	N.D.	
Lin185D7	1,75	0,0 ± 0,2	0,020	GS598987	2e-161	0	b	LinJ17_V3.0200	Factor de elongación 1 α	N.D.	
Lin188H2	3,20	1,7 ± 0,6	0,042	GS598988	0	0	c	LinJ08_V3.0680	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin194E2	1,79	0,8 ± 0,2	0,025	GS598989	-	0	c	LinJ08_V3.0710	Proteína de tipo amastina	+	6,8 ± 0,9
Lin206B6	2,08	1,0 ± 0,3	0,035	GS598990	7e-19	0	b	LinJ22_V3.0680	Proteína 3'a2rel	+	3,5 ± 0,6
Lin207A1	1,84	0,9 ± 0,2	0,015	GS598991	0	0	b	LinJ17_V3.0170	Factor de elongación 1 α	N.D.	
								LinJ17_V3.0180	Factor de elongación 1 α	N.D.	
Lin210C4	1,71	1,8 ± 0,1	0,030	GS598893	0	0	b	LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin224G2	1,70	0,8 ± 0,2	0,014	GS598895	0	0	b	LinJ08_V3.0720	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin235G8	2,20	1,1 ± 0,2	0,002	GS598896	0	0	b	LinJ08_V3.1320	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin245E2	2,05	1,0 ± 0,3	0,032	GS598897	0	0	b	LinJ22_V3.0680	Proteína 3'a2rel	+	3,5 ± 0,6
Lin274G6	1,84	0,9 ± 0,2	0,012	GS598992	0	0	b	LinJ08_V3.0680	Proteína de tipo amastina	N.D.	
								LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin275A8	2,10	1,1 ± 0,1	0,003	GS598900	0	4e-168	b	LinJ08_V3.0720	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin282B6	2,08	1,0 ± 0,4	0,042	GS598993	0	0	b	LinJ03_V3.0960	Factor de iniciación de la traducción 2, subunidad α , putativa	N.D.	
Lin294A11	1,72	0,8 ± 0,1	0,001	GS598902	0	0	b	LinJ08_V3.1320	Proteína de tipo amastina	N.D.	
Lin295D9	2,99	1,6 ± 0,4	0,020	GS598903	0	0	b	LinJ34_V3.1720	Proteína de superficie de tipo amastina, putativa	N.D.	
								LinJ31_V3.1660	Proteína putativa de tipo 3-cetoacil-CoA tiolasa (dTPSO)	+	-3,6 ± 0,5

Tabla 24. Genes de función conocida sub-expresados con ΔT (día 4) en *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes sub-expresados que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida con el efecto del aumento de la temperatura. Las características que se describen de cada clon son: número de clon; cociente de intensidades ($F \leq -1,7$); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); p , valor p del test de la t con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de *GenBank* GSS; valores e del alineamiento en *BLAST* de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (Fw) y *downstream* (Rv); definición del clon (Def.) en función de su alineamiento y ensamblaje (a , b o c ; véase explicación en la sección 4.2.); anotaciones (identificadores *GeneDB*) y las correspondientes funciones génicas; resultados de la qRT-PCR. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+). Los genes en negrita están también sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada	qRT-PCR	
					Fw	Rv				+/-	F ± S
Lin9E5	-1,77	-0,8 ± 0,3	0,033	GS598994	4e-131	0	b	LinJ35_V3.1150	Proteína de tipo oligosacaril transferasa	N.D.	
Lin40G12	-1,97	-1,0 ± 0,2	0,008	GS598916	2e-161	0	b	LinJ23_V3.1550 LinJ23_V3.1560	Proteína hipotética de función desconocida Proteína de tipo latosterol oxidasa	N.D.	
Lin49B7	-4,38	-2,1 ± 0,0	0,000	GS598995	0	4e-64	a	LinJ34_V3.4160	Proteína de tipo fosfatidilinositol-3-quinasa (tor2)	N.D.	5,0 ± 0,7
Lin 60B1	-2,41	-1,3 ± 0,4	0,025	GS598996	0	4e-162	c	LinJ36_V3.7040 LinJ31_V3.2370	Proteína hipotética conservada 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa	N.D.	
Lin63F3	-2,23	-1,2 ± 0,4	0,043	GS598997	0	0	a	LinJ36_V3.6550 LinJ36_V3.6560	Transportador de glucosa lmg2, putativo Transportador de glucosa, putativo	+	7,2 ± 1,0 6,1 ± 0,8 6,1 ± 0,8
Lin84E8	-2,26	-1,2 ± 0,2	0,007	GS598998	0	0	a	LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativo	+	7,2 ± 1,0 7,2 ± 1,0
Lin85H1	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,025	GS598999	1e-57	1e-20	b	LinJ30_V3.3440	Proteína de dominio importina CAS/CSE, putativa	N.D.	
Lin93H3	-2,26	-1,2 ± 0,4	0,030	GS599000	0	0	a	LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativo	+	7,2 ± 1,0 7,2 ± 1,0
Lin97D1	-3,41	-1,7 ± 0,3	0,001	GS598931	0	0	a	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo	+	2,3 ± 0,3
Lin98G10	-2,13	-1,1 ± 0,2	0,015	GS599001	0	0	b	LinJ30_V3.2770 LinJ30_V3.2780	Proteína hipotética conservada Superóxido dismutasa, putativa	N.D.	
Lin111C2	-2,74	-1,5 ± 0,1	0,002	GS599002	0	0	a	LinJ09_V3.0650	Serina peptidasa, familia S51, peptidasa E, putativa	N.D.	
Lin150E4	-1,86	-0,9 ± 0,3	0,036	GS599003	0	8e-22	b	LinJ13_V3.1060	Calmodulina, putativa	N.D.	
Lin155H1 2	-2,34	-1,2 ± 0,3	0,018	GS599004	0	0	a	LinJ36_V3.0250	Peptidil-profil <i>cis-trans</i> isomerasa, putativa	N.D.	
Lin157D8	-2,27	-1,2 ± 0,1	0,002	GS599005	0	-	c	LinJ31_V3.2380	Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa	+	7,2 ± 1,0
Lin179B4	-1,76	-0,8 ± 0,1	0,004	GS599006	0	0	b	LinJ07_V3.0030 LinJ07_V3.0040 LinJ07_V3.0050 LinJ07_V3.0060	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína de tipo α adaptina	N.D. N.D. N.D. +	
Lin182F2	-2,23	-1,2 ± 0,1	0,008	GS598952	0	0	b	LinJ25_V3.0740 LinJ25_V3.0750	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 5a, putativo Factor eucariótico de iniciación de la traducción 5a, putativo	N.D. N.D.	
Lin187C10	-4,72	-2,2 ± 0,4	0,013	GS598953	0	0	b	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo	+	2,3 ± 0,3
Lin204A1 1	-1,76	-0,8 ± 0,3	0,038	GS599007	-	1e-165	c	LinJ09_V3.0650	Serina peptidasa, familia S51, peptidasa E, putativa	N.D.	
Lin210B7	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,016	GS599008	0	0	a	LinJ32_V3.3690 LinJ32_V3.3700	Proteína de caja DEAD/DEAH, putativa Proteína hipotética conservada	+	3,3 ± 0,8 N.D.
Lin229E6	-3,30	-1,7 ± 0,3	0,005	GS598963	0	0	a	LinJ06_V3.1320 LinJ06_V3.1330	Transportador de pteridina, putativa Coproporfirinógeno III oxidasa, putativa	+	2,3 ± 0,3 4,5 ± 0,6
Lin242E2	-2,37	-1,2 ± 0,4	0,039	GS599009	1e-137	0	a	LinJ31_V3.2370 LinJ31_V3.2380	3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa Precursor de 3'-nucleotidasa/nucleasa, putativa	+	7,2 ± 1,0 7,2 ± 1,0
Lin255E12	-2,54	-1,3 ± 0,3	0,011	GS599010	0	0	b	LinJ28_V3.0210 LinJ31_V3.1660	Variante de histona H2B Proteína putativa de tipo 3-cetoacil-CoA tiolasa (dTGPS)	N.D. +	

4.5.7. La acidificación da lugar a un patrón de expresión diferente al de $\Delta T\Delta pH$ y ΔT .

La Figura 41 muestra que el crecimiento en el cultivo de los promastigotes expuestos a ΔpH es limitado. Después de una exposición de 4 días, tiempo aproximado de diferenciación de los promastigotes (Zilberstein y Shapira, 1994), dos morfologías celulares fueron observadas: redondeada y de tipo promastigote, ambas con flagelo emergente del blefaroplasto (Figura 42). Además, el gen A2 no está sobre-expresado y el perfil de expresión génica no es similar a ninguno de los descritos para los estadios fundamentales del ciclo biológico ni para las subpoblaciones procíclica y metacíclica de promastigotes en fase estacionaria (secciones 4.3. y 4.4.). Hay similitudes en este perfil ΔpH con el de $\Delta T\Delta pH$: sobre-expresión de TGL, TFSUI1 –también sobre-expresado con ΔT - enzima de tipo conjugante de ubiquitina y cinco clones que no mapean con ningún gen anotado; y por otro lado, la sub-expresión de una proteína hipotética conservada, un gen no anotado y posibles genes ARNg (Tabla A21, Anexo VII). Sin embargo, la mayor parte de los genes regulados diferencialmente por ΔpH (Tablas 23, A18 y A19) no concuerdan con los $\Delta T\Delta pH$, siendo, por lo tanto, el perfil muy distinto, como se observa en la Figura 47 como resultado del análisis HCL-ST, que ha puesto de manifiesto que el grupo ΔpH dista más que ΔT de $\Delta T\Delta pH$ en expresión génica diferencial. Además, se han detectado algunos genes cuyos perfiles de

Resultados

expresión son contrarios: GNAT, PGFS, eIF5a y dos clones que no mapean con secuencias anotadas en el genoma están sub-expresados por $\Delta T\Delta pH$ y sobre-expresados por ΔpH . Por lo tanto, estos datos indican que la similitud del perfil ΔT es mayor que la de ΔpH con $\Delta T\Delta pH$.

Tabla 25. Genes de función conocida diferencialmente expresados con ΔpH (día 4) en *L. infantum*. En esta tabla se describen clones que contienen genes diferencialmente expresados que no han sido anotados como hipotéticos o de función desconocida con el descenso de pH. Las características que se describen de cada clon son: número de clon; cociente de intensidades (sobre-expresión si $F \geq 1,7$, sobre la línea divisoria, y sub-expresión si $F \leq -1,7$, bajo la línea divisoria); $\log_2 F$ y su correspondiente cuasidesviación típica (S); p , valor p del test de la t con nivel de significación $\alpha = 0,05$; números de acceso de GenBank GSS; valores e del alineamiento en BLAST de las secuencias de los extremos del clon, *upstream* (Fw) y *downstream* (Rv); definición del clon (Def.) en función de su alineamiento y ensamblaje (a , b o c ; sección 4.2.); anotaciones (identificadores GeneDB) y las correspondientes funciones génicas; resultados de la qRT-PCR. Cuando un clon está alineado con más de una anotación génica, la regulación diferencial de la expresión génica se confirma si el resultado de la qRT-PCR es positivo (+). Los genes en negrita están también sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada)	qRT-PCR	
					Fw	Rv				+/-	F ± S
Lin9E8	2,03	1,0 ± 0,1	0,003	GS599011	0	0	a	LinJ24_V3.0020 LinJ24_V3.0030 LinJ24_V3.0040	Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina, putativa Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L17, putativa	+	7.6 ± 0.4
Lin10H12	2,26	1,2 ± 0,1	0,001	GS599012	0	0	b	LinJ31_V3.0860 LinJ31_V3.0870	Proteína de tipo triacilglicerol lipasa, putativa Proteína precursora de lipasa, putativa	N.D. N.D.	
Lin21H10	2,46	1,3 ± 0,1	0,001	GS598910	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido $\Delta 4$ -desaturasa, putativa	N.D.	
Lin33G5	1,76	0,8 ± 0,0	0,000	GS599013	0	0	b	LinJ27_V3.1300	Proteína ácida ribosómica 60S, putativa	N.D.	
Lin37C10	2,74	1,5 ± 0,2	0,006	GS599014	0	0	b	LinJ33_V3.0280	Proteína de unión a ARN rgm, putativa	N.D.	
Lin58C1	2,32	1,2 ± 0,2	0,001	GS599015	0	0	b	LinJ22_V3.1360 LinJ22_V3.1370 LinJ22_V3.1380	Proteína hipotética de función desconocida Proteína ribosómica 60S L14 Defosfo-CoA quinasa, putativa	N.D. N.D. +	-2.9 ± 0.3
Lin63B7	1,83	0,9 ± 0,1	0,002	GS599016	1e-100	1e-103	b	LinJ15_V3.1200	Proteína ácida ribosómica 60S P2	N.D.	
Lin66A8	2,28	1,2 ± 0,1	0,006	GS599017	0	0	a	LinJ22_V3.0470 LinJ22_V3.0480	Proteína hipotética conservada Enzima de tipo conjugante de ubiquitina	N.D. +	-3.1 ± 0.8
Lin80C3	3,15	1,7 ± 0,3	0,004	GS599018	0	0	b	LinJ28_V3.3250	Glucosa-6-fosfato N-acetiltransferasa	N.D.	
Lin 95F10	2,26	1,2 ± 0,1	0,002	GS599019	0	0	a	LinJ28_V3.2360	Proteína ribosómica S29, putativa	N.D.	
Lin100F8	2,12	1,1 ± 0,2	0,007	GS599020	0	2e-161	b	LinJ35_V3.3330 LinJ35_V3.3340	Proteína ribosómica 60S L31, putativa 60S Proteína ribosómica L31, putativa	N.D. N.D.	
Lin107C12	2,90	1,5 ± 0,2	0,001	GS599021	7e-130	5e-134	a	LinJ11_V3.1180	40S Proteína ribosómica S15a, putativa	N.D.	
Lin122C5	1,93	0,9 ± 0,1	0,005	GS599022	0	0	b	LinJ30_V3.3770 LinJ30_V3.3780 LinJ30_V3.3790	Proteína de dominio CPSE, putativa Proteína ácida ribosómica 60S P2, putativa Proteína ácida ribosómica 60S P2, putativa	N.D. N.D. N.D.	
Lin135F6	2,63	1,4 ± 0,3	0,036	GS599023	0	0	b	LinJ29_V3.1920 LinJ29_V3.1930	Proteína ribosómica 40S S15a, putativa Proteína hipotética conservada	N.D. N.D.	
Lin137A10	2,00	1,0 ± 0,2	0,019	GS599024	0	0	b	LinJ24_V3.1230 LinJ24_V3.1240	Proteína hipotética conservada Factor de traducción SUH1, putativo	N.D. +	-5.0 ± 0.6
Lin144F11	1,72	0,8 ± 0,2	0,032	GS599025	0	0	a	LinJ31_V3.2210	Prostaglandina F2 α sintetasa	N.D.	
Lin161C9	2,54	1,3 ± 0,1	0,003	GS599026	0	1e-177	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido $\Delta 4$ -desaturasa, putativa	N.D.	
Lin162A9	1,97	1,0 ± 0,2	0,024	GS599027	0	0	b	LinJ22_V3.0470 LinJ22_V3.0480	Proteína hipotética conservada Enzima de tipo conjugante de ubiquitina	N.D. +	-3.1 ± 0.8
Lin182F2	3,27	1,7 ± 0,2	0,009	GS599028	0	0	b	LinJ25_V3.0740 LinJ25_V3.0750	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 5a, putativa Factor eucariótico de iniciación de la traducción 5a, putativa	N.D. N.D.	
Lin200H12	2,54	1,3 ± 0,1	0,005	GS599029	0	0	a	LinJ14_V3.1340 LinJ14_V3.1350	Proteína hipotética de función desconocida Ubiquitina/proteína ribosómica S27a, putativa	N.D. +	-4.8 ± 0.4
Lin218E3	1,82	0,9 ± 0,1	0,001	GS599030	0	0	b	LinJ31_V3.2210	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin247D7	2,41	1,3 ± 0,4	0,018	GS599031	5e-109	0	a	LinJ28_V3.0090 LinJ28_V3.0100 LinJ28_V3.0110	Prostaglandina F2 α sintasa Proteína de tipo adenilato ciclasa Proteína hipotética conservada	N.D. +	-3.5 ± 0.6
Lin254A4	1,93	0,9 ± 0,2	0,009	GS599032	0	0	b	LinJ04_V3.1250	Subunidad $\beta 3$ del proteasoma, putativa	N.D.	
Lin254H7	1,73	0,8 ± 0,1	0,004	GS599033	0	0	b	LinJ04_V3.1250	Actina	N.D.	
Lin261F8	2,84	1,5 ± 0,2	0,007	GS599034	0	0	b	LinJ21_V3.1310	Actina	N.D.	
Lin266F6	1,79	0,8 ± 0,1	0,009	GS599035	0	0	b	LinJ27_V3.0300	Proteína ribosómica S23, Putativa	N.D.	
Lin267B9	1,74	0,8 ± 0,2	0,010	GS599036	0	0	b	LinJ36_V3.0580 LinJ36_V3.0590 LinJ36_V3.0600	Proteína portadora de acilo Proteína hipotética conservada Proteína de tipo ubiquitina	N.D. N.D. +	-2.3 ± 0.0
Lin269B5	2,75	1,5 ± 0,2	0,002	GS599037	0	0	b	LinJ29_V3.2970	Quinasa relacionada con cdc2	N.D.	
Lin282B6	2,44	1,3 ± 0,2	0,009	GS599038	0	0	a	LinJ03_V3.0960	Proteína de tipo ribosómica 40S S19	N.D.	
Lin290G8	1,80	0,8 ± 0,1	0,003	GS599039	0	0	a	LinJ17_V3.1520	Subunidad α del factor de iniciación 2, putativa	N.D.	
Lin43G10	-5,36	-2,4 ± 0,3	0,007	GS599040	0	0	c	LinJ28_V3.3060	Cisteína peptidasa otubaina, Clan CA, familia C65. Putativa	N.D.	
Lin130C5	-4,71	-2,2 ± 0,3	0,041	GS599041	0	0	b	LinJ36_V3.3170 LinJ36_V3.3180 LinJ36_V3.3190 LinJ36_V3.3200	Proteína de choque térmico hsp70, putativa Exonucleasa del complejo exosoma RRP41. Putativa Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina Proteína p14 del sitio de ramificación del pre-ARNm	+	-2.1 ± 0.2
Lin173E11	-7,74	-3,0 ± 0,4	0,002	GS599042	6e-44	3e-147	b	LinJ36_V3.2280	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin177H3	-5,08	-2,3 ± 0,2	0,001	GS599043	0	4e-60	b	LinJ28_V3.3060	Precursor erv25 de transporte RE-Golgi, putativo	N.D.	
Lin197E1	-2,53	-1,3 ± 0,1	0,007	GS599044	0	0	c	LinJ18_V3.0830 LinJ23_V3.1610	Proteína de choque térmico hsp70, putativa Proteína con periodicidad de triptófano 2	+	-2.1 ± 0.2
Lin228H5	-7,90	-3,0 ± 0,4	0,012	GS599045	7e-196	0	b	LinJ21_V3.0310	Proteína de tipo acetiltransferasa	-	1.4 ± 0.4
Lin281H8	-2,01	-1,0 ± 0,1	0,001	GS599046	8e-136	2e-102	b	LinJ35_V3.1580	Hexoquinasa, putativa	N.D.	
Lihsp70	-4,21	-2,0 ± 0,2	0,004	XM001470292	-	-	-	-	Metacaspasa, putativa	N.D.	
Ldohsp70	-4,57	-2,2 ± 0,1	0,028	-	-	-	-	-	Hsp70 de <i>L. infantum</i> – punto control de los <i>microarrays</i> de ADN	+	-2.1 ± 0.2
Lmahsp70	-3,85	-1,9 ± 0,2	0,017	-	-	-	-	-	Hsp70 de <i>L. donovani</i> – punto control de los <i>microarrays</i> de ADN	N.D.	
									Hsp70 de <i>L. major</i> – punto control de los <i>microarrays</i> de ADN	N.D.	

4.6. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS PROMASTIGOTES DE *L. infantum* EXPUESTOS A OTRAS MODIFICACIONES EN CULTIVO *IN VITRO*.

4.6.1. Perfil de expresión génica de los promastigotes de *L. infantum* en presencia de acetato de cadmio.

Tras la exposición de los promastigotes a acetato de cadmio 1 mM durante 4 días, se puede observar la detención de la proliferación (Figura 53), además de cambios morfológicos atípicos (Figura 54).

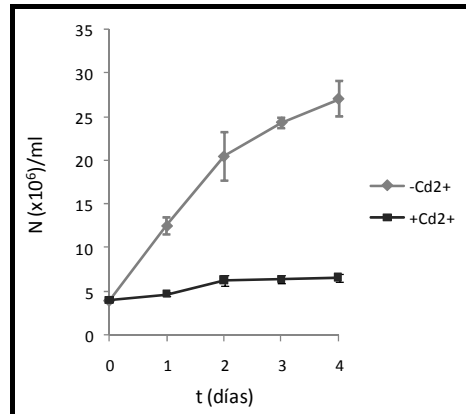


Figura 53. Curvas de crecimiento de los promastigotes expuestos a cadmio frente a los promastigotes cultivados en condiciones normales. Ambos tipos de cultivo se realizaron como se ha descrito en la sección 3.4.3., con la adición de acetato de cadmio 1 mM en el grupo tratado (+Cd²⁺).

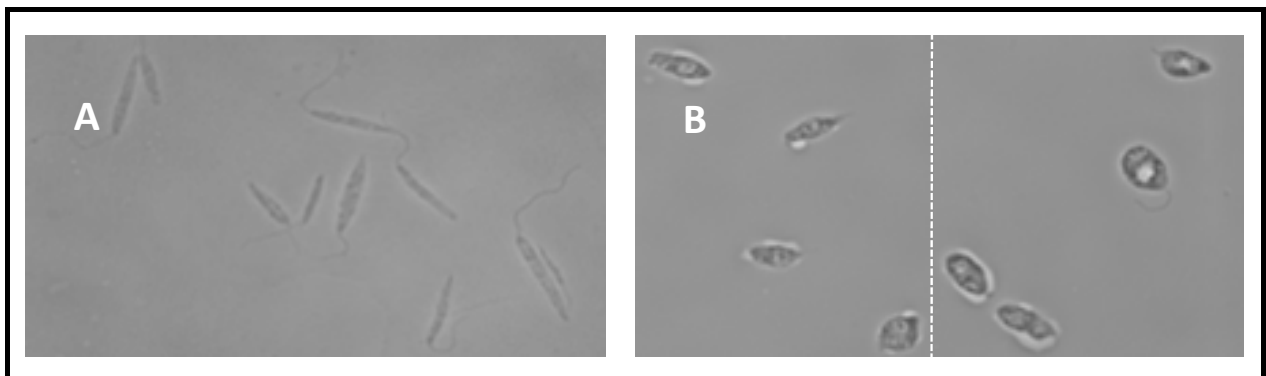


Figura 54. Morfología de los promastigotes en cultivo axénico en ausencia y en presencia de acetato de cadmio 1 mM. Tinción con Giemsa modificado. (A) Promastigotes en ausencia de cadmio. (B) Promastigotes en presencia de cadmio. Se muestran dos campos separados por la línea discontinua el cuerpo celular adopta diferentes morfologías, generalmente ovoides y en ocasiones irregulares, con disminución de la longitud del flagelo.

Se realizó el análisis transcriptómico de los promastigotes expuestos durante 4 días a acetato de cadmio referido a los promastigotes control, es decir, cultivados en condiciones estándar (sección 3.4.3.) mediante hibridación con los *microarrays* de ADN (sección 3.10) (Figuras 55 y 56). Los criterios de selección de clones que representan genes diferencialmente expresados fueron: (i) $F \geq 1.7$ (Cy5/Cy3 si Cy5 > Cy3) ó ≤ -1.7 (-Cy3/Cy5 si Cy3 > Cy5), (ii) intensidad de fluorescencia total > 5000 UF y (iii) $p < 0,05$ (Figura 57). Los genes control positivo están constitutivamente expresados y los genes control negativo presentan valores de intensidad de fluorescencia del orden del *background* local medio (Tabla

Resultados

26). Como resultado, se detectaron 98 genes diferencialmente expresados, más concretamente 57 sobre-expresados y 41 sub-expresados (Tabla 27). Es interesante el hecho de que sólo 12 genes sobre-expresados y 12 sub-expresados constan de al menos una función conocida y/o han sido caracterizados hasta cierto punto, bien mediante anotación funcional *in silico* o por caracterización experimental (Tablas 28 y 29).

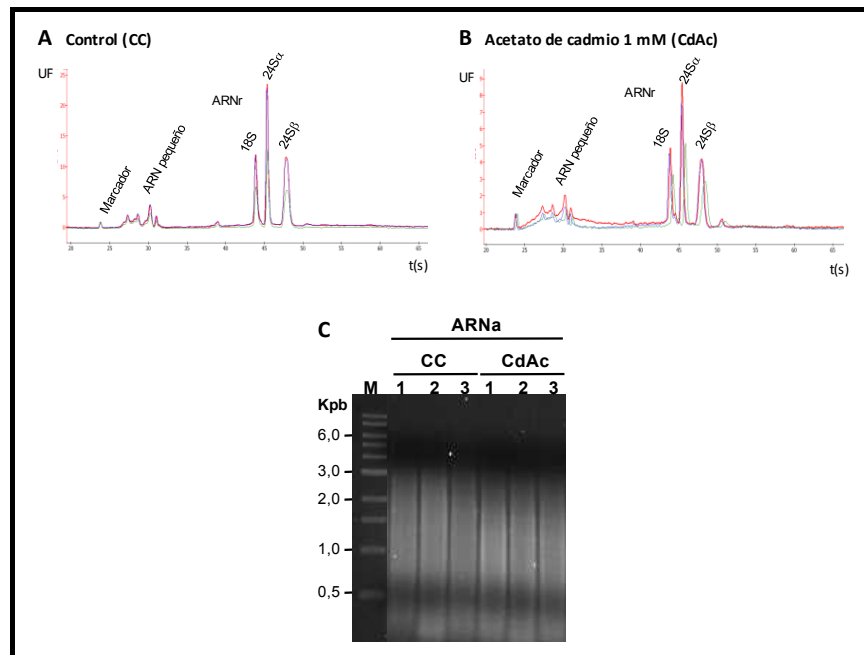


Figura 55. Análisis de la integridad del ARN total y del ARNa de los promastigotes expuestos a acetato de cadmio. El primer pico corresponde al marcador *RNA 6000 Nano Marker* (Agilent Technologies). Se aprecia la integridad del ARN por la presencia de los picos de ARNr 18S y 24S α y β con una ratio 24S/18S de aproximadamente 2,2 y ausencia de *smear* en la porción anterior al pico 18S. (A) Control CC. (B) Acetato de cadmio 1mM. (C) ARNa de las tres muestras de cada grupo.

Tabla 26. Resultados de la hibridación de los controles de los microarrays de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes en presencia y ausencia de acetato de cadmio. Para los controles positivos se detalla F y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la *t*, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

Spot	F \pm S	<i>p</i>	Control positivo
cLin79A1	1,0 \pm 0,2	0,134	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	1,2 \pm 0,5	0,375	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	1,3 \pm 0,4	0,412	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,2 \pm 0,6	0,706	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,0 \pm 0,0	0,997	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,2 \pm 0,5	0,468	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,3 \pm 0,4	0,550	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-1,2 \pm 0,1	0,124	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,3 \pm 0,4	0,307	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	-1,6 \pm 1,0	0,395	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,2 \pm 0,6	0,425	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,0 \pm 0,3	0,991	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,0 \pm 0,1	0,746	<i>HerringS DNA</i>
Spot	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	17 \pm 4		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	42 \pm 15		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	25 \pm 11		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	70 \pm 35		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	387 \pm 211		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	15 \pm 7		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	111 \pm 48		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	92 \pm 44		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	44 \pm 39		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	104 \pm 52		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	3 \pm 2		<i>LXSSC</i>

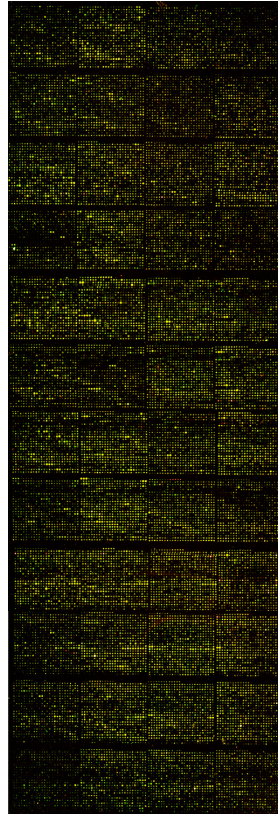


Figura 56. Imagen de una réplica de la hibridación con *microarrays* para el análisis transcriptómico de la influencia de la presencia de acetato de cadmio en los promastigotes de *L. infantum*.

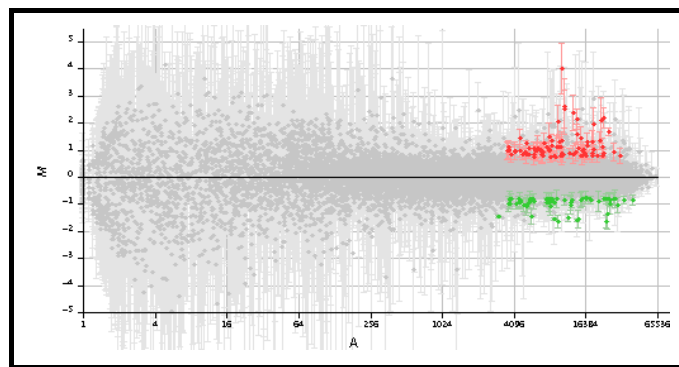


Figura 57. Diagrama de dispersión M/A del análisis de hibridación de *microarrays* para el análisis de los perfiles de expresión génica inducidos por la presencia de acetato de cadmio en promastigotes de *L. infantum*. $M = (\log_2 R_i / \log_2 V_i)$ y $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i) / 2]$ (Ecuaciones 7 y 8), donde R y V son respectivamente la intensidad de fluorescencia del rojo (Cy5) y del verde (Cy3).

Tabla 27. Perfil de expresión de los promastigotes expuestos a cadmio.

Estado de las anotaciones génicas	Número de genes	
	sobre-expresados	sub-expresados
Función inferida por homología/y/o caracterizada funcionalmente	12	12
Proteína hipotética conservada	5	4
Proteína hipotética de función desconocida	1	0
Desconocida	1	0
Clones no resueltos	12	14
Clones que carecen de secuencias génicas anotadas	26	11

Resultados

La expresión diferencial de los genes de función desconocida es como sigue: un gen de una proteína desconocida, 2 de proteínas hipotéticas de función desconocida y 5 de proteínas hipotéticas conservadas están sobre-expresados por la presencia de cadmio, mientras que 4 genes de este último tipo están sub-expresados. Además, se ha detectado sobre-expresión y sub-expresión en respectivamente 12 y 14 clones no resueltos que contienen más de una anotación génica, mientras que 26 y 11 clones respectivamente no contienen ninguna de las secuencias génicas anotadas a pesar de que mapean con la secuencia genómica (Tabla A22). En la Figura 58 se representan los genes de función conocida diferencialmente expresados por la presencia de acetato de cadmio 1 mM (Tabla 28 y 29).

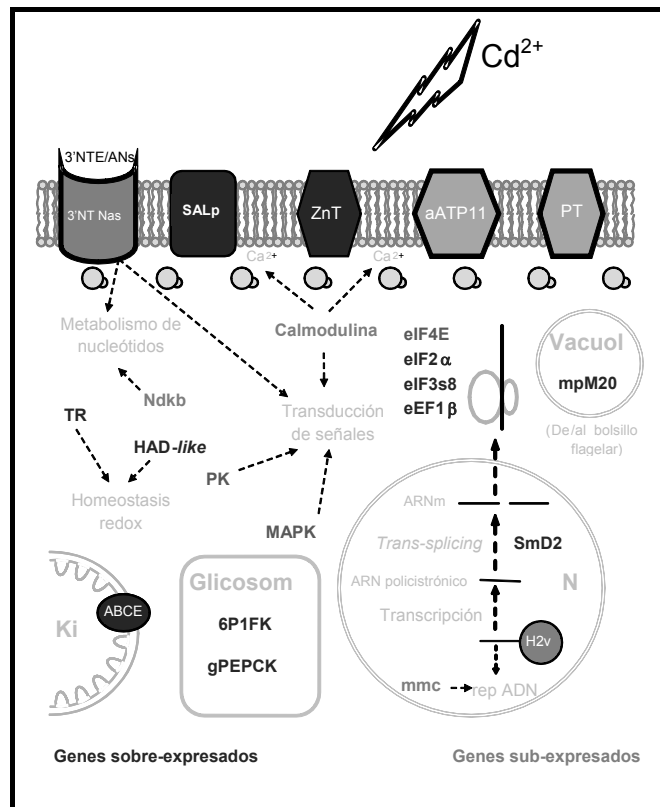


Figura 58. Esquema del perfil de expresión génica de los promastigotes expuestos a acetato de cadmio.

Como consecuencia de la exposición a acetato de cadmio, se han detectado genes diferencialmente expresados relacionados con el transporte, la transducción de señales, el metabolismo de nucleótidos y la regulación de la expresión génica. Dos genes de transportadores están sobre-expresados con la presencia de cadmio: ZnT y ABCE. ZnT es capaz de transportar diferentes tipos de metales pesados (GO). Otros dos transportadores están sub-expresados en el nivel de transcrito: PT LinJ06_V3.1320 y aATP11 (dos copias en tándem). En las vías de señalización intracelular, un gen de PK, otro de MAPK los genes 3'NT/Nasa están sub-expresados. En cuanto a la replicación del ADN y la regulación de la expresión génica, mmc, una variante de histona H2B (H2Bv) y el factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) están sobre-expresados en presencia de cadmio, mientras que la ribonucleoproteína pequeña nuclear Smd2, eIF2 α , eIF3s8 y el factor de elongación eEF1 β están sub-expresados. Se ha hallado también la sobre-expresión en presencia de cadmio de una metaloexopeptidasa vacuolar (GO) de la familia M20, Clan MH (mpM20).

Tabla 28. Genes sobre-expresados por la presencia de cadmio. Las características descritas son: número de clon; F; log₂F y la cuasidesviación típica (S); p; número de acceso GSS; anotación.; función génica anotada; resultado de la qRT-PCR. Cuando un clon solapa con más de una anotación génica, se considera expresión diferencial sólo si el resultado de la qRT-PCR es positivo.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Anotación	Función génica anotada	qRT-PCR F ± S
							+/-
Lin13D11	1,79	0,8 ± 0,3	0,042	GS882959	LinJ21_V3.0770	Proteína con casete de unión a ATP (ABC), subfamilia E	N.D.
Lin89D9	1,76	0,8 ± 0,2	0,029	GS882960			
Lin166F2	2,19	1,1 ± 0,2	0,012	GS882961			
Lin76E5	1,80	0,8 ± 0,3	0,032	GS882962	LinJ36_V3.7320	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 3, subunidad 8	N.D.
Lin93A7	2,09	1,1 ± 0,2	0,038	GS882963	LinJ21_V3.0790	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin95A3	2,16	1,1 ± 0,1	0,004	GS882964			
Lin101D5	2,46	1,3 ± 0,4	0,035	GS882965	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal	N.D.
Lin116A5*	1,83	0,9 ± 0,1	0,008	GS882966	LinJ05_V3.0350	Tripantonión reductasa	+ 6.76 ±
					LinJ05_V3.0360	ARN helicasa ATP-dependiente, putativa	- -1.23 ±
Lin125A5	1,73	0,8 ± 0,1	0,006	GS882967	LinJ32_V3.2410	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin139F3*	1,73	0,8 ± 0,2	0,030	GS882968	LinJ29_V3.2470	(Asp) Metalopeptidasa, Clan MH, familia M20	+ 8.67 ±
Lin144H7	2,03	1,0 ± 0,3	0,028	GS882969	LinJ31_V3.1210	Proteína hipotética de función desconocida	N.D.
Lin177E11*	1,70	0,8 ± 0,3	0,038	GS882970	LinJ29_V3.2620	6-fosfo-1-fructoquinasa, putativa	+ 2.55 ±
Lin295F11	1,82	0,9 ± 0,3	0,041	GS882971			
Lin124C7	1,97	1,0 ± 0,2	0,013	GS882972	LinJ33_V3.3340	Ribonucleoproteína pequeña nuclear SmD2	N.D.
Lin150H10	2,12	1,1 ± 0,3	0,018	GS882973	LinJ05_V3.1210	Proteína de tipo antígeno de superficie	N.D.
Lin198E1	1,77	0,8 ± 0,1	0,008	GS882974	LinJ27_V3.2460	Desconocido	N.D.
Lin221B6	1,77	0,8 ± 0,2	0,015	GS882975	LinJ28_V3.1470/80	Hidrolasa de tipo haloácido dehalogenasa	N.D.
Lin228F5	4,25	2,1 ± 0,3	0,033	GS882976	LinJ06_V3.1290	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin234F2	1,76	0,8 ± 0,2	0,021	GS882977	LinJ28_V3.0530	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin248G3	2,03	1,0 ± 0,2	0,011	GS882978	LinJ23_V3.0130	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin282B6	2,85	1,5 ± 0,5	0,039	GS882979	LinJ03_V3.0960	Subunidad α del factor de iniciación 2, putativa	N.D.
Lin283D9	1,74	0,8 ± 0,2	0,019	GS882980	LinJ28_V3.2050	Transportador de Zn (dominio ZIP), putativo	N.D.
Lin284F5	2,58	1,4 ± 0,3	0,011	GS882981	LinJ36_V3.1490	Factor traduccional de elongación 1β, putativa	+ 30.57 ±
Lin309A6	1,92	0,9 ± 0,2	0,10	GS882982	LinJ26_V3.2710	Proteína hipotética de función desconocida	N.D.

Tabla 29. Genes sub-expresados por la presencia de cadmio. Las características descritas son: número de clon; F; log₂F y la cuasidesviación típica; p; número de acceso GSS; anotación.; función génica anotada; resultado de la qRT-PCR. Cuando un clon solapa con más de una anotación génica, se considera expresión diferencial sólo si el resultado de la qRT-PCR es positivo.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Anotación	Función génica anotada	qRT-PCR F ± S
							+/-
Lin54F2	-2,05	-1,0 ± 0,3	0,022	GS882983	LinJ03_V3.0600/10	Transportador de aminoácidos aATP11, putativo	N.D.
Lin60B1*	-2,80	-1,5 ± 0,2	0,004	GS882984	LinJ31_V3.2370/80	3'-nucleotidasa/nucleasa/precursor	+ 54.85 ±
Lin84E8	-2,89	-1,5 ± 0,0	0,000	GS882985			
Lin93D4	-1,72	-0,8 ± 0,2	0,024	GS882986			
Lin157D8	-3,08	-1,6 ± 0,2	0,007	GS882987			
Lin242E2	-2,87	-1,5 ± 0,3	0,016	GS882988			
Lin77B12	-1,71	-0,8 ± 0,1	0,004	GS882989	LinJ27_V3.1520	Factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF-4E, putativo	N.D.
Lin125B3	-1,71	-0,8 ± 0,1	0,005	GS882990			
Lin84D7	-1,81	-0,9 ± 0,3	0,032	GS882991	LinJ32_V3.3100	Nucleósido difosfato quinasa b	N.D.
Lin104C3	-1,87	-0,9 ± 0,1	0,006	GS882992	LinJ32_V3.3100/10		
Lin158H4	-2,11	-1,1 ± 0,3	0,029	GS882993	LinJ32_V3.3120	Proteína de mantenimiento de minicromosomas (mmc)	+ 54.85 ±
Lin83G10	-1,78	-0,8 ± 0,1	0,036	GS882994	LinJ32_V3.3110	Nucleósido difosfato quinasa b	N.D.
Lin135A4	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,016	GS882995	LinJ33_V3.0100	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin150E4	-1,76	-0,8 ± 0,1	0,006	GS882996	LinJ13_V3.0280	Proteína quinasa activada por mitógeno	N.D.
Lin173F3	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,012	GS882997	LinJ13_V3.1060	Calmodulina, putativa	N.D.
Lin187C10	-2,77	-1,5 ± 0,3	0,013	GS882998	LinJ25_V3.1520	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin201C10	-1,77	-0,8 ± 0,2	0,015	GS882999	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo	N.D.
Lin227B5	-1,76	-0,8 ± 0,1	0,015	GS883000	LinJ34_V3.2770	Proteína hipotética conservada	N.D.
					LinJ20_V3.0290	Proteína hipotética conservada	N.D.
					LinJ20_V3.0300	Proteína hipotética conservada	N.D.
					LinJ20_V3.0310	Fosfoproteína regulada en el desarrollo	- 1.43 ±
Lin231A1	-1,72	-0,8 ± 0,2	0,019	GS883001	LinJ29_V3.2680	Proteína quinasa, putativa	N.D.
Lin255E12	-1,76	-0,8 ± 0,2	0,019	GS883002	LinJ28_V3.0210	Variante de histona H2B	N.D.
Lin273A8	-1,86	-0,9 ± 0,2	0,012	GS883003	LinJ12_V3.0650	Proteína hipotética conservada	N.D.

Resultados

El gen de la calmodulina está sub-expresado bajo la presión selectiva del cadmio. Entre sus funciones, se puede destacar que es esencial para la homeostasis del Ca^{2+} , que se realiza mediante acumulación en la membrana plasmática en tripanosomátidos, a diferencia de lo que ocurre en otros eucariotas. La acumulación se desencadena por la activación de una Ca^{2+} -ATPasa por la calmodulina (Benaim y col., 1993). Una proteína de tipo haloácido dehalogenasa (HAD-like), perteneciente a la familia de las dehalogenasas (PF), que incluye miembros relacionados con la detoxificación (Koonin y Tatusov, 1994), está sobre-expresada en presencia de cadmio. Además, se sobre-expresa el gen gPEPCK, el gen de la 6-fosfo-1-fructoquinasa (6PFK) y el gen SALp.

4.6.2. Perfil de expresión génica de los promastigotes de *L. infantum* con depleción de suero bovino fetal.

El crecimiento de promastigotes disminuye notablemente con la depleción de HIFBS (Figura 59). Tras el aislamiento del ARN total y su amplificación (Figura 60), se realizó el análisis de tres réplicas de ensayos de hibridación con *microarrays* (Figuras 61 y 62, Tabla 30). Como resultado, se han detectado 26 genes sobre-expresados como consecuencia de la depleción de suero en el medio de cultivo y 26 sub-expresados, de los cuales sólo 5 y 1 respectivamente son de función conocida, 3 y 3 son genes hipotéticos conservados (Tabla 31), 11 y 2 son indeterminados por solapar el clon en el que están representados más de una secuencia génica y 7 y 20 no están anotados, al no solapar con ninguna secuencia codificante los clones en los que están representados (Tabla A23). No fue detectada expresión diferencial de ninguno de los genes control positivo (Tabla 30).

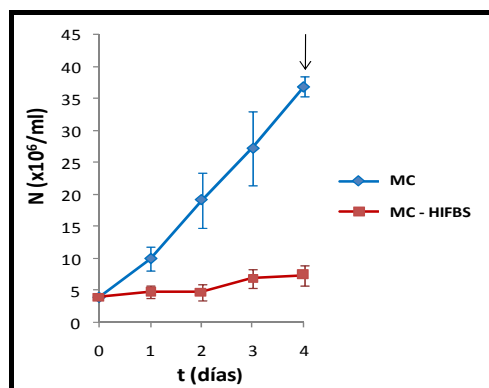


Figura 59. Curva de crecimiento de los promastigotes con depleción de HIFBS en el medio de cultivo.

La gPEPCK está sub-expresada con depleción de nutrientes. Los siguientes genes están sobre-expresados con la depleción de nutrientes: el gen que codifica para una 4-cumarato-CoA ligasa, que participa en la biosíntesis de ubiquinona o CoQ, siendo el sustrato de la reacción catalizada por esta enzima el 4-cumarato y el producto el 4-cumaroil-CoA; SerP51; metilmalonil-CoA epimerasa, que participa en el metabolismo del propanoato y la degradación de la valina, la leucina y la isoleucina; y la proteína de choque térmico hsp20.

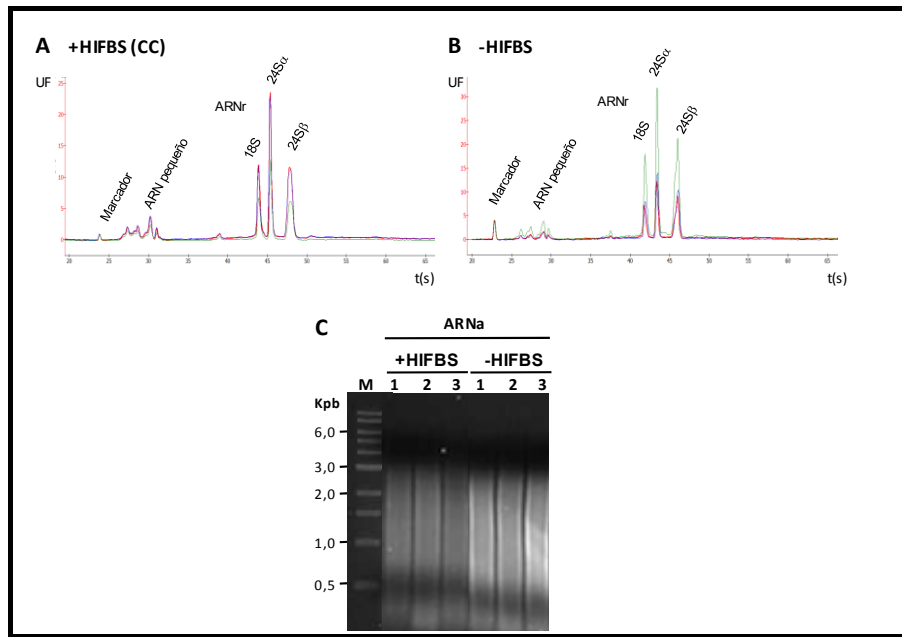


Figura 60. Análisis de la integridad del ARN total y del ARNa de los promastigotes en presencia y ausencia de HIFBS. El primer pico corresponde al marcador *RNA 6000 Nano Marker* (Agilent Technologies). Se aprecia la integridad del ARN por la presencia de los picos de ARNr 18S y 24S α y β con una ratio 24S/18S de aproximadamente 2,1 y ausencia de *smear* en la porción anterior al pico 18S. (A) Control +HIFBS (CC). (B) -HIFBS.

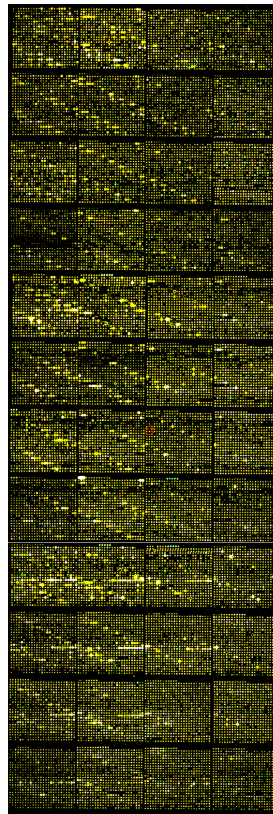


Figura 61. Hibridación con microarrays de los ADNc obtenidos de los promastigotes en cultivo en presencia (Cy3) y ausencia de HIFBS (Cy5). Se muestra una réplica del experimento de hibridación.

Resultados

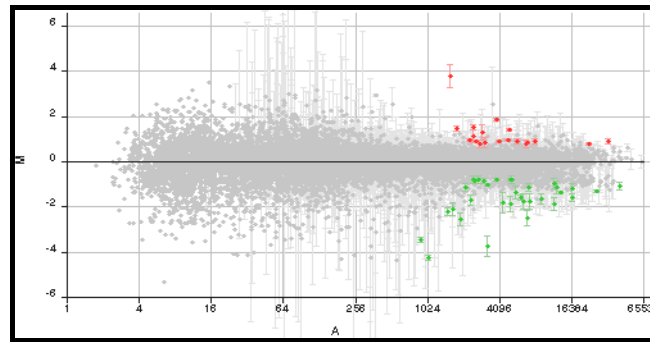


Figura 62. Diagrama de dispersión M/A del análisis de hibridación con *microarrays* correspondiente a los promastigotes en cultivo en presencia (Cy3) y ausencia de HIFBS (Cy5). $M = (\log_2 R_i / \log_2 V_i)$ y $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i) / 2]$ (Ecuaciones 7 y 8), donde R y V son respectivamente la intensidad de fluorescencia del rojo (Cy5) y del verde (Cy3).

Tabla. 30. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes en presencia y ausencia de HIFBS. Para los controles positivos se detalla F y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de p del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

Spot	F \pm S	p	Control positivo
cLin79A1	1,3 \pm 0,0	0,332	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	-1,1 \pm 0,1	0,054	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	2,0 \pm 0,1	0,007	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,2 \pm 0,3	0,268	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,3 \pm 0,3	0,565	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,1 \pm 0,1	0,860	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,1 \pm 0,4	0,180	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	1,2 \pm 0,1	0,166	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,3 \pm 0,5	0,830	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,0 \pm 0,0	0,145	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	1,4 \pm 0,5	0,956	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,1 \pm 0,2	0,913	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 \pm 0,7	0,969	<i>HerringS DNA</i>
Spot	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	51 \pm 35		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	12 \pm 3		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	164 \pm 74		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	138 \pm 35		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	362 \pm 127		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	78 \pm 26		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	118 \pm 57		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	22 \pm 12		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	7 \pm 1		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	45 \pm 21		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	27 \pm 15		<i>IXSSC</i>

Tabla. 31. Genes diferencialmente expresados por la depleción de HIFBS. Las características descritas son: número de clon; F ($\geq 1,7$ sobre-expresión, sobre la línea divisoria, y $\leq -1,7$ sub-expresión, por debajo de la línea divisoria); $\log_2 F$ y la cuasidesviación típica (S); p ; número de acceso GSS; anotación.; función génica anotada.

Clon	F	$\log_2 R \pm S$	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin101B5	1,97	1,0 \pm 0,6	0,050	0	0	b	LinJ09_V3.0960	Serina peptidasa, familia 51, peptidasa E, putativa
Lin123D6	1,77	0,8 \pm 0,1	0,001	0	0	b	LinJ34_V3.2660	Proteína de tipo amastina
Lin253D4	2,24	1,2 \pm 0,5	0,045	0	0	b		
Lin169D1	2,69	1,4 \pm 0,1	0,031	0	0	a	LinJ26_V3.0030	Metilmalonil-CoA epimerasa
Lin212F11	2,66	1,4 \pm 0,2	0,006	0	0	b	LinJ19_V3.0940	4-cumarato-CoA ligasa
Lin247G6	1,70	0,8 \pm 0,1	0,007	0	0	b	LinJ29_V3.2560	Proteína de choque térmico hsp20
Lin268B3	1,73	0,8 \pm 0,1	0,021	0	0	b	LinJ23_V3.0940	Proteína hipotética conservada
Lin302C8	1,89	0,9 \pm 0,0	0,001	0	0	b	LinJ29_V3.0930	Proteína hipotética conservada
Lin305D10	1,89	0,9 \pm 0,3	0,025	0	0	b	LinJ23_V3.0390	Proteína hipotética conservada
Lin32H7	-2,41	-1,3 \pm 0,0	0,011	0	0	a	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal, putativa
Lin101D5	-2,15	-1,1 \pm 0,1	0,005	0	9e-37	b	LinJ31_V3.1680	Proteína hipotética conservada
Lin112D5	-1,73	-0,8 \pm 0,1	0,002	6e-84	1e-66	b	LinJ30_V3.3140	Proteína hipotética conservada
Lin281H8	-13,23	-3,7 \pm 0,4	0,007	6e-115	3e-166	b	LinJ03_V3.0540	Proteína hipotética conservada

4.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE PROMASTIGOTES DE *L. infantum* OBTENIDOS DE *P. perniciosus*, PROMASTIGOTES EN CULTIVO AXÉNICO Y AMASTIGOTES INTRACELULARES.

Se aisló el ARN total de los promastigotes extraídos de tubos digestivos de hembras de *P. perniciosus*, los cuales fueron cedidos por el Dr. Ricardo Molina (Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, ISCIII, Majadahonda). En el proceso de aislamiento del ARN, se añadió glucógeno como portador (*carrier*) a la fase acuosa recuperada en la etapa previa a la precipitación (sección 3.6.3.). Para obtener suficiente cantidad de ARNm, se realizaron dos rondas de amplificación del ARNm (sección 3.6.4.). Las muestras de ARNa de los promastigotes axénicos en fase estacionaria, de la subpoblación PNA⁻ y de los amastigotes intracelulares procedían de los experimentos descritos en las secciones 4.3. y 4.4., y fueron amplificadas por segunda vez para que fuesen comparables con las de ARNaa de los promastigotes extraídos de *P. perniciosus* (Figura 63). Los experimentos de hibridación con *microarrays* fueron: Cy5-ADNc de los promastigotes obtenidos del tubo digestivo del vector vs. Cy3-ADNc de los promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico (Pro-Pper/E); Cy5-ADNc de Pro-Pper vs. Cy3-ADNc de los promastigotes PNA⁻ (Pro-Pper/PNA⁻); y Cy5-ADNc de Pro-Pper vs. Cy3-ADNc de amastigotes intracelulares (Pro-Pper/A) (Figura 64). Una vez realizado el análisis de hibridación por *microarrays* con tres réplicas, los criterios de selección de clones diferencialmente expresados aplicados en este caso fueron: $F \geq 2,0$ ó $\leq -2,0$ (Cy5/Cy3 si $Cy5 > Cy3$ y $-Cy3/Cy5$ si $Cy5 < Cy3$); 5000 UF; $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) (Figura 65). Se detectó la sub-expresión de los genes de control interno de los *microarrays* A2 y p36 en Pro-Pper/A, mientras que el resto están constitutivamente expresados (Tablas 32, 33 y 34). Los genes diferencialmente expresados de función conocida se describen en las Tablas 35-38, los de proteínas hipotéticas en las Tablas A24, A26, A28, A30, A32 y A34 y los no determinados en las Tablas A25, A27, A29, A31, A33 y A35.

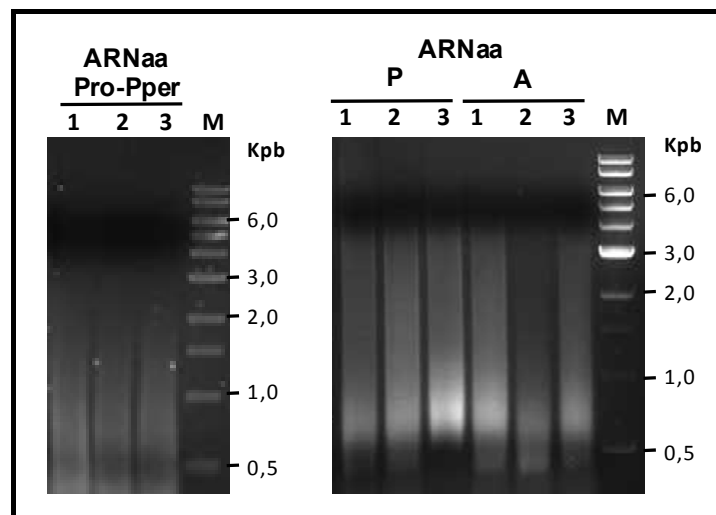


Figura 63. ARNaa de promastigotes de *L. infantum* obtenidos de la parte anterior del tubo digestivo de *P. perniciosus*. Se muestra el ARNaa de las tres réplicas. La preparación del ARNaa de los promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico, de los promastigotes PNA⁻ y de los amastigotes ha sido descrita en las secciones 4.3.1. y 4.4.1.

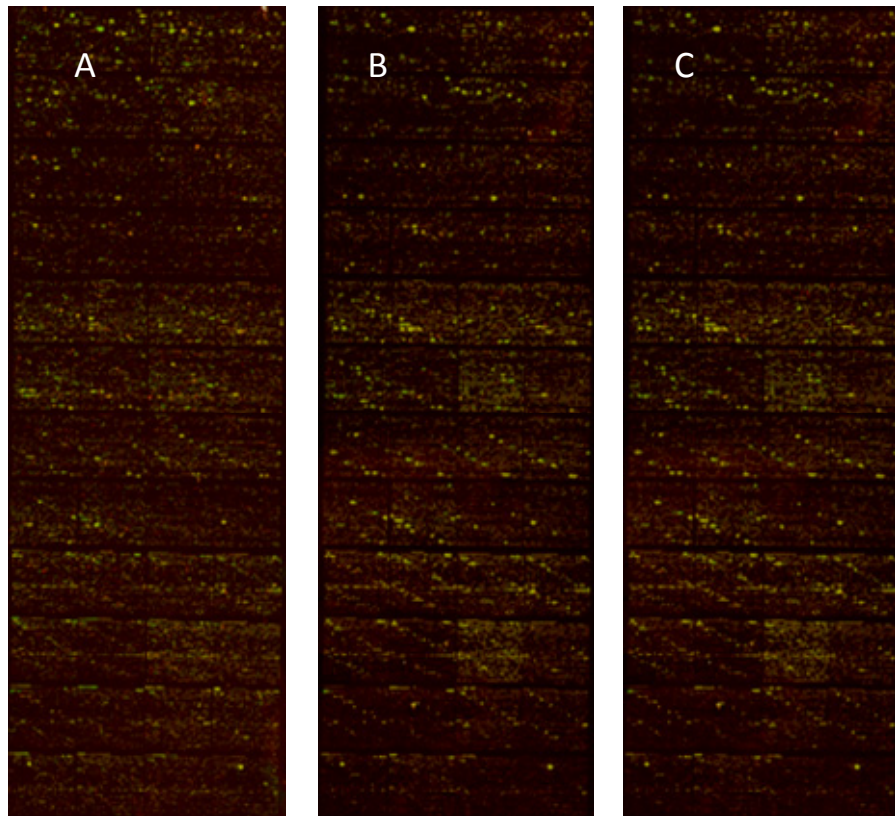


Figura 64. *Microarrays* de *L. infantum* hibridados con ADNc de los promastigotes extraídos del tubo digestivo de *P. perniciosus*, E, PNA⁻ y A. Imagen de una de las réplicas biológico-técnicas de cada ensayo de hibridación. (A) Pro-Pper/E. (B) Pro-Pper/PNA⁻. (C) Pro-Pper/A.

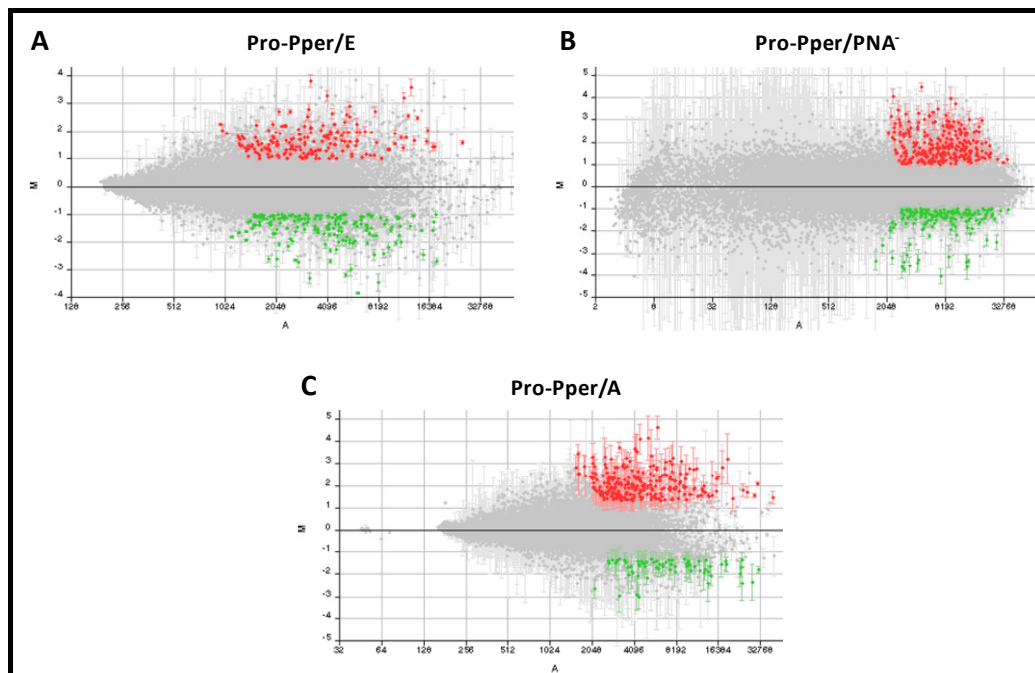


Figura 65. Diagramas de dispersión M/A de los análisis de hibridación con *microarrays* correspondientes a los promastigotes derivados de *P. perniciosus* en relación con E, PNA⁻ y A. $M = (\log_2 R_i / \log_2 V_i)$ y $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i) / 2]$ (Ecuaciones 7 y 8), donde R y V son respectivamente la intensidad de fluorescencia del rojo (Cy5) y del verde (Cy3).

Tabla 32. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes Pro-Pper y E. Para los controles positivos se detalla F (*fold change*) de E/L y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la *t*, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; al ser en todos los casos $p \geq 0,05$, no hay expresión diferencial en Pro-Pper/E en ninguno de los genes control positivo. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	<i>p</i>	Control positivo
cLin79A1	-1,3 \pm 0,6	0,120	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	1,1 \pm 1,0	0,229	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	1,2 \pm 0,4	0,060	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,0 \pm 0,1	0,448	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	-1,1 \pm 0,2	0,296	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	-1,2 \pm 0,3	0,475	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,1 \pm 0,1	0,367	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	1,0 \pm 0,0	0,313	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,1 \pm 0,2	0,477	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,1 \pm 0,1	0,410	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	1,1 \pm 0,1	0,741	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,1 \pm 0,1	0,605	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,1 \pm 0,2	0,547	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	583 \pm 230		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	224 \pm 326		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	408 \pm 37		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	270 \pm 110		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	216 \pm 49		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	120 \pm 54		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	153 \pm 25		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	111 \pm 81		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	31 \pm 2		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	108 \pm 62		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	30 \pm 9		<i>IXSSC</i>

Tabla 33. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes Pro-Pper y PNA⁺. Para los controles positivos se detalla F (*fold change*) de Pro-Pper/PNA⁺ y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la *t*, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; al ser en todos los casos $p \geq 0,05$, no hay expresión diferencial en Pro-Pper/PNA⁺ en ninguno de los genes control positivo. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	<i>p</i>	Control positivo
cLin79A1	1,2 \pm 0,2	0,271	<i>Li Polβ</i>
cLin79A2	1,4 \pm 0,1	0,103	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	1,1 \pm 0,2	0,329	<i>Li p36</i>
cLin79B1	-1,2 \pm 0,2	0,072	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,1 \pm 0,2	0,114	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,0 \pm 0,0	0,253	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	-1,2 \pm 0,1	0,511	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	1,3 \pm 0,5	0,447	<i>Li A2</i>
cLin79C3	1,1 \pm 0,1	0,136	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,3 \pm 0,2	0,152	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	-1,1 \pm 0,4	0,111	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,0 \pm 0,2	0,409	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,0 \pm 0,2	0,510	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	25 \pm 3		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	187 \pm 110		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	321 \pm 34		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	515 \pm 47		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	94 \pm 13		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	132 \pm 32		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	440 \pm 243		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	25 \pm 12		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	63 \pm 53		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	575 \pm 218		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	20 \pm 3		<i>IXSSC</i>

Resultados

Tabla 34. Resultados de la hibridación de los controles de los *microarrays* de ADN de *L. infantum* con ADNc de promastigotes Pro-Pper y A. Para los controles positivos se detalla F (*fold change*) de Pro-Pper/A y la cuasidesviación típica (S), así como el valor de *p* del test de la t, siendo el nivel de significación $\alpha = 0,05$; no hay expresión diferencial de los genes control positivo ($p \geq 0,05$), exceptuando el gen A2 y el gen p36, que están sobre-expresados en amastigotes. Para los controles negativos se detalla la intensidad de fluorescencia (IF) media y su cuasidesviación típica.

<i>Spot</i>	F \pm S	<i>P</i>	Control positivo
cLin79A1	1,0 \pm 0,3	0,885	<i>Li PolB</i>
cLin79A2	1,0 \pm 0,0	0,794	<i>Li TopoII</i>
cLin79A3	-1,9 \pm 0,9	0,047	<i>Li p36</i>
cLin79B1	1,1 \pm 0,2	0,392	<i>Li hsp70</i>
cLin79B2	1,0 \pm 0,0	0,694	<i>Ldo hsp70</i>
cLin79B3	1,0 \pm 0,0	0,767	<i>Lam hsp70</i>
cLin79C1	1,3 \pm 0,5	0,273	<i>Lma hsp70</i>
cLin79C2	-1,8 \pm 0,3	0,006	<i>Li A2</i>
cLin79C3	-1,5 \pm 0,1	0,062	<i>Ldo A2</i>
cLin79D1	1,2 \pm 0,3	0,082	<i>Li GAPDH</i>
cLin79D2	1,1 \pm 0,2	0,674	<i>Ldo GAPDH</i>
cLin79D3	1,1 \pm 0,3	0,168	<i>LigDNA</i>
cLin79H2	1,2 \pm 0,3	0,201	<i>HerringS DNA</i>
<i>Spot</i>	IF media \pm S		Control negativo
cLin79E1	402 \pm 123		<i>Lfe nifA/hlyD</i>
cLin79E2	34 \pm 23		<i>Lfe nifD/nifK</i>
cLin79E3	124 \pm 32		<i>Lfe nifH</i>
cLin79F1	112 \pm 45		<i>Lfe nifS/nifU</i>
cLin79F2	183 \pm 17		<i>Lfe nifX/nifB</i>
cLin79F3	112 \pm 77		<i>Lfe nifH/nifD</i>
cLin79G1	221 \pm 28		<i>Lfe nifE</i>
cLin79G2	154 \pm 64		<i>Lfe nifV/HesB</i>
cLin79G3	22 \pm 15		<i>Lfe nifV</i>
cLin79H1	83 \pm 12		<i>Lfe nifW/Bgene</i>
cLin79H3	58 \pm 21		<i>IXSSC</i>

Tabla 35. Genes de función conocida sobre-expresados en Pro-Pper/E. Las características descritas son: número de clon; F ($\geq 2,0$); $\log_2 F$ y la cuasidesviación típica (S); *p*; número de acceso GSS; anotación; función génica anotada.

<i>Clon</i>	<i>F</i>	$\log_2 R \pm S$	<i>p</i>	<i>GenBank GSS</i>	<i>Valor e</i>		<i>Def.</i>	<i>Anotación</i>	<i>Función génica anotada</i>
					<i>Fw</i>	<i>Rv</i>			
Lin9E5	4,24	2,1 \pm 0,1	0,001	S35A2	0	0	b	LinJ35_V3.1150	Oligosacril transferasa
Lin10H12	2,78	1,5 \pm 0,1	0,003	S42A2	0	3e-132	b	LinJ31_V3.0860	Proteína de tipo triacilglicerol lipasa
								LinJ31_V3.0870	Proteína de tipo precursor de lipasa
Lin13C3	5,77	2,5 \pm 1,0	0,049	S35A8	3e-175	0	b	LinJ21_V3.0770	Inhibidor de ribonucleasa L, ABC subfamilia E
Lin21H10	2,13	1,1 \pm 0,4	0,038	S42A7	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido 84 desaturasa
Lin22C9	3,75	1,9 \pm 0,4	0,018	S35B7	0	0	b	LinJ33_V3.2910	Proteína conjugante de ubiquitina, putativa
Lin27B2	5,28	2,4 \pm 0,6	0,023	S35C6	0	0	b	LinJ35_V3.1230	Deshidrogenasa de cadena corta, putativa
								LinJ36_V3.1240	Deshidrogenasa de cadena corta, putativa
Lin28B5	4,72	2,2 \pm 0,5	0,014	S35C8	0	-	c	LinJ35_V3.1230	Deshidrogenasa de cadena corta, putativa
Lin31D4	3,22	1,7 \pm 0,2	0,004	S35C11	5e-131	0	b	LinJ36_V3.4230	Metalopeptidasa carboxipeptidasa de zinc, Clan MC, familia M14
Lin32A10	2,46	1,3 \pm 0,4	0,038	S42B8	0	0	b	LinJ32_V3.3080	Proteína de tipo tubulina-tirosina ligasa
Lin34F1	3,20	1,7 \pm 0,4	0,017	S35D1	0	0	b	LinJ08_V3.1000	Histona deacetilasa, putativa
Lin44C6	11,88	3,6 \pm 1,2	0,034	S35D12	0	0	a	LinJ31_V3.3310	Proteína hipotética conservada
								LinJ31_V3.3320	Histona H4, putativa
Lin49B3	2,27	1,2 \pm 0,1	0,003	S42C11	0	0	a	LinJ31_V3.0860	Proteína de tipo triacilglicerol lipasa
								LinJ31_V3.0870	Proteína de tipo precursor de lipasa
Lin49B6	4,72	2,2 \pm 0,3	0,008	S35E11	0	0	b	LinJ06_V3.1310	Proteína hipotética conservada
								LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo
Lin49B7	15,89	4,0 \pm 0,5	0,006	S35E12	0	0	b	LinJ36_V3.2050	Proteína reparadora de desapareamientos MSH8 (<i>Mismatch repair protein</i>)
Lin64A8	2,88	1,5 \pm 0,1	0,003	S42D9	0	0	b	LinJ36_V3.3570	Deshidrogenasa de cadena corta, putativa
Lin72A2	2,16	1,1 \pm 0,2	0,009	S42E1	0	0	b	LinJ36_V3.0640	Sec14, factor citosólico
Lin76A1	6,02	2,6 \pm 0,8	0,028	S35G3	0	0	b	LinJ31_V3.3320	Histona H4, putativa
Lin76F1	7,81	3,0 \pm 1,1	0,044	S35G4	0	0	b	LinJ34_V3.3370	Fosfatidilinositol 4-quinasa, putativa
Lin77B12	2,03	1,0 \pm 0,1	0,002	S42E5	0	0	b	LinJ27_V3.1520	Factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF4E, putativo
Lin80B3	2,79	1,5 \pm 0,2	0,005	S42E8	0	0	b	LinJ28_V3.3250	Glucosa-6-fosfato N-acetiltransferasa, putativa
Lin80C3	2,00	1,0 \pm 0,2	0,011	S42E9	0	0	b	LinJ28_V3.3250	Glucosa-6-fosfato N-acetiltransferasa, putativa
Lin83C12	2,76	1,5 \pm 0,4	0,020	S42E11	0	0	b	LinJ36_V3.2160	α -1,3-manosiltransferasa, putativa
Lin100E10	2,17	1,1 \pm 0,2	0,013	S42F10	2e-40	0	b	LinJ35_V3.3900	Proteína 1 del complejo T, subunidad η , putativa
Lin103E2	3,16	1,7 \pm 0,2	0,004	S36A1	0	0	b	LinJ31_V3.3180	Proteína de tipo transportador de hierro/zinc
Lin103F1	2,48	1,3 \pm 0,2	0,008	S42G7	0	0	a	LinJ35_V3.3080	Carboximetiltransferasa específica de proteína prenilada, putativa
Lin107C2	2,29	1,2 \pm 0,1	0,004	S42G11	0	0	b	LinJ08_V3.1000	Histona deacetilasa, putativa
Lin111D8	4,80	2,3 \pm 0,3	0,006	S36A10	0	0	a	LinJ08_V3.1000	Histona deacetilasa, putativa
Lin112A4	2,49	1,3 \pm 0,4	0,030	S42H1	1e-69	5e-72	b	LinJ32_V3.0050	Proteína de transporte de proteínas sec13, putativa
Lin112H3	3,79	1,9 \pm 0,6	0,029	S36A11				LinJ29_V3.2070	Proteína farnesiltransferasa, putativa
Lin112H8	3,24	1,6 \pm 0,4	0,008	S36A12	8e-170	0	b	LinJ28_V3.2270	Culina 2, putativa

Continuación Tabla 35

Lin123G3	9,84	3,3 ± 0,4	0,006	S36B3	0	0	a	LinJ23_V3.0060	Ciclofilina, putativa
Lin134A9	4,93	2,3 ± 0,3	0,007	S36C5	0	0	a	LinJ36_V3.2040 LinJ36_V3.2050	Transportador de nucleósidos 1, putativo Proteína reparadora de desapareamientos MSH8 (<i>Mismatch repair protein</i>)
Lin134E11	3,90	2,0 ± 0,4	0,011	S36C7	0	0	a	LinJ23_V3.0060	Ciclofilina, putativa
Lin139D8	4,68	2,2 ± 0,4	0,009	S36D7	0	0	b	LinJ08_V3.0010	Proteína 3 de mantenimiento estructural de los cromosomas, putativa
Lin148E8	2,39	1,2 ± 0,1	0,003	S43C7	0	0	b	LinJ31_V3.3180 LinJ31_V3.3190	Proteína de tipo transportador de hierro/zinc Proteína de tipo transportador de hierro/zinc
Lin152C2	2,06	1,0 ± 0,3	0,021	S43C9	0	0	a	LinJ18_V3.0560	Subunidad c de la ATP sintasa vacuolar, putativa
Lin154G9	4,65	2,2 ± 0,3	0,007	S36E2	0	0	b	LinJ25_V3.0080	Proteína de unión a poli(A), putativa
Lin154H12	4,70	2,2 ± 0,2	0,003	S36E3	0	0	b	LinJ33_V3.1770	Proteína biosintética de N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol, putativa
Lin158C1	2,98	1,6 ± 0,1	0,002	S43D4	0	0	b	LinJ21_V3.2140	Proteína γ de la subunidad F1 de la ATP sintasa, putativa
Lin166F2	9,47	3,2 ± 0,8	0,021	S36F1	1e-177	0	b	LinJ21_V3.0770	Inhibidor de ribonucleasa L, ABC subfamilia E, putativo
Lin169E6	2,24	1,2 ± 0,1	0,001	S43E3	0	0	b	LinJ32_V3.0550	Profilina, putativa
Lin178A5	3,74	1,9 ± 0,1	0,001	S36F12	0	0	b	LinJ36_V3.1490	Factor de elongación traduccional 1β, putativo
Lin178D11	3,11	1,6 ± 0,2	0,006	S36G1	2e-78	8e-99	b	LinJ27_V3.2490	Cisteína peptidasa de tipo calpaína
Lin183H5	2,39	1,3 ± 0,4	0,032	S43E10	0	0	b	LinJ34_V3.1630 LinJ34_V3.1640	Proteína hipotética conservada Quinesina, putativa
Lin187B12	3,83	1,9 ± 0,7	0,043	S36G7	0	0	a	LinJ32_V3.0110	Proteína portadora mitocondrial (<i>Mitochondrial carrier protein</i>)
Lin187C10	14,86	3,9 ± 0,2	0,001	S36G8	0	0	b	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo
Lin187H6	2,15	1,1 ± 0,2	0,009	S43E12	0	0	b	LinJ34_V3.1640	Quinesina, putativa
Lin206F10	2,07	1,0 ± 0,3	0,029	S43F9	0	0	b	LinJ07_V3.0410	Proteína quinasa, putativa
Lin208F7	4,53	2,2 ± 0,4	0,013	S36H7	0	0	b	LinJ30_V3.3640	Serina/treonina proteína quinasa, putativa
Lin208H5	7,31	2,9 ± 0,5	0,012	S36H8	0	0	b	LinJ28_V3.2200	Proteína de tipo ARN polimerasa dirigida a ADN, putativa
Lin214H2	2,17	1,1 ± 0,1	0,006	S43G1	0	0	b	LinJ06_V3.0590	Proteína ribosómica 60S L23a, putativa
Lin215C7	4,53	2,2 ± 0,2	0,002	S36H11	1e-128	0	b	LinJ22_V3.1340	Serina/treonina proteína fosfatasa 1, putativa
Lin217H5	2,02	1,0 ± 0,1	0,004	S43G3	0	0	b	LinJ31_V3.0860 LinJ31_V3.0870	Proteína de tipo triacilglicerol lipasa Proteína de tipo precursor de lipasa
Lin254A4	2,42	1,3 ± 0,2	0,042	S43H3	0	0	b	LinJ04_V3.1250	Actina
Lin269A6	3,67	1,9 ± 0,4	0,012	S37B7	0	0	a	LinJ23_V3.0060 LinJ23_V3.0070 LinJ23_V3.0080	Ciclofilina, putativa Proteína hipotética conservada Agmatinasa, putativa
Lin274G12	4,28	2,1 ± 0,2	0,003	S37B8	0	0	a	LinJ23_V3.0040 LinJ23_V3.0050	Proteína todo β toroidal (<i>β-propeller</i>), putativa Peroxidoxina (Triparredoxina peroxidasa)
Lin287D1	2,31	1,2 ± 0,0	0,001	S44A1	2e-56	0	b	LinJ26_V3.1530	Proteína de tipo precursor mitocondrial de la α subunidad de la enzima trifuncional
Lin289A8	3,99	2,0 ± 0,7	0,035	S37C4	0	0	b	LinJ07_V3.0010	Enzima activadora de ubicuitina E1, putativa
Lin298H2	4,03	2,0 ± 0,1	0,001	S37C8	0	0	b	LinJ22_V3.1340	Serina/treonina proteína fosfatasa 1, putativa

Tabla 36. Genes de función conocida sub-expresados en Pro-Pper/E. Las características descritas son: número de clon; F ($\leq -2,0$); $\log_2 F$ y la cuasidesviación típica (S); p; número de acceso GSS; anotación; función génica anotada.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin18A12	-2,32	-1,2 ± 0,5	0,046	S44B1	0	0	b	LinJ33_V3.2430	UDP-glucosa 4'-epimerasa, putativa
Lin21B8	-2,05	-1,0 ± 0,3	0,037	S44B6	0	2e-43	b	LinJ31_V3.2420	p-nitrofenilfosfatasa, putativa
Lin24A5	-2,31	-1,2 ± 0,3	0,015	S44B10	0	0	b	LinJ36_V3.5240	Proteína ribosómica 40S SA, putativa
Lin24C6	-3,30	-1,7 ± 0,1	0,003	S37A8	0	0	b	LinJ36_V3.5240	Proteína ribosómica 40S SA, putativa
Lin25B7	-2,73	-1,4 ± 0,2	0,008	S44B11	0	0	b	LinJ31_V3.3390	Proteína de resistencia a estibogluconato sódico, putativa
Lin27C2	-2,78	-1,5 ± 0,5	0,040	S44C2	0	0	b	LinJ15_V3.1070	Glutamato deshidrogenasa
Lin30H4	-4,73	-2,2 ± 0,1	0,015	S37A12	0	3e-107	b	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal, putativa
Lin34B5	-2,06	-1,0 ± 0,1	0,004	S44C7	2e-142	0	b	LinJ03_V3.0190	δ-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, putativa
Lin34E3	-2,31	-1,2 ± 0,4	0,040	S44C10	9e-108	0	b	LinJ35_V3.2830	Proteína de tipo transportador
Lin34E10	-2,64	-1,4 ± 0,4	0,033	S44C9	0	2e-154	b	LinJ35_V3.2830	Proteína de tipo transportador
Lin35H4	-3,57	-1,8 ± 0,4	0,013	S37E3	0	0	b	LinJ34_V3.3740	Proteína de genes relacionados a los sitios de expresión 5 (ESAG5)
Lin50G2	-2,04	-1,0 ± 0,1	0,002	S44E5	0	0	b	LinJ34_V3.2660	Proteína de superficie de tipo amastina
Lin55D10	-2,50	-1,3 ± 0,1	0,004	S44E8	0	0	b	LinJ18_V3.1660	γ-glutamilcisteína sintetasa, putativa
Lin57H5	-2,40	-1,3 ± 0,2	0,009	S44E12	0	0	b	LinJ08_V3.0700	Proteína de tipo amastina
Lin63A3	-2,11	-1,1 ± 0,4	0,036	S44F8	0	0	b	LinJ34_V3.3440	Proteína ribosómica 60S L21, putativa
Lin63A8	-2,21	-1,1 ± 0,1	0,001	S44F9	0	0	a	LinJ07_V3.0060	Proteína de tipo α-adaptina
Lin79B10	-3,08	-1,6 ± 0,3	0,014	S37F10	0	0	b	LinJ35_V3.2580	Proteína hipotética, función desconocida
Lin79F8	-2,95	-1,6 ± 0,1	0,003	S44G12	8e-34	2e-34	a	LinJ24_V3.1910	Lisofosfolipasa, putativa
Lin80A1	-2,43	-1,3 ± 0,2	0,011	S44H1	0	2e-65	b	LinJ36_V3.6550	Transportador de glucosa lmg2, putativo
Lin83D11	-2,22	-1,1 ± 0,4	0,046	S44H3	0	0	b	LinJ08_V3.0700/ 10	Proteína de tipo amastina
Lin84B5	-2,04	-1,0 ± 0,3	0,032	S44H4	0	0	b	LinJ34_V3.3030	Piruvato/indol-piruvato carboxilasa, putativa
Lin91B12	-2,70	-1,4 ± 0,2	0,009	S45A4	0	0	b	LinJ34_V3.2660	Proteína de superficie de tipo amastina, putativa
Lin92F7	-2,04	-1,6 ± 0,1	0,002	S45A10	0	0	b	LinJ35_V3.0400	Proteína ribosómica 40S S3a, putativa
Lin93C5	-4,32	-2,1 ± 0,4	0,009	S37G3	0	1e-115	b	LinJ13_V3.1410 LinJ13_V3.1420	Tubulina α, putativa -
Lin95F9	-3,45	-1,8 ± 0,4	0,016	S37G5	0	0	b	LinJ28_V3.2360	Proteína ribosómica S29, putativa
Lin101D5	-3,61	-1,8 ± 0,4	0,014	S37H3	8e-31	0	b	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal, putativa
Lin102E4	-2,11	-1,1 ± 0,4	0,038	S45C1	1e-156	0	b	LinJ23_V3.1200	Proteína hidrofílica de superficie 2
Lin104F8	-2,71	-1,4 ± 0,3	0,011	S45C9	0	3e-129	b	LinJ24_V3.1280	Proteína de superficie de tipo amastina
Lin110A4	-2,15	-1,1 ± 0,3	0,028	S45D8	0	0	a	LinJ24_V3.1460	Proteína de reparación de desapareamientos (<i>mismatch repair protein</i>), putativa
Lin110F1	-2,16	-1,1 ± 0,3	0,013	S45D9	0	2e-105	b	LinJ35_V3.1850	Proteína de tipo proteína quinasa
Lin110G8	-2,22	-1,1 ± 0,3	0,013	S45D10	0	0	b	LinJ31_V3.0480	Cisteína peptidasa de tipo calpaína, Clan CA, familia C2, putativa
Lin114E2	-2,13	-1,1 ± 0,2	0,011	S45E7	0	0	b	LinJ36_V3.7220	Proteína del complejo del poro nuclear (NUP155)/nucleoporina, putativa
Lin123E6	-3,38	-1,8 ± 0,4	0,021	S38A2	0	0	b	LinJ23_V3.0980	Proteína de interacción con actina
Lin123D6	-2,72	-1,4 ± 0,1	0,001	S45F3	0	0	b	LinJ34_V3.2660	Proteína de superficie de tipo amastina
Lin125B1	-2,56	-1,4 ± 0,4	0,027	S45F9	0	0	b	Lin23_V3.1060	β-fructosidasa/invertasa/proteína de tipo sacarosa hidrolasa
Lin125H4	-2,71	-1,4 ± 0,2	0,008	S45F10	0	0	b	LinJ36_V3.1590	Serina/treonina proteína quinasa, putativa
Lin126D1	-2,74	-1,4 ± 0,2	0,007	S45F11	0	0	b	LinJ35_V3.2080	ATPasa de tipo P con motivo de calcio, putativa

Tabla 38. Genes de función conocida diferencialmente expresados en Pro-Pper/A. Las características descritas son: número de clon; F ($\geq 2,0$ sobre-expresión, sobre la línea divisoria, y $\leq -2,0$ sub-expresión, por debajo de la línea divisoria); $\log_2 R \pm S$ y la cuasidesviación típica (S); p; número de acceso GSS; anotación; función génica anotada.

Clon	F	$\log_2 R \pm S$	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
13C3	2,72	1,4 ± 0,3	0,011	S48A1				LinJ21_V3.0770	Inhibidor de ribonucleasa-L, ABC subfamilia E, putativo
16F1	3,69	1,9 ± 0,4	0,014	S39B1	-	0	c	LinJ23_V3.0050	Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa
17G12	2,49	1,3 ± 0,4	0,034	S48A6				LinJ19_V3.0940	4-cumarato-CoA ligasa
21H10	17,97	4,2 ± 1,0	0,019	S39B5	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido δ -4 desaturasa, putativa
22C9	2,14	1,1 ± 0,4	0,040	S48A8				LinJ33_V3.2910	Enzima conjugante de ubiquitina, putativa
27C6	4,17	2,1 ± 0,2	0,002	S39C5	0	0	a	LinJ31_V3.1240	Pirofosfatasa 1 translocadora de protones de tipo vacuolar, putativa
28C5	7,31	2,9 ± 0,6	0,020	S39C7	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido δ -4 desaturasa, putativa
31D11	3,00	1,6 ± 0,3	0,016	S48A11				LinJ31_V3.1870	Proteína de tipo proteína quinasa
34F1	2,98	1,6 ± 0,5	0,038	S48B3				LinJ08_V3.1000	Histona deacetilasa, putativa
41C12	2,95	1,6 ± 0,5	0,028	S48B8				LinJ31_V3.1600	Citocromo c oxidasa VIII (coxVIII), putativa
45A11	2,35	1,2 ± 0,4	0,033	S48B11				LinJ28_V3.2220	Proteína mitocondrial con caja DEAD, putativa
48B6	2,60	1,4 ± 0,4	0,026	S48C1				LinJ36_V3.2050	Proteína reparadora de desapareamientos MSH8, putativa
49B7	9,21	3,2 ± 1,1	0,039	S39E3	0	0	b	LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo
50G5	3,83	1,9 ± 0,4	0,016	S39E6	0	0	a	LinJ21_V3.2080	Citocromo oxidasa, subunidad VI (coxVI), putativa
51A8	2,24	1,2 ± 0,4	0,041	S48C6				LinJ32_V3.4190	Transferasa GPII galf, putativa
51E2	2,09	1,1 ± 0,2	0,018	S48C7				LinJ36_V3.0020	Histona H4
58H6	5,43	2,4 ± 1,0	0,049	S39F2	0	0	b	LinJ08_V3.0030	Proteína de membrana asociada a vesículas, putativa
76A1	3,08	1,6 ± 0,4	0,018	S39F9	0	0	a	LinJ31_V3.3320	Histona H4
76F1	5,40	2,4 ± 0,5	0,013	S39F11	0	0	b	LinJ34_V3.3370	Fosfatidilinositol 4-quinasa, putativa
77B12	2,01	1,0 ± 0,3	0,038	S48D2				LinJ27_V3.1520	Factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF4E, putativo
80B3	2,83	1,5 ± 0,6	0,049	S48D3				LinJ28_V3.3250	Glucosa-6-fosfato N-acetiltransferasa, putativa
82D10	4,25	2,1 ± 0,5	0,019	S39G9	0	0	a	LinJ23_V3.0040 LinJ23_V3.0050 LinJ23_V3.0060	Proteína todo β toroidal (β -propeller), putativa Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa Ciclofilina, putativa
93D6	5,50	2,5 ± 0,3	0,005	S39H2	0	0	b	LinJ26_V3.1670/80	Esfingolípido δ -4 desaturasa, putativa
96H7	4,92	2,3 ± 0,3	0,007	S39H9	0	0	a	LinJ26_V3.1690 LinJ31_V3.3310	Citocromo c oxidasa, subunidad V (coxV), putativa Proteína hipotética conservada
106G3	2,26	1,2 ± 0,3	0,029	S48E6				LinJ31_V3.3320	Histona H4
110F5	3,55	1,8 ± 0,3	0,011	S40A12	0	0	a	LinJ16_V3.1220	Biotina/lipoato proteína ligasa
111D8	9,80	3,3 ± 0,8	0,020	S40B1	0	0	a	LinJ08_V3.1000	Proteína ribosómica 60S L39, putativa
125F11	5,88	2,5 ± 1,0	0,046	S40B5	7e-56	3e-55	a	LinJ32_V3.2780	Histona deacetilasa, putativa
132A11	5,24	2,4 ± 0,1	0,001	S40C6	0	0	a	LinJ31_V3.1240	Cistationina β -liasa, putativa Pirofosfatasa 1 translocadora de protones de tipo vacuolar, putativa
139D8	5,85	2,5 ± 0,6	0,003	S40D6	0	0	b	LinJ08_V3.0010	Pirofosfatasa 1 translocadora de protones de tipo vacuolar, putativa
166F2	5,54	2,5 ± 0,7	0,023	S40E3	0	0	b	LinJ21_V3.0770	Proteína 3 de mantenimiento estructural de los cromosomas, putativa
168F2	2,17	1,1 ± 0,2	0,017	S48H1				LinJ21_V3.0770	Inhibidor de ribonucleasa L, ABC subfamilia E, putativa
169E6	6,66	2,7 ± 0,9	0,037	S40E8	0	0	b	LinJ32_V3.0550	Quinesina de tipo OSM-3
208F7	3,33	1,7 ± 0,6	0,033	S40G9	0	0	b	LinJ30_V3.3640	Profilina, putativa
276F6	3,47	1,8 ± 0,3	0,007	S41A7	0	0	b	LinJ35_V3.2370	Serina/treonina proteína quinasa, putativa
290F2	3,52	1,8 ± 0,3	0,012	S41B2	0	0	b	LinJ04_V3.1250	Proteína quinasa, putativa
298H2	7,23	2,8 ± 0,5	0,011	S41B4	0	0	b	LinJ22_V3.1340	Actina
299A1	4,34	2,1 ± 0,8	0,045	S41B6	0	0	b	LinJ22_V3.1340 LinJ36_V3.1720	Serina/treonina proteína fosfatasa Proteína de unión a la secuencia universal de los micirculos (UMSBP), putativa
18A12	-2,20	-1,1 ± 0,4	0,044	S49B1	0	0	b	LinJ33_V3.2430	UDP-glucosa 4'-epimerasa
25B7	-2,34	-1,2 ± 0,4	0,034	S49B3	0	0	b	LinJ31_V3.3390	Proteína de resistencia a estibogluconato sódico
30H4	-3,45	-1,8 ± 0,4	0,017	S41D5	0	2e-111	b	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal, putativa
35H4	-2,77	-1,5 ± 0,5	0,039	S49B9	0	0	b	LinJ34_V3.3740	Proteína 5 de expresión asociada a sitio (ESAG5), putativa
49D6	-2,83	-1,5 ± 0,5	0,031	S49C6	0	1e-152	b	LinJ19_V3.0590	Proteína quinasa, putativa
54A3	-2,21	-1,1 ± 0,4	0,037	S49C9	4e-156	0	b	LinJ36_V3.6510	Proteína G pequeña, putativa
77H8	-2,07	-1,0 ± 0,4	0,039	S49D7	0	0	b	LinJ08_V3.0690	Proteína de tipo amastina
88B2	-2,08	-1,1 ± 0,4	0,040	S49D10	0	0	b	LinJ10_V3.1070	Histona H3
101D5	-2,54	-1,3 ± 0,3	0,017	S49E10	0	2e-28	b	LinJ27_V3.2500	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal, putativa
101E5	-2,71	-1,4 ± 0,5	0,046	S49E11	0	0	b	LinJ35_V3.5330	Proteína quinasa, putativa
115H5	-2,37	-1,2 ± 0,4	0,034	S49F5	0	3e-136	b	LinJ03_V3.0790	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-difosfatasa, putativa
123E6	-2,11	-1,1 ± 0,3	0,019	S49F10	0	0	b	LinJ23_V3.0980	Proteína de interacción con actina
188B12	-2,46	-1,3 ± 0,1	0,001	S49H4	0	0	b	LinJ31_V3.3400	Proteína de resistencia a estibogluconato sódico, putativa
286D1	-2,41	-1,3 ± 0,4	0,035	S50B10	0	0	b	LinJ08_V3.1320	Proteína de tipo amastina
274G6	-2,25	-1,2 ± 0,4	0,037	S50B7	0	0	b	LinJ08_V3.0680/90	Proteína de tipo amastina
283F3	-2,12	-1,1 ± 0,3	0,023	S50B8	0	0	b	LinJ15_V3.0130	ARN helicasa ATP-dependiente, putativa
283H1	-2,60	-1,4 ± 0,2	0,010	S50B9	0	0	b	LinJ21_V3.1670	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad α , putativa
308D6	-2,11	-1,1 ± 0,1	0,002	S50C2	0	0	b	LinJ11_V3.0060	Proteína quinasa, putativa

El esquema de la Figura 66 ilustra la variación de los perfiles de expresión génica de los promastigotes extraídos de su medio natural (Pro-Pper) en comparación con los promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico (E) y los amastigotes derivados de infección *in vitro* de la línea celular U937 estimulada con ésteres de forbol (A).

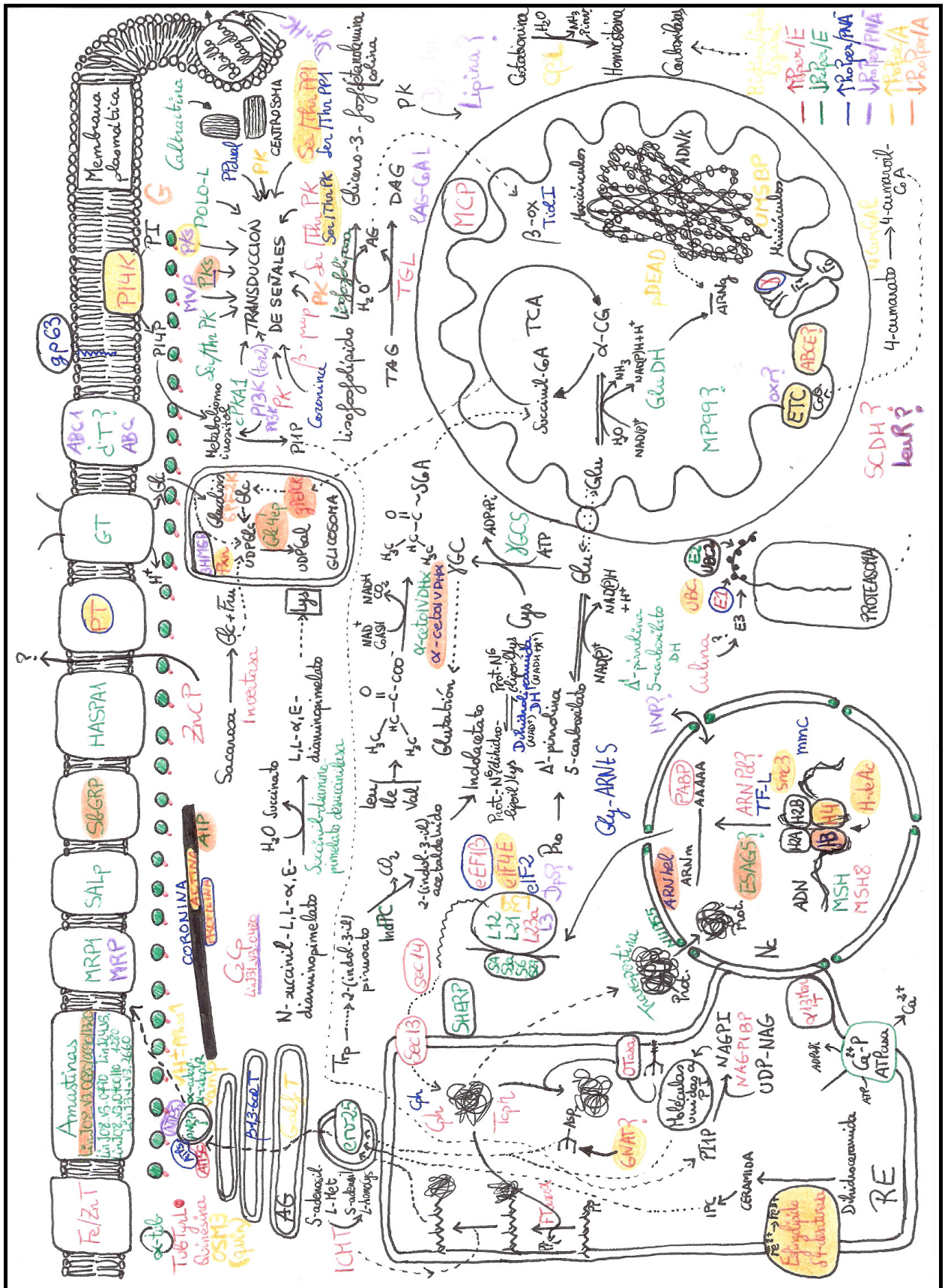


Figura 66. Esquema de la expresión génica diferencial de los promastigotes aislados de *P. perniciosus* comparada con la de promastigotes en fase estacionaria, la subpoblación PNA⁺ y los amastigotes.

4.7.1. Empaquetamiento del ADN, epigenética, replicación y reparación del ADN, expresión génica y modificación post-traducciona.

Los genes de la histona H4 LinJ31_V3.3320 y la H-deAC están sobre-expresados en Pro-Pper/E, mientras que la histona H3 está sobre-expresada en Pro-Pper/PNA⁻. El gen *mmc* está sobre-expresado en Pro-Pper/PNA⁻ y *smc3* en Pro-Pper/E, al igual que la proteína MSH8 de reparación de desapareamientos en el ADN; por el contrario, el gen MSH LinJ24_V3,1460 está sub-expresado en Pro-Pper/E. Los genes H4, H-deAC, *smc3* y MSH8 están sobre-expresados en Pro-Pper/A, por lo que alcanzan sus mayores niveles de expresión en promastigotes metacíclicos derivados del tubo digestivo del vector. Por otro lado, la histona H3 presenta sus mayores niveles de expresión en amastigotes, al estar sub-expresada en Pro-Pper/A.

Diversos genes relacionados con la transcripción, la traducción y la modificación post-traducciona de las proteínas también presentan distintos perfiles de expresión en los promastigotes derivados de su medio natural y los de cultivo axénico en fase estacionaria o la subpoblación PNA⁻ de la misma y los amastigotes intracelulares. Una ARN polimerasa dirigida a ADN y la PABP están sobre-expresadas en Pro-Pper/E, al igual que los factores traduccionales eIF4E, eEF1 β y la proteína ribosómica L23a de la subunidad 60S. En Pro-Pper/PNA⁻ se sobre-expresa un factor de transcripción (LinJ29_V3.0020), una ARN helicasa dependiente de ATP (ARNh) que está sub-expresada en Pro-Pper/A, eEF1 β , eIF2 y la glicil-ARNt sintetasa. En Pro-Pper/A también se sobre-expresan los genes que codifican una proteína mitocondrial con caja DEAD, una proteína de unión a la secuencia universal de los minicírculos (UMSBP), eIF4E y L39. Por otro lado, la 3'-uridilil transferasa terminal 2 del complejo MP57 de edición de ARN (RET2-MP57), la proteína del complejo del poro nuclear NUP155 y las proteínas ribosómicas SA, subunidad ácida LinJ27_V3.1300, L21, S3a, S6 y S29 están sub-expresadas en el nivel de transcrito en Pro-Pper/E y L3 y la diftina sintasa en Pro-Pper/PNA⁻. El producto de la diftina sintasa es la diftamina, un derivado de la histidina presente en el factor eEF2. Esta modificación de eEF2 es necesaria para su funcionalidad, ya que agentes como la toxina diftérica y la endotoxina A de *Pseudomonas* spp. causan su inactivación por transferencia a la diftamina de un residuo de ADP-ribosa (Moehring y Moehring, 1988).

Los factores *sec13* y *sec14* (citoplásmico) del complejo de translocación están sobre-expresadas en Pro-Pper/E. En cuanto al plegamiento de las proteínas en el RE, la ciclofilina LinJ23_V3.0060 y la proteína 1 del complejo T, subunidad η (Tcpl η) están sobre-expresadas en Pro-Pper/E, mientras que otra Cph diferente (LinJ23_V3.0140) está sobre-expresada en Pro-Pper/PNA⁻. Algunos genes codificantes para proteínas de modificación post-traducciona también están sub-expresados en Pro-Pper/E: oligosacaril transferasa (a residuos de ácido aspártico), FNTA, ICMT y GNAT, probablemente relacionada con la glicosilación de algunas proteínas. GNAT está sobre-expresada también en Pro-Pper/A y *vamp* presenta también este último patrón de regulación. Una adaptina α está sobre-expresada en Pro-Pper/E (sub-expresada por ΔT). La α -1,3-manosiltransferasa (α -1,3-ManT), proteína integral a la membrana del RE que participa en la síntesis de GDP- α -manosilquitobiosildifosfodolicol (GO), está sobre-expresada en Pro-Pper/E.

4.7.2. Transporte, fosforilación oxidativa y metabolismo de glúcidos, lípidos, aminoácidos y poliaminas y homeostasis redox.

Los genes ABCE, F1 γ , PT LinJ06_V3.1320 y los que codifican una proteína transportadora de Fe/Zn (Fe/ZnT), una proteína portadora mitocondrial y la subunidad c de la ATP sintetasa vacuolar están sobre-expresados en Pro-Pper/E. Los genes F1 γ y PT están también sobre-expresados en Pro-Pper/PNA⁻. Por el contrario los genes de los siguientes transportadores están sub-expresados: GT (*Imgt2*), SbGRP LinJ31_V3,3390/40 (también sub-expresado en Pro-Pper/A), copia 1 de MRP, Ca²⁺-ATPasa y aap LinJ31_V3,1850 en Pro-Pper/E; y los genes de la subunidad catalítica de la ATP sintetasa vacuolar (ATPSc), los transportadores ABC1 LinJ15_V3,0800. ABC LinJ11_V3.1240 y MRP LinJ23_V3.0290 y las proteínas mayoritarias de las partículas ribonucleoproteicas denominadas cúpulas celulares (*Major vault protein*, MVP) LinJ05_V3.0060 y LinJ21_V3.0260 están sub-expresados en Pro-Pper/PNA⁻. Las proteínas MVP tienen un papel importante en transporte nucleo-citoplásmico y en transducción de señales en mamíferos (Steiner y col., 2006).

Los genes que codifican para la UDP-glucosa 4'epimerasa, β -fructosidasa o sacarasa y la gPEPCK están sobre-expresados en Pro-Pper/E. En cuanto al catabolismo de lípidos, una TGL está sobre-expresada en Pro-Pper/E y *Tiol I* LinJ23_V3,0860 en Pro-Pper/PNA⁻. Por otro lado, está sub-expresado en Pro-Pper/E el gen de la lisofosfolipasa y en Pro-Pper/PNA⁻ el de la ligasa de ácidos grasos de cadena larga-CoA y el de la 3-HMG-CoA reductasa. Dos genes que codifican la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (α -cetoIVDH) están diferencialmente expresados en promastigotes derivados del vector con respecto a los de cultivo axénico. Uno de ellos está sub-expresado en Pro-Pper/E y el otro está sobre-expresado en Pro-Pper/PNA⁻; el último está sub-expresado en Pro-Pper/A. La α -cetoIVDH (EC 1.2.4.4.) participa en la degradación de la valina, la leucina y la isoleucina. Uno de los dos genes que codifican la dihidrolipoamida deshidrogenasa (LinJ29_V3.1950) está sobre-expresado también en Pro-Pper/PNA⁻. Esta proteína citoplásmica está relacionada con el transporte de electrones y la homeostasis redox celular (funciones moleculares GO) y está directamente relacionada también con la degradación de la valina, la leucina y la isoleucina.

En Pro-Pper/E también están sub-expresados diversos genes relacionados con el metabolismo de la prolina y el ácido glutámico: el gen de la δ 1-pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa, que interviene en la reacción de hidrólisis que tiene como resultado la síntesis de ácido glutámico (con la reducción de una molécula de NAD(P)⁺); la glutamato deshidrogenasa (GluDH) (EC 1.4.1.3.), que participa en la hidrólisis del glutamato a 2-oxoglutarato y además tiene capacidad de unión a ARN_g en *L. tarentolae* (Bringaud y col., 2006); y la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ GCS) (EC 6.3.2.2.), con actividad glutamato-cisteína ligasa, que cataliza la primera reacción de la síntesis del glutatión (que en tripanosomátidos forma parte del tripanotión) y es esencial en la respuesta a agentes oxidantes (Mukherjee y col., 2009). En el catabolismo del triptófano, el gen que codifica la piruvato/indol-piruvato carboxilasa está sub-expresado en Pro-Pper/E.

En Pro-Pper/A se ha detectado también la expresión diferencial de genes relacionados con el transporte, la cadena de transporte electrónico, el metabolismo de glúcidos, lípidos y aminoácidos y la homeostasis redox, algunos de los cuales se han mencionado. Concretamente, los siguientes genes están sobre-expresados en Pper-Pro/A: ABCE, vH⁺-PPasa, PT LinJ06_V3,1320, coxVI, coxVIII, 4-cumarato-CoA ligasa, 6-fosfofructo-2-quinasa, UDP-glucosa 4'epimerasa, gPEPCK, esfingolípido δ -4 desaturasa, peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa LinJ23_V3,0050 (TXNPx), cistationina β -liasa (CBL) (EC

4.4.1.8.) y biotina/lipoato proteína ligasa (EC 6.3.4.15). La TXNPx constituye el único sistema de detoxificación en el que interviene el tripanotión (Nogoceke y col., 1997; Lopez y col., 2000; Flohe y col., 2002). La CBL participa en el metabolismo de la cisteína y la metionina. La biotina/lipoato proteína ligasa interviene en la unión de la coenzima biotina a diversas carboxilasas (piruvato carboxilasa, acetil-CoA carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa y metilcrotonil-CoA carboxilasa) para formar la holoenzima con hidrólisis de ATP (unión de biotinil-5'-AMP) y está también sobre-expresada en PNA⁺ procíclicos respecto de PNA⁻ metacíclicos.

4.7.3. Proteolisis.

ZnM14 está sobre-expresada en Pro-Pper/E. Dos cisteína proteasas de tipo calpaína diferentes a las descritas en los apartados 4.3 y 4.4 están diferencialmente reguladas en Pro-Per/E: una sobre-expresada y otra sub-expresada. En cuanto a la degradación de proteínas por la vía ubiquitina-proteasoma, la enzima conjugante de ubiquitina LinJ33_V3.2910, la culina (que presenta capacidad de unión a la enzima E3) y la enzima activadora de ubiquitina E1 están sobre-expresadas en Pro-Pper/E; la primera está sobre-expresada también en Pro-Pper/A y la última en Pro-Pper/PNA⁻.

4.7.4. Señalización intracelular y organización del citoesqueleto.

Un conjunto de genes relacionados con la señalización intracelular presentan distinta regulación cuando los promastigotes se encuentran en el tubo digestivo del vector y cuando se encuentran en cultivo axénico o en amastigotes intracelulares: la Ser/Thr PP1 LinJ22_V3.1340 está sobre-expresada en Pro-Pper/E y en Pro-Pper/A, y la LinJ34_V3.0820/30/40 está sub-expresada tanto en Pro-Pper/E como en Pro-Pper/PNA⁻; la Ser/Thr PK LinJ30_V3.3640 está sobre-expresada en Pro-Pper/E, Pro-Pper/PNA⁻ y Pro-Pper/A. La Ser/Thr PK LinJ36_V3.1590 y la proteína de tipo PK LinJ35_V3.1850 están sub-expresadas en Pro-Pper/E, al contrario que la PK LinJ07_V3.0410. En Pro-Pper/PNA⁻ se ha detectado también expresión diferencial de otros genes diferentes relacionados con la señalización intracelular, concretamente la sobre-expresión del gen PK LinJ11_V3.0060 y la sub-expresión de los genes PI3K LinJ34_V3.4160 y LinJ02_V3.0100, tres PK (LinJ20_V3.0970, LinJ27_V3.1700 y LinJ31_V3.1870) y la lipina. De éstos últimos, el gen de las PKs LinJ11_V3.0060 y LinJ31_V3.1870 están sobre-expresados en Pro-Pper/A, al igual que la PK LinJ35_V3.2370 y al contrario que las PKs LinJ19_V3.0590 y LinJ35_V3.5330 y que una proteína G pequeña.

Tres genes relacionados con la composición y organización del citoesqueleto están sobre-expresados en Pper/E: uno de quinesina, uno de actina, y el de la profilina. El gen de la profilina, relacionado con la organización del citoesqueleto de actina (GO), está también sobre-expresado en Pro-Pper/PNA⁻. Se ha detectado este último perfil de expresión para la coronina, que al igual que la profilina tiene capacidad de unión a la actina. Los genes mencionados de la actina y la profilina están también sobre-expresados en Pro-Pper/A, por lo que alcanzan sus mayores niveles de expresión en promastigotes metacíclicos del tubo digestivo anterior del vector. En Pro-Pper/A se sobre-expresa un gen de quinesina de tipo OSM3, distinta a la sobre-expresada por Pro-Pper/E. Por otro lado, un gen que codifica una proteína de interacción con actina, un gen de tubulina α y un gen de caltractina están sub-expresados en Pro-Pper/E, y el primero también en Pro-Pper/A.

4.7.5. Moléculas de superficie y genes de función desconocida.

Diversos genes relacionados con la maduración de glicoconjugados están diferencialmente expresados entre promastigotes obtenidos de su medio natural y promastigotes en cultivo o amastigotes intracelulares. El gen de la proteína biosintética de N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol (NAGPIBP), una glucosil transferasa del grupo 1 que participa en la síntesis del anclaje GPI, está sobre-expresado en Pro-Pper/E. El gen de la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K) presenta también el anterior perfil de expresión y además está sobre-expresado en Pro-Pper/A. PI4K participa en la síntesis de fosfatidilinositol 1-fosfato, sustrato utilizado en la reacción de la NAGPIBP. Una transferasa GIPL_galf está también sobre-expresada en Pro-Pper/A y participa en la adición de residuos de galactosilfuranosa a los GIPLs y al LPG, según se observó en *L. major* (Zhang y col., 2004). Otra proteína de maduración de glicoconjugados, la β 1,3GalT LinJ14_V3,1500, está sobre-expresada en Pro-Pper/PNA⁻.

Algunos genes que codifican para proteínas de superficie o unidas a endomembranas también están sobre-expresados por Pro-Pper/E: las amastinas (LinJ08_V3.0700/10, LinJ24_V3.1280, LinJ34_V3.2660), HASPA1, ESAG5 y SHERP LinJ23_V3.1230. Las amastinas LinJ08_V3.0680/0690/1320 están sobre-expresadas en Pro-Pper/PNA⁻, pero alcanzan sus mayores niveles de expresión en amastigotes, puesto que están sub-expresadas en Pro-Pper/A; de estos genes de amastinas, los dos primeros son copias en tándem y la secuencia del tercero apenas se diferencia de las de los anteriores (Fig, 52C). SALp (LinJ05_V3,1210) está sobre-expresado en Pro-Pper/PNA⁻, al igual que un gen de tipo gp63 de los cuatro que han sido anotados en el proyecto genoma de *L. infantum*. El gen ESAG5 está sub-expresado en Pro-Pper/A, por lo que alcanza sus mayores niveles de expresión en amastigotes intracelulares.

Otros genes que también están sobre-expresados en Pro-Pper/E codifican para la *p*-nitrofenilfosfatasa y dos SCDH, además de proteínas hipotéticas y otros genes diferencialmente expresados contenidos en clones solapantes con más de un gen que no han sido resueltos por qRT-PCR.

5

Discusión

5.1. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN *L. infantum*.

En los estudios transcriptómicos de diferentes estadios y especies del género *Leishmania* que se han desarrollado hasta el momento, se han empleado *microarrays* genómicos parciales de ADN fragmentado al azar y de ADNc (Saxena y col., 2003; Akopyants y col., 2004; Almeida y col., 2004; Saxena y col., 2007; Srividya y col., 2007) y parciales o totales de oligonucleótidos (Holzer y col., 2006; Leifso y col., 2007; Rochette y col., 2008; Depledge y col., 2009; Rochette y col., 2009). Los *microarrays* de *L. infantum* que aquí se describen son los únicos que representan la secuencia del genoma completo de una especie de *Leishmania* hasta el momento, lo que confiere la ventaja de representar todos los genes que contiene el genoma del parásito y no sólo aquellos que están anotados en el genoma en experimentos de expresión génica global. La detección de clones que no representan genes anotados en la secuencia genómica en los análisis de expresión génica diferencial indica que no se ha completado la anotación de genes en el genoma de *L. infantum*. Por lo tanto, los *microarrays* de oligonucleótidos de alta representatividad de esta especie (Rochette y col., 2008) no representan todos los genes que realmente contiene el genoma, sino sólo aquellos que han sido anotados.

El análisis de la frecuencia de inserciones, deleciones y sustituciones entre los aislados de *L. infantum* alineados en *GBrowse* (sección 4.2.) indicó que la estrategia de ensamblaje y alineamiento de las secuencias de los extremos de los fragmentos de los clones seleccionados en los análisis de expresión génica diferencial no está afectada en este caso por tales polimorfismos, ya que su frecuencia disminuye considerablemente a medida que aumenta el número de nucleótidos en relación no proporcional (Figura 19). Estos datos concuerdan con la ausencia de retrotransposones y retroposones (elementos sin terminaciones largas repetidas, no-LTR) en *L. major* (Bhattacharya y col., 2002; Wickstead y col., 2003), excepto remanentes de retrotransposones DIRE, al menos en *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. Aunque en *L. braziliensis* aparecen retroelementos intactos, *L. major* y *L. infantum* carecen de la maquinaria completa de generación de diversidad de secuencia a diferencia de la mayor parte de los eucariotas, lo cual favorece su estabilidad cromosómica (Peacock y col., 2007; Smith y col., 2007).

En los conjuntos de genes diferencialmente expresados que se detectaron en los análisis de expresión génica con *microarrays* totales de *L. infantum* descritos en esta memoria, se observó redundancia en la representación de los genes, coincidiendo con observaciones previas en *L. major* mediante *microarrays* genómicos y de ADNc parciales (Saxena y col., 2003; Akopyants y col., 2004; Almeida y col., 2004; Saxena y col., 2007), dada la metodología de construcción de este tipo de *microarrays* a partir de genotecas.

Debido al elevado tamaño medio de los fragmentos incluidos en los *microarrays*, se observó que algunos mapean con más de una anotación génica al ser alineados con la secuencia del proyecto genoma de *L. infantum*. Para localizar los genes diferencialmente expresados en estos clones, se realizaron análisis por qRT-PCR, detectando en algunos casos el mismo patrón de expresión para genes adyacentes, es decir, co-regulación. Saxena y colaboradores (2007) mostraron previamente la existencia de co-regulación en algunos genes adyacentes entre sí en *L. donovani*. La técnica de qRT-PCR también fue utilizada para la validación externa de los datos de hibridación con *microarrays*, detectando una alta correlación entre ambas técnicas, al igual que fue descrito en otros análisis transcriptómicos en *L. major* y *L. infantum* con

Discusión

qRT-PCR (Holzer y col., 2006; Leifso y col., 2007; Rochette y col., 2009) y con Northern blot (Saxena y col., 2003).

Mediante *microarrays* de oligonucleótidos de *L. major* de alta representatividad, se mostraron datos de expresión diferencial en *L. major* y *L. mexicana* que indicaban que el genoma de estas especies de *Leishmania* está constitutivamente expresado, ya que se halló tan sólo un 3% de expresión génica diferencial (Holzer y col., 2006; Leifso y col., 2007). En el caso del análisis transcriptómico con *microarrays* parciales de ADNc en *L. major* (Almeida y col., 2004), se observó que el 47% de los genes representados en los *microarrays* estaban diferencialmente expresados, mucho mayor de lo que cabía esperar, al haberse estimado anteriormente unas tasas de expresión diferencial del 3-5% en el genoma de *L. major* (Saxena y col., 2003; Akopyants y col., 2004) y del 2% en *T. brucei* (Diehl y col., 2002). La explicación de esta diferencia tan considerable fue la representación preferencial de genes específicos de estadios en la genoteca parcial de ADNc que se construyó (Almeida y col., 2004; Cohen-Freue y col., 2007). El número de genes diferencialmente expresados hallados en los análisis de los que se compone este estudio también es reducido en relación al número total de genes anotados en el genoma (0,6-6%), por lo que estos datos indican que también en *L. infantum* la expresión es constitutiva.

5.2. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN LOS ESTADÍOS FUNDAMENTALES DEL CICLO BIOLÓGICO DE *L. infantum*.

5.2.1. Análisis de los perfiles de expresión génica en E/L, E/A y L/A.

En el ciclo biológico de *Leishmania* spp. se producen tres procesos fundamentales de diferenciación: la de los promastigotes en el tubo digestivo del vector, la de los promastigotes a amastigotes en los fagocitos del hospedador mamífero y la de los amastigotes a promastigotes procíclicos en el interior del tubo digestivo del vector que se ha alimentado de un hospedador mamífero infectado. Se ha aceptado que la diferenciación de los promastigotes en cultivo axénico mimetiza a la que sucede en el tubo digestivo del vector y se trabaja de forma generalizada con promastigotes en cultivo (Zuckerman y Lainson, 1977; Zilberstein, 2008). Las transformaciones del parásito en estos procesos están relacionadas con la expresión diferencial de algunos genes. Aunque se han descrito algunos análisis de hibridación de *microarrays* parciales genómicos y de ADNc para el estudio de la diferenciación de los promastigotes en cultivo de *L. major* (Akopyants y col., 2004; Almeida y col., 2004; Saxena y col., 2007) y *L. braziliensis* (Depledge y col., 2009), no se han realizado estudios del perfil de expresión génica de la diferenciación de los promastigotes en especies causantes de leishmaniasis visceral con aproximaciones transcriptómicas ni proteómicas, tanto parciales como globales y, en general, este proceso de diferenciación no ha sido el centro de atención para el estudio de las variaciones del transcriptoma en el género *Leishmania*, a pesar de disponer de la información proporcionada por la secuenciación del genoma completo. La diferenciación de los promastigotes a amastigotes ha sido más estudiada en *L. major*, *L. donovani* y *L. infantum* con ambos tipos de aproximaciones (Holzer y col., 2006; McNicoll y col., 2006; Leifso y col., 2007; Srividya y col., 2007; Rochette y col., 2008; Rosenzweig y col., 2008b; Rochette y col., 2009). En la sección 4.3. se ha descrito por primera vez la comparación transcriptómica de las poblaciones de promastigotes en fase logarítmica y estacionaria de *L. infantum* entre sí y con amastigotes intracelulares, por lo que se han considerado los tres procesos de diferenciación básicos del ciclo biológico del parásito. Además, se ha profundizado en el proceso de diferenciación del promastigote mediante el análisis

transcriptómico comparativo de las subpoblaciones más homogéneas de promastigotes procíclicos (PNA⁺) y metacíclicos (PNA⁻) de la fase estacionaria (sección 4.4.) y en la diferenciación del promastigote al amastigote mediante el estudio de la influencia del aumento de la temperatura y la acidificación en el transcriptoma (sección 4.5.). Considerando en conjunto los análisis descritos previamente y los detallados en esta memoria, se han comparado los datos de expresión génica diferencial entre diferentes estadios y especies de *Leishmania*, habiendo hallado numerosos datos coincidentes, discrepantes y complementarios (Tablas A37 y A38, sección 5.7.)

El mayor número de genes diferencialmente expresados que se ha hallado corresponde a la transición del amastigote al promastigote en fase logarítmica (Figura 67). En los únicos estudios previos en los que se ha comparado, con *microarrays* parciales, el transcriptoma de los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica y estacionaria con los amastigotes (Akopyants y col., 2004; Almeida y col., 2004), se ha observado también un mayor número de genes diferencialmente expresados entre los promastigotes (tanto en fase logarítmica como estacionaria) y los amastigotes que entre los promastigotes en fase logarítmica y estacionaria.

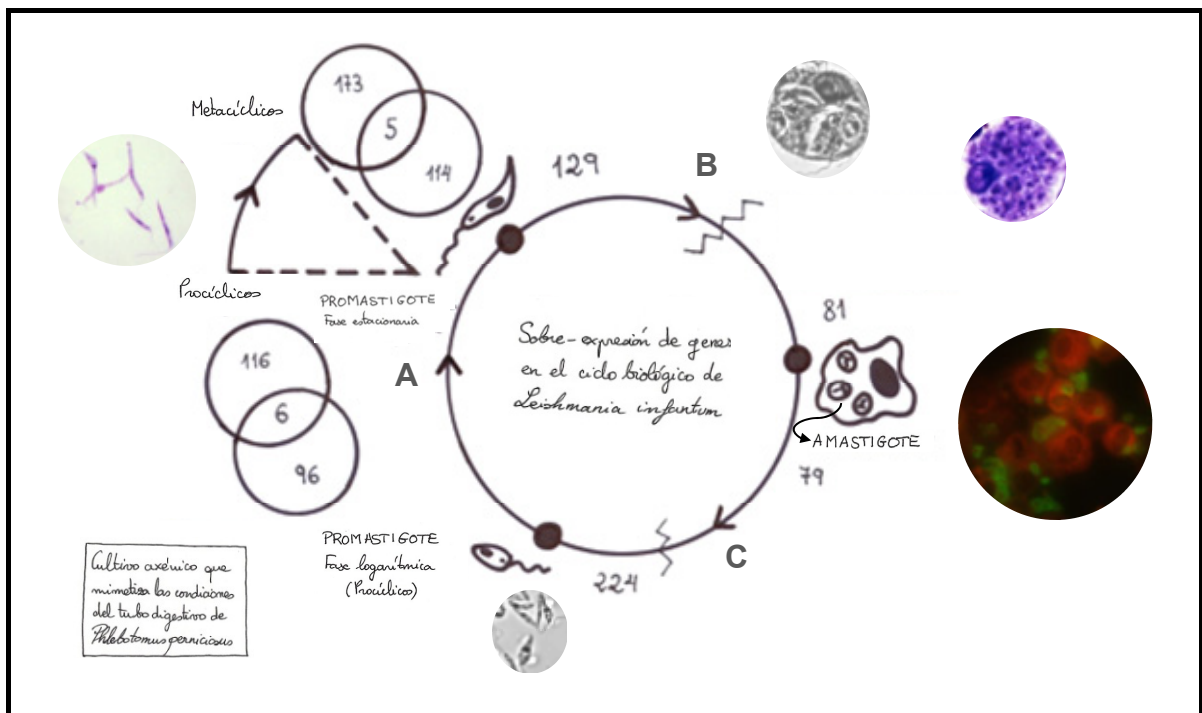


Figura 67. Expresión génica diferencial en los estadios fundamentales del ciclo biológico de *L. infantum*. Se representan los números absolutos de genes sobre-expresados con la progresión del ciclo biológico, que está representada en sentido horario. Los diagramas de Venn ponen de manifiesto las diferencias de los perfiles de expresión génica entre los promastigotes en fase estacionaria y la subpoblación de promastigotes metacíclicos (PNA⁻) y entre la sobre-expresión en fase logarítmica y la subpoblación procíclica (PNA⁺), debido al limitado número de genes de las intersecciones entre los conjuntos correspondientes de genes sobre-expresados y sub-expresados.

Los perfiles de expresión génica global de las subpoblaciones de promastigotes procíclicos PNA⁺ y metacíclicos PNA⁻ de la fase estacionaria (sección 4.4.) son diferentes a los de las poblaciones heterogéneas de promastigotes en fase estacionaria y logarítmica, lo que se puede observar en los diagramas de Venn representados en la Figura 67. Además, los genes del *cluster* HASP/SHERP, que

Discusión

codifican respectivamente proteínas hidrofílicas de superficie de función desconocida y proteínas hidrofílicas pequeñas asociadas al RE, presentan perfiles de expresión específicos de diferentes estadios. La posición de los genes en este *cluster* es HASPA1/SHERP/HASPB/SHERP/HASPA2 (Figura 27). El gen HASPA1 está sobre-expresado en E/L, E/A y L/A, lo que significa que los mayores niveles de expresión se alcanzan en promastigotes en fase estacionaria; el gen HASPB está sobre-expresado en amastigotes (sub-expresado en E/A y con $\Delta T\Delta pH$) y el gen HASPA2 está sobre-expresado en E/L, al igual que los dos genes SHERP. Sin embargo, se han detectado diferencias en los niveles de expresión de estos genes entre las subpoblaciones procíclica y metacíclica de la fase estacionaria, a pesar de que en el análisis de expresión génica diferencial de los promastigotes de *L. major* se afirmó que son marcadores de los promastigotes metacíclicos en *L. major* (Beverley y col., 2002; Saxena y col., 2003), ya que en dicho análisis no se compararon poblaciones homogéneas de promastigotes procíclicos y metacíclicos, sino promastigotes en fase logarítmica temprana, media y tardía, según fue puesto de manifiesto posteriormente (Akopyants y col., 2004). Por lo tanto, los genes del *cluster* HASP/SHERP son marcadores de la fase estacionaria de cultivo axénico, población heterogénea asincrónica en el estado de diferenciación, y no de promastigotes metacíclicos, subpoblación más homogénea en un estado de diferenciación más avanzado y con mayor capacidad infectiva que la media poblacional, lo cual ha sido comprobado mediante ensayos de infección *in vitro* (sección 4.4.3.).

Los diferentes patrones de regulación del conjunto de genes de histonas y del de la histona deacetilasa sugieren diferentes mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica entre los promastigotes y los amastigotes y la regulación de la expresión de algunos de ellos, dependiente en gran medida de la proliferación celular, según el estadio de diferenciación (Soto y col., 1996), como la sub-expresión de los genes de la histona H3 (en este estudio el gen LinJ10_V3.1070 en E/L). La sub-expresión del gen de la histona H4 en E/L fue también observada previamente, siendo el mecanismo de regulación de su expresión independiente de la replicación del ADN (Soto y col., 1997); la sobre-expresión de este gen en L/A constituye un dato complementario, por lo que en conjunto, la histona H4 alcanza sus mayores niveles de expresión en los promastigotes en fase logarítmica. La sub-expresión en E/L de los genes *smc3*, *cADNPol I α B* y *mPol ID*, junto con la sobre-expresión de *mPol ID* en L/A sugiere una mayor tasa de replicación del ADN en los promastigotes logarítmicos en relación con los estacionarios.

La sub-expresión de los genes 3'NT/Nasa en amastigotes (sección 4.3.2.1.) fue observada previamente en relación a los promastigotes en fase logarítmica (Sopwith y col., 2002) y, junto a la sub-expresión de PRPPS y la sobre-expresión de 3'NT/Nasa y *Ndkb* en E/A, la de éste último concretamente en la subpoblación de promastigotes procíclicos de la fase estacionaria (sección 4.4.2.5.), concuerdan con una mayor adquisición de nucleótidos de purina y de biosíntesis de nucleótidos trifosfato en promastigotes que en amastigotes. De hecho, según el estudio proteómico parcial, se sobre-expresa la proteína HGPRT, que constituye otro mecanismo para la síntesis de purina, en este caso mediante la síntesis *de novo*. La HGPRT no es esencial para el parásito por la existencia de otras vías de adquisición de purinas (Boitz y Ullman, 2006), por lo que en fase estacionaria aumentan los niveles de las mismas tanto por adquisición del medio como por síntesis *de novo*.

La considerable cantidad de cambios detectados en los niveles de expresión de genes relacionados con el proceso de la expresión génica y su regulación (fundamentalmente factores traduccionales y componentes de los ribosomas) según los datos descritos en este estudio para *L. infantum* y los descritos en *L. major* (Almeida y col., 2004; Holzer y col., 2006), en particular la sub-expresión de gran cantidad

de este tipo de genes en amastigotes y en general la predominancia de la sub-expresión en este estadio (sección 4.3.3.), sugieren que, en última instancia, es en este nivel donde se regula la respuesta a los estímulos externos y, además, que la cantidad de proteína total sintetizada en cada estadio es diferente. Así, la sobre-expresión de ARNsn-U5-sf en E/L sugiere cambios en el procesamiento del ARNsn constituyente de los ribosomas en la fase estacionaria de los promastigotes de *Leishmania*, ya que este factor participa en la maduración de dichas moléculas en el hombre (Jansen y col., 1991).

El nexo entre los estímulos externos y los mecanismos de regulación de la expresión génica son probablemente los genes relacionados con la señalización intracelular, es decir, los procesos de transducción de señales. Una serie de genes relacionados con la señalización intracelular y la regulación del ciclo celular han sido anotados en las secuencias genómicas de las tres especies de *Leishmania* cuyo genoma ha sido secuenciado completamente (*L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*). Además, se compararon los quinomas de *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* (Parsons y col., 2005) y se han revisado en ellos las proteína quinasa y su utilidad como dianas farmacológicas (Naula y col., 2005). Sin embargo, los mecanismos de ambos tipos de procesos no se han caracterizado en el género *Leishmania*, a pesar de que han sido muy estudiados en organismos eucariotas modelo, como en las respuestas a condiciones adversas del medio en *Saccharomyces cerevisiae* (Ruis y Schüller, 1995) y en procesos patológicos como el cáncer (revisado por Papin y col., 2005). Los resultados descritos en este estudio, como perfiles de regulación contrarios de distintos genes MAPK, no permiten afirmar con seguridad que la relación estímulo-señalización intracelular-mecanismos de regulación de la expresión génica sea la clave de los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar en los procesos de diferenciación del ciclo biológico del parásito, pero suponen una primera aproximación para indagar en su estudio en un futuro próximo.

En cuanto al procesamiento de las proteínas, se han detectado varios genes relacionados que están diferencialmente expresados. La sobre-expresión de una proteína Cph en E/L según el análisis proteómico y de otro gen Cph de mayor tamaño y dos FKBP en el nivel de transcrito en L/A y también en la subpoblación de promastigotes procíclicos de la fase estacionaria respecto de los metacíclicos (sección 4.3.2.2. y 4.4.2.5.) sugiere que en el parásito se sobre-expresan secuencialmente distintos genes de este tipo en el proceso de diferenciación de los promastigotes, lo que es coherente con un papel más relevante del repliegamiento de las proteínas propio de las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas (Chakraborty y col., 2004) en las etapas iniciales e intermedias de la diferenciación. Los genes DnaJ sobre-expresados en promastigotes metacíclicos PNA⁻ (Tabla 16) en el nivel de transcrito son diferentes a aquel cuya sobre-expresión se ha detectado en E/L con la aproximación proteómica. La subunidad γ de la proteína 1 del complejo T (Tcp1 γ) es una chaperona que está sub-expresada en E/L en el nivel de proteína. Por lo tanto, estos datos sugieren que se requieren diferentes chaperonas según el estadio.

La sub-expresión de FNTA en E/L sugiere que la farnesilación de las proteínas disminuye con la diferenciación, al igual que ocurre con la sobre-expresión en L/A y E/A de UDP-NAGDPT, que sugiere que la N-glicosilación de las proteínas es menos abundante en amastigotes que en promastigotes. Los perfiles de expresión de Sx, Clatrina-H, Apcx3 y *vamp* sugieren que los mayores niveles de tráfico vesicular se alcanzan en los promastigotes no diferenciados, lo que es coherente con la sobre-expresión en el mismo estadio de los genes relacionados con la maduración de las proteínas y el LPG (sección 4.3.2.).

Según los datos de sobre-expresión de GT en E/L, E/A y L/A, se espera una mayor tasa de adquisición de glucosa en promastigotes que en amastigotes. La combinación del aumento de la temperatura y la disminución del pH son suficientes para que se produzca la sub-expresión del gen GT (sección 4.5.6.4.), cuyo perfil de expresión coincide con el de los genes ALD y PGM^{BPI} en E/A. No

Discusión

obstante, otra PGM independiente de regulación por catabolito está sub-expresada en L/A (sobre-expresada en amastigotes). Este patrón complementario de regulación sugiere que son isoformas que se requieren para diferentes estadios, lo cual también sucede con diferentes genes TGL (sección 4.3.2.6.).

El conjunto de los datos de expresión diferencial obtenidos para los genes relacionados con la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (coxV, coxVI, coxVIII, F₀s9, ANC1, ANC2, MPETS) indica un posible descenso de la actividad de transporte electrónico respiratorio en amastigotes con respecto a los promastigotes en fase logarítmica, si bien la ferredoxina (Fd), cuyos niveles de expresión descienden en promastigotes PNA⁻/PNA⁺, está sobre-expresada en amastigotes con respecto de los promastigotes estacionarios, lo cual supone aparentemente una contradicción en la que se podría indagar en posteriores estudios.

Los parásitos del género *Leishmania* son auxotrofos para las porfirinas, ya que carecen de la maquinaria enzimática completa para sintetizar *de novo* el grupo hemo. En concreto, carecen de las enzimas δ -aminolevulinato sintasa, porfobilinógeno sintasa, porfobilinógeno deaminasa y uroporfirinógeno decarboxilasa. Se ha descrito que los amastigotes son capaces de adquirir el grupo hemo directamente de la célula hospedadora por endocitosis, tanto libre como formando complejos con proteínas (Chang y col., 1985; McConville y col., 2007). Como estos parásitos disponen de las tres últimas enzimas de la ruta, que son la C(III)O, la PO y la ferroquelatasa, también pueden adquirir el precursor protoporfirinógeno IX. La sobre-expresión de los genes C(III)O y PO en E/A, L/A y con $\Delta T\Delta pH$ y su sub-expresión en E/L indican que los mayores niveles de expresión de estos genes se alcanzan en promastigotes en fase logarítmica. Estos datos sugieren que los promastigotes sintetizan porfirinas a partir del precursor protoporfirinógeno IX en el tubo digestivo del insecto vector, destacando la importancia del grupo hemo para la supervivencia. El grupo hemo es utilizado como grupo prostético de los citocromos, pudiendo ser posiblemente mayor en promastigotes la actividad de transporte electrónico a juzgar por el patrón de regulación de coxV, coxVI y coxVIII y de la esfingolípido δ -4 desaturasa (secciones 4.3.2.3. y 4.3.2.6.). Como los genes C(III)O y PO se localizan en tándem en el cromosoma 6, a diferencia del gen de la ferroquelatasa, estos datos concuerdan con cierto nivel de co-regulación en estos parásitos (Saxena y col., 2007) y la organización genómica no aleatoria de algunos genes en DGCs, estando en tales casos relacionada con su regulación post-traducciona (revisado por Clayton y Shapira, 2007).

El conjunto de datos de los patrones de regulación de CGL, SpS, SAMDC, agm y Ndkb no sugieren regulación preferencial de ninguna ruta metabólica de aminoácidos y de biosíntesis de poliaminas en alguno de los estadios en *L. infantum* (Figura 27). La generación de *knockout* de estos genes podría contribuir a mejorar la comprensión de estos datos en el nivel de transcrito, especialmente considerando en conjunto genes con el mismo patrón de regulación.

El máximo nivel de expresión de los genes de la PGFS se alcanza en promastigotes indiferenciados, ya que está sub-expresado en E/L, en amastigotes intracelulares (E/A y L/A) y en formas *amastigote-like* (AL) generadas por $\Delta T\Delta pH$ (secciones 4.3.2.6. y 4.4.2.4.), lo que concuerda con la hipótesis del papel de la prostaglandina 2 α en *Leishmania* como factor de competencia de los promastigotes para su desarrollo en el tubo digestivo del insecto vector (Kabutu y col., 2002). La esfingolípido δ -4 desaturasa también alcanza sus mayores niveles de expresión en promastigotes indiferenciados, en fase logarítmica, ya que presenta el mismo perfil de expresión que el gen PGFS; al ser el producto de la reacción de la esfingolípido δ -4 desaturasa utilizado en la síntesis de IPC, este dato está en consonancia con la relación de la IPC con la división celular de los promastigotes, ya que la

aureobasidina A, un inhibidor específico de la IPC sintasa, es capaz de detener el crecimiento (revisado por Suzuki y col., 2008).

La tripanotión reductasa (TR) está sub-expresada en L/A, lo que concuerda con los datos de expresión en amastigotes axénicos (que son AL) de *L. amazonensis* (Castro-Pinto y col., 2008) y en AL generados con $\Delta T\Delta pH$. La TR es un miembro de la familia de las flavoproteína oxidorreductasas dependientes de NADPH cuya estructura y mecanismo de reacción están relacionados con la glutatión reductasa (Dumas y col., 1997), cataliza la reducción de especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y se encarga de mantener al tripanotión en su estado reducido, esencial para los sistemas de defensa *redox* en tripanosomátidos, por lo que podría ser una buena diana terapéutica (Steenkamp, 2002). Por lo tanto, la sobre-expresión de la TR en amastigotes es posiblemente un mecanismo de adaptación al ambiente hostil del fagolisosoma en el hospedador mamífero.

No parece haber relación funcional entre la expresión diferencial de los genes TGL por un lado y de PGFS y esfingolípido δ -4 desaturasa por otro en el estadio amastigote con respecto al promastigote en cuanto al destino de los AG generados en las reacciones de las TGL, pero sí podría haberla en E/L, ya que presentan el mismo patrón de regulación; en este caso, el destino preferencial de los AG mencionados podría ser anabólico, concretamente para la síntesis de prostaglandinas y esfingolípidos.

Los datos de expresión de los genes relacionados con el sistema ubiquitina-proteasoma (sección 4.3.2.7.) sugieren que el marcaje con ubiquitina para la degradación aumenta en la diferenciación de los amastigotes a promastigotes, excepto en el caso del gen *ubq* LinJ31_V3.1930, que se sobre-expresa en E/L. Los genes que codifican la UBC2 y la subunidad α 2 del proteasoma están sobre-expresados en el nivel de transcrito en L/A, lo que concuerda con los datos descritos previamente mediante técnicas de proteómica (Rosenzweig y col., 2008b). Las moléculas de ubiquitina actúan como marcadores para la degradación rápida de proteínas y también pueden actuar como chaperonas para el plegamiento correcto de las proteínas (Rawlings y Barrett, 1994). Estas dos funciones diferentes asociadas a las moléculas de ubiquitina podrían explicar los patrones de regulación de los diversos tipos de genes *ubq*. Estudios sucesivos de la regulación de la degradación por la vía ubiquitina-proteasoma serían útiles para el estudio de la relación entre la diferenciación y la degradación de proteínas a lo largo del ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Algunos genes relacionados con el citoesqueleto y las estructuras flagelar y paraflagelar están sub-expresados en amastigotes (sección 4.3.2.9.), de acuerdo con lo esperado, ya que es en el promastigote donde el flagelo emerge del blefaroplasto. Así, el gen de la α -tubulina está sub-expresado en E/L en el nivel de proteína según el análisis con técnicas de proteómica (sección 4.3.4.), lo que coincide con la sub-expresión en el nivel de transcrito en promastigotes metacíclicos PNA⁻ en relación a los procíclicos PNA⁺ de la fase estacionaria, datos que, en conjunto con la sobre-expresión en L/A, indican que los mayores niveles de este gen se alcanzan en los promastigotes menos diferenciados.

No sólo se han hallado genes de la superfamilia de las amastinas sobre-expresados en amastigotes (sub-expresados en E/A), sino también en promastigotes E/L (sección 4.3.2.10.), a pesar de que la mayor parte de los 45 genes de esta superfamilia proteínas de superficie de función desconocida se sobre-expresan siempre en amastigotes (Rochette y col., 2005). Así pues, los distintos genes de amastinas presentan distintos patrones de regulación y no están restringidos al amastigote.

Finalmente, se ha detectado una alta tasa de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresadas en el amastigote en este y otros estudios (Holzer y col., 2006; Rochette y col., 2009). En efecto, aproximadamente el 50% de los genes anotados en los genomas de especies de *Leishmania*

Discusión

secuenciados o en proceso de secuenciación no están relacionados con funciones conocidas, lo que sería importante mejorar para avanzar en el conocimiento de la biología del parásito.

5.3.2. Frecuencias de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes.

En el contexto de la hipótesis de la expresión génica constitutiva del genoma en *Leishmania* spp. que parece confirmar la mayor parte de los estudios (Holzer y col., 2006; Leifso y col., 2007; Saxena y col., 2007; Rosenzweig y col., 2008b), incluyendo el que aquí se describe, el perfil de expresión diferencial hallado para un conjunto de genes relacionados con la traducción ya mencionado (sección 4.3.2.2.) sugiere que ésta es menos activa en los amastigotes intracelulares que en los promastigotes, alcanzándose los mayores niveles de expresión génica en promastigotes en fase logarítmica. Además, esta actividad traduccional reducida es consistente con la observación inicial de un menor número de genes sobre-expresados que sub-expresados en los amastigotes intracelulares referidos a promastigotes en fase logarítmica y estacionaria (dL/A y uL/A respectivamente). Teniendo en cuenta que los *microarrays* genómicos empleados en el análisis transcriptómico son completos, estos datos sugieren que la sub-expresión predomina sobre la sobre-expresión en la diferenciación a amastigote. El número concreto de genes diferencialmente expresados es 224 sobre-expresados vs. 79 sub-expresados en L/A y 129 sobre-expresados vs. 81 sub-expresados en E/A (Tablas 6, 11 y 12, Figura 67). Además, realizando una revisión de publicaciones previas (Tabla 39), se pueden observar bajas tasas de sobre-expresión referidas al número total de genes diferencialmente expresados, excepto en algunos análisis llevados a cabo mediante aproximaciones parciales, es decir, con baja representatividad del genoma o del proteoma. En la Tabla 39 se muestran los resultados del contraste de la hipótesis nula de ausencia de diferencias significativas entre la sobre-expresión y la sub-expresión en amastigotes mediante el test de la distribución binomial (sección 3.13.1.), de manera individual por estudio publicado, incluyendo los datos de los perfiles E/A, L/A y $\Delta T\Delta pH$ (secciones 4.3 y 4.5), por especies, por estadios y de modo global. Para unificar criterios, el test fue realizado considerando $F > 1.7$ ó < -1.7 , según lo descrito en la sección 3.10.3.

Mediante los contrastes de hipótesis con el test de la distribución binomial de cada conjunto de datos por separado, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la sobre-expresión y la sub-expresión, con predominancia de la sub-expresión en amastigotes intracelulares en seis de los análisis, entre los que están incluidos todos los que se llevaron a cabo mediante aproximaciones transcriptómicas o proteómicas. Por otro lado, se ha detectado en dos casos lo contrario con aproximaciones parciales y, en el resto de los casos, que incluye las formas AL, no hay diferencias significativas (Tabla 39). Por lo tanto la sub-expresión predomina en amastigotes intracelulares y no en AL sobre la sobre-expresión.

Se realizó también un análisis intraespecífico con el test de la distribución binomial incluyendo los estudios transcriptómicos y proteómicos correspondientes a una especie dada, debido a que estos análisis se asemejan a muestreos aleatorios independientes, al haber sido extraídos los datos de poblaciones desconocidas de secuencias genómicas y conjuntos de proteínas en términos de tasa de expresión. A pesar de las excepciones descritas, las diferencias intra-específicas en la tasa de expresión son significativas para *L. mexicana*, *L. donovani* y *L. infantum*, tanto incluyendo como excluyendo los datos de los análisis de AL cuando se contrasta la hipótesis nula; en cambio, las diferencias no son significativas en *L. major*.

Tabla 39. Análisis intraespecífico e interespecífico de la expresión génica diferencial en amastigotes. Revisión de las frecuencias absolutas y relativas de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes en diferentes especies de *Leishmania* cuyos perfiles de expresión se estudiaron mediante técnicas genómicas y proteómicas. Los contrastes de hipótesis mediante el test de la binomial de la variable aleatoria “expresión diferencial en el amastigote” se realizaron para cada uno de los análisis de expresión génica, para todos los análisis realizados para cada especie y para cada estado de diferenciación de los promastigotes de referencia y globalmente. (1) Genómica funcional con *microarrays* genómicos parciales obtenidos por fragmentación al azar. (2) Genómica funcional con *microarrays* parciales de ADNc. (3) Genómica funcional con *microarrays* de oligonucleótidos que representan todos los genes anotados. (4) Proteómica. (5) Genómica funcional con *microarrays* completos obtenidos por fragmentación al azar. (6) Genómica funcional con *microarrays* parciales de oligonucleótidos. (a) Calculado con la ecuación de Clarke y Carbon (1976) con una probabilidad de no encontrar una secuencia determinada de 0,05. (b) Secuencias de oligonucleótidos o ESTs de genes excluyendo regiones intergénicas. No está representado el 100% de los genes en los *microarrays* de oligonucleótidos, puesto que con la aproximación de *microarrays* completos por fragmentación al azar se han detectado clones que contienen genes diferencialmente expresados no anotados en el genoma. (c) Datos expuestos en las secciones 4.3. y 4.5. (Tablas 10-12, 21-25, A4-A8, A14-A21). (d) Amastigotes axénicos (AL-, *amastigote-like*). (e) Amastigotes (AL) obtenidos por el aumento de temperatura y acidificación simultánea. (f) Predominancia de la sobre-expresión en amastigotes no significativa estadísticamente. (g) Diferencias significativas entre ambos grupos con predominancia de sobre-expresión en amastigotes. (h) Test binomial sin aproximación a la distribución normal, ya que $np \geq 10$ y/o $nq \geq 10$. *Tres tests de la binomial realizados: dos independientes para L/A y E/A respectivamente y uno global para L/A + E/A.

Especie	Estrategia	Representatividad	Referencias	Expresión génica diferencial global	Genes <i>de</i> L/A	Genes <i>de</i> E/A	Genes <i>de</i> L/A + E/A	Genes sub-expresados en amastigotes uL/A	Genes sub-expresados en amastigotes uL/A + uE/A	Test binomial p
<i>L. major</i>	(1)	16,1% (b)	(Akopyants y col., 2004)	15% of 10%	29 (23,8%)	7 (5,7%)	34 (27,9%)	19 (15,6%)	7 (5,7%)	0,051 (f)
	(2)	22,4% (b)	(Almeida y col., 2004)	22,2% of 7,2%	-	-	58 (44%)	23 (17,4%)	38 (28,8%)	0,081
	(3)	100% (b)	(Leifso y col., 2007)	1,9%	87 (56,1%)	-	-	68 (43,9%)	-	0,063 (f)
<i>L. mexicana</i>	(3)	100% (b)	(Holzer y col., 2006)	2,9%	28 (11,9%)	-	-	208 (88,1%)	-	<0,001
	(4)	6,5% (a)	(Srividya y col., 2007)	0,6%	14 (27,4%) (d)	-	-	37 (72,6%) (d)	-	<0,001
<i>L. donovani</i>	(1)	6,5% (a)	(Srividya y col., 2007)	6,5% of 4,6%	-	15 (60%)	-	10 (40%)	-	0,212 (h)
	(4)	-	(Rosenzweig y col., 2008b)	53,6% of 11,2%	-	173 (35%)	-	321 (65%)	-	<0,001
<i>L. infantum</i>	(4)	-	(McNicoll y col., 2006)	100% of 0,9%	-	53 (72,6%)	-	20 (27,4%)	-	<0,001 (g)
	(4)	-	(Leifso y col., 2007)	68,9% of 1,1%	8 (12,7%)	-	-	55 (87,3%)	-	<0,001 (h)
	(3)	100% (b)	(Rochette y col., 2009)	5,8%	-	217 (45,5%)	-	260 (54,5%)	-	0,024
	(5)	100% (a)	(c)	11,2%	-	443 (48,1%) (d)	-	478 (51,8%) (d)	-	0,125
	(5)	100% (a)	(c)	2,2%	-	80 (44,4%) (e)	-	100 (66,6%) (e)	-	0,069
<i>L. braziliensis</i>	(6)	8,3% (b)	(Depledge y col., 2009)	5,7%	66 (14,4%)	68 (14,6%)	13 (2,8%)	189 (40,5%)	35 (7,5%)	<0,001*
	(6)	8,3% (b)	(Depledge y col., 2009)	8,1% of 8,3%	10 (12,8%)	35 (63,6%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)	3 (5,4%)	<0,001 (g, h)
Test de la binomial interespecífico global para la regulación diferencial de la expresión génica en L/A (p)										
Test de la binomial interespecífico global para la regulación diferencial de la expresión génica en E/A (p)										
Test de la binomial interespecífico global para la regulación diferencial de la expresión génica en L/A + E/A (p)										

Discusión

El análisis global interespecífico ha revelado también diferencias muy significativas en las tasas de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes intracelulares, con una clara predominancia de la segunda. Dicho análisis fue llevado a cabo en conjunto y también separando los datos de E/A y L/A para excluir una posible influencia de la diferenciación del promastigote en el resultado final, pero la hipótesis nula fue de nuevo rechazada con un valor $p < 0,05$, confirmando que la predominancia de la sub-expresión en amastigotes intracelulares es estadísticamente significativa. Estos análisis estadísticos de la tasa de regulación diferencial y la sub-expresión en amastigotes de un considerable número de genes relacionados con la regulación de la expresión génica indican que la tasa de sub-expresión es mayor que la de sobre-expresión en amastigotes intracelulares, tanto en el nivel post-transcripcional como en el post-traducciona, lo que constituye una evidencia adicional para la hipótesis de la preadaptación del amastigote para la supervivencia en el medio intracelular, además de la limitada modulación dinámica de la expresión génica en el nivel post-transcripcional (Cohen-Freue y col., 2007) en diferentes especies de *Leishmania* del subgénero *L. (Leishmania)*, que cuenta con especies causantes de CL y VL en el Viejo y el Nuevo Mundo.

5.3. LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES PROCÍCLICA PNA⁺ Y METACÍCLICA PNA⁻ DE LOS PROMASTIGOTES DE *L. infantum* EN FASE ESTACIONARIA.

Los promastigotes metacíclicos PNA⁻ de *L. major* están relacionados con la infectividad y la virulencia, lo que fue comprobado mediante ensayos de infección en ratones (da Silva y Sacks, 1987; Hermoso y Jaffe, 1993). La ausencia de aglutinación con PNA ha sido descrita como marcador de la condición de promastigote metacíclico en esta especie (Schlein y Jacobson, 1994) y en *L. donovani* (Howard y col., 1987). Sin embargo, en *L. braziliensis* no es un criterio válido, pues tanto unos como otros promastigotes aglutinan en presencia de PNA; en esta especie se utiliza la lectina de lenteja para la separación de ambas subpoblaciones (Almeida y col., 1993). Por lo tanto, el empleo de la PNA y la centrifugación diferencial para separar las subpoblaciones de promastigotes procíclicos y metacíclicos es válida o no según la especie de *Leishmania* de la que se trate.

La aglutinación de *L. infantum* con PNA ha sido controvertida hasta el momento, puesto que se ha descrito, por un lado, que la concentración mínima a la cual se produce aglutinación en esta especie (Louassini y col., 1998) es la descrita para *L. major* (da Silva y Sacks, 1987) y, por otro, que no se produce aglutinación (Rodríguez-Gonzalez y col., 2006). En los ensayos de aglutinación descritos en la sección 4.4.1. se observó que la concentración mínima de aglutinación para *L. major* también es válida para *L. infantum*. Sin embargo, el procedimiento de aglutinación y separación aplicado para *L. major* (da Silva y Sacks, 1987) ha sido modificado como se describe en la sección 3.4.4. (Figura 11) para separar ambas subpoblaciones en la fase estacionaria de cultivo axénico de *L. infantum* (Figura 31).

Además de las observaciones morfológicas, para caracterizar las subpoblaciones PNA⁺ y PNA⁻ se realizó el análisis de la expresión génica diferencial. La anotación de términos de funciones moleculares y de procesos biológicos de GO en el conjunto de genes diferencialmente expresados pone de manifiesto el bajo nivel de diferenciación de la subpoblación mayoritaria, PNA⁺ y la de alto nivel de diferenciación de la subpoblación PNA⁻ en *L. infantum*. Los ensayos de infección *in vitro* de la línea celular U937 (sección 4.4.3.) han puesto de manifiesto la mayor infectividad de los promastigotes metacíclicos PNA⁻ frente a los procíclicos PNA⁺ (Figura 40).

En el conjunto de genes diferencialmente expresados entre promastigotes PNA⁺ y PNA⁻ de la fase estacionaria, tiene especial interés la sobre-expresión de genes relacionados con la glicosilación de moléculas de superficie: OGT, β 1,3GalT y GT1. Así, OGT participa en la adición de residuos α -GlcNAc a residuos ricos en treonina en algunas glicoproteínas, mientras que β 1,3GalT y GT1 participan en los procesos de biosíntesis del LPG, el PPG y las glicoproteínas (revisado por Handman, 1999; McConville y col., 2002). Precisamente el polipéptido del PPG (PPG-Lp) está sobre-expresado también en los promastigotes metacíclicos, lo cual está relacionado con la infectividad (revisado por Descoteaux y Turco, 1999). Por otra parte, se describió que la CPA es un factor de virulencia en *L. mexicana* (Mottram y col., 2004) y en este análisis de expresión génica diferencial en *L. infantum* se ha hallado su sobre-expresión en promastigotes metacíclicos PNA⁻. Algunos genes de amastinas se expresan también preferencialmente en los promastigotes metacíclicos con respecto a los procíclicos, por lo que, aunque es en el amastigote donde alcanza sus máximos niveles de expresión, no está restringida al mismo (Alcolea y col., 2009; Jackson, 2010).

En promastigotes metacíclicos PNA⁻, se ha detectado la sobre-expresión del gen de la TAT, que conduce a la desaminación de la tirosina a *p*-HPP. La mayoría de los eucariotas dispone de la vía de degradación completa de la tirosina, que tiene como producto final el succinil-CoA. Sin embargo, a la reacción de la TAT le sucede sólo otra, en la cual el *p*-HPP es oxidado a *p*-HPL mediante una hidroxilasa deshidrogenasa (HADH). En el caso de *T. cruzi*, se caracterizó una HADH estereoselectiva que reconoce isómeros L (AHADH) y su ausencia en el género *Leishmania* (Nowicki y Cazzulo, 2007). Sin embargo, el proyecto genoma de *L. infantum* ha puesto de manifiesto que esta especie contiene una HADH que reconoce isómeros D, pero no se ha encontrado un ortólogo a la AHADH de *T. cruzi*. Se ha descrito que la excreción del producto *p*-HPL a la sangre es un factor de virulencia de este hemoflagelado (Nowicki y Cazzulo, 2007). El mecanismo de infección de los parásitos del género *Leishmania* es diferente, por lo que no se conoce si el *p*-HPL juega algún papel en la virulencia. La sobre-expresión del gen de la TAT en promastigotes metacíclicos sugiere una posible relación del producto final *p*-HPL con la infectividad.

El aumento detectado en el nivel de transcritos de los genes de la DK y de la citrato liasa en promastigotes metacíclicos sugiere un aumento en la provisión de moléculas de acetyl-CoA desde la matriz mitocondrial al citosol a través de la lanzadera citrato-piruvato. Estas moléculas son precursoras de los AG, incluyendo los insaturados, de entre los que destaca el ácido araquidónico, que es el precursor de las prostaglandinas, entre otras moléculas. Se ha descrito que la prostaglandina F es una molécula biológicamente activa que podría jugar un importante papel en la competencia del parásito en el interior del tubo digestivo del hospedador vector (Kabutu y col., 2002). Como el gen de la PGFS está sobre-expresado en fase logarítmica de cultivo frente a los amastigotes (L/A) y en la subpoblación de promastigotes procíclicos PNA⁺ de la fase estacionaria, podría ser estudiado en un futuro próximo para determinar más concretamente su papel en la colonización del tubo digestivo del vector.

Es también interesante la sobre-expresión en promastigotes PNA⁻ del gen de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa θ mitocondrial, que pertenece a la familia A de las ADN polimerasas y participa en mecanismos de reparación, tanto del cruzamiento de las hebras (*interstrand cross-link*) (revisado por Hubscher y col., 2002) como de roturas de enlaces fosfodiéster en una de las hebras (*nick*) en el ADN de doble cadena (Seki y col., 2003). Esta enzima podría estar relacionada con la supervivencia del parásito en las condiciones de estrés que supone el establecimiento de la infección en el hospedador mamífero, si bien el significado de su sobre-expresión es desconocido hasta ahora.

Discusión

La sobre-expresión de PABP en promastigotes metacíclicos PNA⁻ sugiere que es un gen clave en la variación del transcriptoma de este estadio, ya que está relacionado con la regulación de la expresión génica, concretamente mediante la estabilización de los transcritos a cuya cola de poli-A se une (Dreyfus y Regnier, 2002; Clayton y Shapira, 2007). En cuanto a la regulación de la expresión de algunos transcritos mitocondriales, se ha detectado en promastigotes metacíclicos la sobre-expresión de genes representados en clones de la genoteca cuya secuencia no mapea con la del proyecto genoma del parásito, pero sí con secuencias completas de minicírculos, de modo que estos clones presumiblemente contienen un gen de ARN guía para la modificación de transcritos mitocondriales mediante inserción y/o deleción de uridinas, a pesar de que se sugirió previamente que la regulación de la modificación del ARN no radica en la abundancia de ARNg, sino en el nivel de la utilización de los transcritos diana, probablemente mediante la variación de su abundancia (Koslowsky y col., 1992). Los datos de este análisis de expresión sí concuerdan con la expresión de secuencias no codificantes que se expresan específicamente según el grado de diferenciación en *Leishmania* spp., a diferencia de otros eucariotas (Dumas y col., 2006). No obstante, la validación de estos resultados no puede ser realizada mediante qRT-PCR, debido a que las secuencias de los genes ARNg son cortas (aproximadamente 50 pb), y no se puede afirmar concluyentemente que estén diferencialmente expresados (Anexo VII).

Por último, cabe destacar que varios genes que codifican para proteína quinasa están diferencialmente expresados entre las subpoblaciones de promastigotes procíclicos y metacíclicos, al igual que en la población en fase estacionaria en relación a los promastigotes en fase logarítmica y a los amastigotes (sección 4.3.2.8.). Aunque se ha descrito que la actividad proteína quinasa es elevada en promastigotes en fase logarítmica y estacionaria (Mukhopadhyay y col., 1988) y que la actividad proteína quinasa A ha sido asociada a la metaciclogénesis en *L. amazonensis* (Genestra y col., 2004), no se han caracterizado vías precisas de señalización y la mayoría de las PK no están caracterizadas en el género *Leishmania*.

5.4. EL EFECTO EN EL TRANSCRIPTOMA DE LA TEMPERATURA Y LA ACIDIFICACIÓN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS PROMASTIGOTES A AMASTIGOTES EN *L. infantum*.

La equivalencia de los amastigotes en cultivo axénico y los intracelulares no ha sido aceptada unánimemente. Por un lado, se ha considerado que el establecimiento de cultivos axénicos de amastigotes se consigue simplemente combinando el aumento de la temperatura, la acidificación y la variación de la composición del medio de cultivo, debido a la sobre-expresión del gen A2 y la variación de algunas actividades enzimáticas (Saar y col., 1998; Debrabant y col., 2004); por otro, se ha considerado que existen algunas diferencias, como una porción de flagelo que emerge del cuerpo celular en parte de la población, lo que llevó a denominar *amastigote-like* (AL) a estas formas (Somanna y col., 2002; Pral y col., 2003). En este estudio se ha analizado la influencia del aumento de la temperatura y del descenso de pH independiente y simultáneamente en la variación del transcriptoma de *L. infantum* sin introducir la variable de la composición del medio de cultivo.

El crecimiento de los promastigotes sometidos a $\Delta T\Delta pH$ y ΔpH es menor que el de ΔT y CC, por lo que la acidificación del medio detiene el crecimiento del cultivo de forma mucho más notable que el aumento de temperatura (Figura 41), lo cual coincide con lo descrito por Zilberstein y colaboradores

(Zilberstein y col., 1991). La glicoproteína gp46 no se expresa con $\Delta T\Delta pH$, a diferencia de lo que ocurre con CC, ΔT y ΔpH (Figura 42), lo que indica que los promastigotes tratados con $\Delta T\Delta pH$ se diferencian a AL a los 4 días, ya que se describió que no se expresa en el amastigote (Kahl y McMahon-Pratt, 1987). En los análisis de expresión génica diferencial con *microarrays* no se ha detectado su sobre-expresión en ninguno de los grupos en el nivel de transcrito, lo que se puede explicar con la expresión constitutiva del transcrito y la sub-expresión en el nivel traduccional o post-traduccional en el amastigote (Kahl y McMahon-Pratt, 1987; Handman y col., 1995).

La concurrencia simultánea de la acidificación y del aumento de la temperatura es suficiente para la obtención de formas AL, de acuerdo no sólo con el análisis por IFI de gp46, sino también con la expresión diferencial de los siguientes genes que ha sido previamente asociada a los amastigotes (Zilberstein y col., 1991; Zilberstein y Shapira, 1994; Saar y col., 1998; Debrabant y col., 2004; Zilberstein, 2008): sobre-expresión del gen A2 y sub-expresión del *cluster* 3'NT/Nasa y de SbGRP. Estos perfiles de expresión se han detectado también en amastigotes intracelulares en este estudio (sección 4.3.). El *cluster* del gen A2 se identificó por primera vez en *L. donovani*, donde se localizaron abundantes transcritos en amastigotes difícilmente detectables en promastigotes (Charest y Matlashewski, 1994). Estas moléculas fueron propuestas como factores de virulencia, exacerbando la capacidad de supervivencia del amastigote en el interior del macrófago. Además, se ha sugerido que el balance entre las proteínas A2 y las adyacentes A2rel influye de manera importante en la supervivencia del amastigote (Zhang y Matlashewski, 1997). La sobre-expresión causada por $\Delta T\Delta pH$ es una de las evidencias a favor de que la concurrencia de ambos factores es suficiente para la diferenciación de los promastigotes a AL. Además, el análisis del perfil de expresión $\Delta T\Delta pH$ ha revelado que el gen 3'A2rel está también inducido, teniendo probablemente el balance sugerido entre la expresión de los genes de este *cluster* (Zhang y Matlashewski, 2001) estas características concretas.

Mediante aproximaciones transcriptómicas, se comprobó previamente que existe un considerable número de diferencias entre los amastigotes intracelulares y los AL en el contexto de la expresión constitutiva del genoma de *Leishmania* spp. (Holzer y col., 2006; Rochette y col., 2009), aunque hay que tener en cuenta que se introdujo una variable adicional, la composición del medio de cultivo. De hecho, se han detectado en este estudio numerosas coincidencias entre los perfiles de expresión de los amastigotes intracelulares y los AL generados con $\Delta T\Delta pH$ (Figura 71., Tablas 11, 12, 21, 22, A4-7, A14 y A15, sección 5.7), definiendo de modo más preciso la influencia de estos dos factores aplicados simultáneamente en la diferenciación del promastigote al amastigote.

En el estudio de la expresión génica diferencial global generada por el aumento de temperatura sin variación de la acidificación (ΔT) se han observado numerosas analogías con el perfil de expresión originado por $\Delta T\Delta pH$: sobre-expresión del gen 3'a2rel, diez de los once genes de amastinas sobre-expresados con $\Delta T\Delta pH$ (Figura 52), RRS1, INO1, aATP11, tres genes de proteínas hipotéticas conservadas y ocho clones que no mapean con ningún gen anotado; y la sub-expresión de 3'NT/Nasa, PT LinJ06_V3.1320, GT, PFR1D, SOD, PI3K, FKBP LinJ36_V3.0250, calmodulina, latosterol oxidasa, un gen de proteína hipotética de función desconocida, seis genes de proteínas hipotéticas conservadas y siete clones que no mapean con ningún gen anotado. Por lo tanto, se puede relacionar la expresión diferencial de estos genes en amastigotes de forma directa con el aumento de temperatura de forma aislada (ΔT).

Se ha descrito que la estimulación *in vitro* exclusivamente con el aumento de la temperatura da lugar a un proceso parecido a la diferenciación de los promastigotes a amastigotes en el interior de los fagocitos del hospedador mamífero, dando lugar a formas AL (Shapira y col., 1988). Sin embargo, los resultados

Discusión

obtenidos en este estudio indican que, a diferencia de las formas generadas por $\Delta T\Delta pH$, estas formas presentan generalmente un largo flagelo, a pesar de la morfología redondeada del cuerpo celular, no se observa sobre-expresión del gen A2 y gp46 se expresa en la superficie (Figura 42 L), lo cual indica que el grado de diferenciación a amastigotes de los promastigotes expuestos a ΔT es menor que en el caso de $\Delta T\Delta pH$. Por lo tanto, en este estudio no se ha denominado AL a las formas generadas por ΔT . En este estudio no se ha detectado la sobre-expresión del gen de la proteína de choque térmico hsp83 con ΔT , a pesar de que se ha descrito mediante ensayos de hibridación de Northern blot y *macroarrays* que aumenta con este factor (Aly y col., 1993; Quijada y col., 2005).

La acidificación aplicada de forma independiente al aumento de la temperatura da lugar a la detención del crecimiento en el cultivo según la curva de crecimiento de la Figura 41 y desde un punto de vista morfológico, el aspecto del cultivo es el de la fase estacionaria a las 48 h, lo que había sido descrito previamente con la afirmación de que ΔpH induce la metacicloogénesis como respuesta conservada entre las especies de *Leishmania* (Zilberstein y col., 1991; Handman y col., 1995; Zakai y col., 1998; Somanna y col., 2002); no obstante, se empleó el término promastigote metacíclico de modo impreciso al estar basadas tales observaciones únicamente en criterios morfológicos. Con una exposición más prolongada (día 4), aparecen células ovoides con flagelo emergente junto a las de morfología de tipo promastigote, que expresan la glicoproteína gp46 (Figura 2 M-P) y no sobre-expresan el gen A2. Estos datos sugieren que ΔpH acelera la diferenciación de la población a la fase estacionaria inicialmente y que un mayor tiempo de exposición no conduce a formas AL. Al realizar el análisis de expresión génica con *microarrays* se ha observado que el patrón de expresión génica global ΔpH es atípico si se compara con los de los diferentes estadios del ciclo biológico del parásito (sección 4.3.) y con las formas generadas por $\Delta T\Delta pH$ y ΔT . No obstante, existen ciertas similitudes con los AL obtenidos por $\Delta T\Delta pH$ según los datos de este análisis (sección 4.5.7.), la detección de la sub-expresión de un gen que codifica una proteína específica del amastigote (Zilberstein y col., 1991) y los datos de análisis en serie de la expresión génica (SAGE) coincidentes con los mostrados en este estudio de sobre-expresión en amastigotes intracelulares de la proteína ácida ribosomal 60S P2, proteína ribosomal 60S L31 (Li y col., 2008), proteína ribosómica S29 y proteína de unión a ARN rggm (Guerfali y col., 2008). Por lo tanto, la expresión diferencial de estos genes en amastigotes está directamente relacionada a ΔpH . Sin embargo, la mayor parte de los genes diferencialmente expresados por ΔpH no han sido localizados como tal en los perfiles de expresión $\Delta T\Delta pH$ y ΔT y otros tienen un perfil de expresión con ΔpH opuesto a $\Delta T\Delta pH$ y/o ΔT (Tablas 21-25). El conjunto de genes diferencialmente expresados con ΔpH tiene escasa similitud con los que corresponden a $\Delta T\Delta pH$, ΔT , amastigotes intracelulares (E/A y L/A, sección 4.3.) y promastigotes metacíclicos (PNA⁻/PNA⁺), a pesar de que la acidificación estimula la diferenciación del promastigote durante las primeras horas a la exposición a este cambio, como se ha mencionado anteriormente.

Con el agrupamiento HCL-ST de los datos de expresión génica en los grupos $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH en relación al grupo control (CC), se puede observar una similitud elevada entre los perfiles de expresión generados por $\Delta T\Delta pH$ y ΔT con respecto al generado por ΔpH , lo que indica, junto a los datos anteriores, que la influencia de la temperatura es mayor que la del pH en el proceso de diferenciación del promastigote al amastigote en *L. infantum*.

El gen de la histona H3 LinJ16_V3.0600 está sobre-expresado con $\Delta T\Delta pH$, lo cual ha sido también detectado en amastigotes intracelulares mediante SAGE (Li y col., 2008). Un gen hipotético de regulación de la transcripción (HTreg) presenta el mismo patrón de regulación con $\Delta T/\Delta pH$. Su función se describe

aquí por primera vez gracias al análisis basado en GO, ya que este gen figura anotado en la secuencia genómica con el nombre de proteína hipotética conservada. El factor de transcripción SUI1 (TFSUI1) está sobre-expresado en las tres condiciones experimentales estudiadas ($\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH) mientras que eIF5a y eEF1 α están sub-expresados en $\Delta T\Delta pH$, lo que sugiere que se producen cambios en la regulación de la expresión génica en el nivel traduccional debidos a estos factores de manera aislada y combinada. La sub-expresión de eEF1 α también ha sido detectada en amastigotes intracelulares de *L. major* (Leifso y col., 2007). En resumen, la presión selectiva de estos factores combinados, cambia posiblemente la regulación de la transcripción y de la traducción, influyendo en la diferenciación a AL.

La sub-expresión de GT y PGM^{BPI} con $\Delta T\Delta pH$ concuerda con su sub-expresión en amastigotes intracelulares maduros de *L. infantum* (sobre-expresión en E/A) en el nivel de transcrito y de *L. donovani* en el nivel de proteína (Rosenzweig y col., 2008b). La sub-expresión de ALD con $\Delta T\Delta pH$ concuerda con su sub-expresión en el nivel post-transcripcional en amastigotes intracelulares de *L. mexicana* (Holzer y col., 2006), pero no con la sobre-expresión de la proteína que se detectó en amastigotes intracelulares de *L. donovani* (Rosenzweig y col., 2008b). Probablemente, éste es uno de los casos en que los niveles de transcrito no se corresponden con los proteicos, o bien puede ser una de las diferencias entre los amastigotes axénicos, que son AL, y los intracelulares. La sub-expresión de los genes ALD y PGM^{BPI} sugiere que los requerimientos energéticos del promastigote son mayores, o bien que se obtiene energía preferentemente mediante el catabolismo de glúcidos. El transportador GT LinJ36_V3.6550 (*lmg2*) está sub-expresado en amastigotes intracelulares de *L. mexicana* (Holzer y col., 2006), *L. major* (Leifso y col., 2007) y *L. infantum* (sección 4.3.2.3.). El gen gMDH está también sub-expresado con $\Delta T\Delta pH$ y en amastigotes intracelulares (sobre-expresión en E/A), lo que concuerda con lo anterior, ya que participa en la provisión de NAD⁺ (estado oxidado) para la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

La sobre-expresión con $\Delta T\Delta pH$ de la TGL LinJ31_V3.2540 genera posiblemente un exceso de AG, pero la sub-expresión de mACDH y Tiol I sugiere que dichos AG no están destinados a la degradación. Las seis lipasas diferencialmente expresadas que se han hallado en este estudio presentan perfiles de expresión diferentes, lo que sugiere que se utilizan diferentes isoenzimas según el estadio. De los once genes de lipasa codificados en el genoma de *L. infantum*, sólo cuatro no presentan expresión diferencial (Tabla 72).

$\Delta T\Delta pH$ produce la expresión diferencial de diversos genes relacionados con la señalización intracelular: sub-expresión de los genes C2cp o calpaína μ LinJ20_V3.1220, cdkbp y SerP51, habiéndose detectado el mismo perfil de expresión en amastigotes intracelulares (4.3.2.8.) y la sobre-expresión de C2cp y la sub-expresión de SerP51 en promastigotes metacíclicos (sección 4.4.2.3.), así como la sub-expresión de C2cp en amastigotes intracelulares en *L. mexicana* (Holzer y col., 2006) y *L. donovani* (Rosenzweig y col., 2008b); sub-expresión de PI3K; y sobre-expresión de INO1 con $\Delta T\Delta pH$ y ΔT . El estudio de las vías de señalización intracelular en *Leishmania*, que son desconocidas, permitiría posiblemente caracterizar algunos de los mecanismos con los que el parásito responde a los estímulos externos, en este caso a $\Delta T\Delta pH$, y se adapta a sobrevivir en sus respectivos hospedadores del ciclo biológico. Las C2cp participan también en la remodelación del citoesqueleto, lo que sugiere que la sub-expresión de C2cp en amastigotes intracelulares y con $\Delta T\Delta pH$ y la sobre-expresión en promastigotes metacíclicos con respecto a los procíclicos está relacionada con los cambios morfológicos de los procesos de diferenciación. La sub-expresión de DynLC LinJ26_V3.1000 también ha sido descrita en AL (Rochette y col., 2009) y amastigotes intracelulares (sección 4.3.2.9.).

5.5. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS PROMASTIGOTES DE *L. infantum* EXPUESTOS A OTRAS MODIFICACIONES EN CULTIVO *IN VITRO*.

En todos los experimentos de hibridación con *microarrays* descritos en esta memoria, se han hallado clones que no están alineados con la secuencia de ninguno de los genes anotados en el genoma de *L. infantum*. Curiosamente, en los casos en los que el parásito tiene que hacer frente a condiciones externas adversas y en los estadios diferenciados, la tasa de sobre-expresión de genes no caracterizados y no anotados, es decir, de genes desconocidos, es mayor. Esto evidencia la necesidad de caracterizar nuevos genes desconocidos que presentan estos patrones de regulación para mejorar la comprensión de la biología del parásito.

Uno de los casos en los que se ha observado una alta tasa de genes de función no conocida y de clones que contienen genes diferencialmente expresados no anotados en el genoma es el de los promastigotes en el medio de cultivo modificado por la presencia de acetato de cadmio. Además, en este caso, el número de genes diferencialmente expresados es aún más reducido (98 genes) en comparación con el número de genes diferencialmente expresados en E/L, L/A y E/A (sección 4.3.1.), lo que puede ser explicado por la variación de un solo factor en el primer caso frente a los procesos multifactoriales de diferenciación que se han analizado en el nivel transcriptómico en el segundo caso.

El gen PT LinJ06_V3.1320, sub-expresado por la presencia de cadmio, está también sub-expresado por $\Delta T\Delta pH$ y ΔT . Estos datos sugieren que, bajo ciertas condiciones ambientales, los parásitos inactivan algunas rutas catabólicas y anabólicas de aminoácidos (fenilalanina, tirosina y triptófano). En efecto, mpM20 está sobre-expresada en presencia de acetato de cadmio, lo que sugiere la utilización de fuentes exógenas de aminoácidos. La sub-expresión de MAPK concuerda con la detención de la proliferación celular (Figura 53), siendo el estudio de la expresión génica un paso inicial para la elucidación de vías de transducción de señales para mejorar la comprensión de la sensibilidad y la respuesta del parásito a los estímulos ambientales.

Los genes 3'NT/Nasa y Ndkb, relacionados con el metabolismo de nucleótidos, están sobre-expresados en promastigotes en fase estacionaria con respecto a amastigotes (sección 4.3.2.1.) por el efecto de $\Delta T\Delta pH$ en el caso de la 3'NT/Nasa; por su parte, Ndkb está sub-expresado en la subpoblación de promastigotes metacíclicos de la fase estacionaria. Estos genes están sub-expresados por la presencia de cadmio, lo que sugiere que distintos cambios en el metabolismo de nucleótidos entre la adaptación a estas condiciones de estrés y el proceso normal de diferenciación. El gen de la calmodulina está también sub-expresado bajo la presión selectiva del cadmio en *L. infantum* y el ortólogo de este gen en *L. major* está expresado constitutivamente en los estadios del ciclo biológico de esta especie (Leifso y col., 2007).

La exposición a acetato de cadmio detiene el crecimiento de los promastigotes en cultivo (Figura 53) y produce cambios morfológicos importantes (Figura 54) y la sobre-expresión de los genes ZnT, TR (sub-expresado en L/A debido a $\Delta T\Delta pH$), gPEPCK, 6P1FK, mpM20 y HAD-like (Figura 58, Tabla 28). En conjunto, estos datos sugieren que el parásito activa respuestas a estrés que consisten básicamente en la detoxificación y el almacenamiento de nutrientes. Estas respuestas podrían estar controladas por la inhibición de la replicación del ADN y la regulación de la expresión génica post-transcripcional y traduccional. De hecho, el gen *mmc*, el gen de la histona H2Bv y el del factor traducción eIF4e están sub-expresados por la exposición a cadmio, mientras que Smd2, eIF2 α , eIF3s8 y eEF1 β están sobre-expresados. El ortólogo de Smd2 en *L. major* está relacionado con el *trans-splicing* (GO0045291) y está

constitutivamente expresado en amastigotes y en promastigotes en fase logarítmica (Leifso y col., 2007), por lo que posiblemente participa en la respuesta a condiciones adversas del medio. En la sección 4.3.2.2., se describe que eIF3s8 y eIF2 α están sobre-expresados en L/A y, además, eIF2 α está sobre-expresado por ΔT o ΔpH de forma aislada (Tablas 23 y 25), pero no por la concurrencia de ambos ni en promastigotes metacíclicos PNA⁻. No se ha hallado expresión diferencial de eEF1 β en ninguno de los estadios fundamentales del ciclo de *L. infantum*, pero en este análisis de la influencia de la presencia de cadmio ha sido hallado como sobre-expresado. Por otro lado, eEF1 α está sub-expresado en promastigotes metacíclicos y por $\Delta T\Delta pH$, pero está sobre-expresado con ΔT , no estando diferencialmente modulado por el cadmio. Por lo tanto, cada uno de estos factores de traducción está regulado diferencialmente por el parásito según el grado de diferenciación, estadio o condiciones ambientales adversas, lo cual se ilustra en la Figura 68. En conjunto, estos datos sugieren que el procesamiento del ARNm policistrónico y el control traduccional podrían ser puntos clave en la respuesta al estrés y en la diferenciación, integrando la información descrita en las secciones 4.3., 4.4., 4.5. y 4.6.

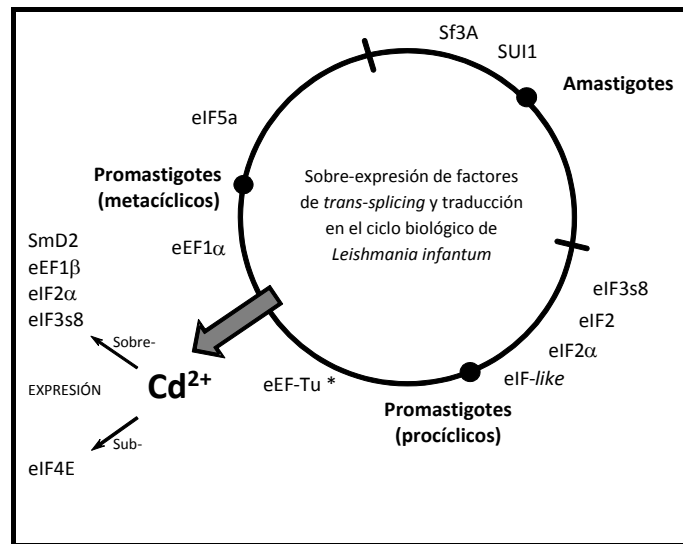


Figura 68. Expresión diferencial de factores de *trans-splicing* y traduccionales en el ciclo biológico de *L. infantum* y con la exposición a acetato de cadmio.

En el caso de la depleción de HIFBS, el número de genes diferencialmente expresados es aún menor que con la presencia de acetato de cadmio, el 50% de los cuales no están anotados en el genoma de *L. infantum*, por lo que hay que destacar de nuevo la conveniencia de concluir la anotación de genes en el mismo.

La gPEPCK está sub-expresada con depleción de nutrientes y está sobre-expresada en presencia de cadmio. Con la depleción de HIFBS, el gen que codifica para una 4-cumarato-CoA ligasa disminuye sus niveles de expresión. Este gen está relacionado con la biosíntesis de ubiquinona o CoQ, siendo el sustrato de la reacción catalizada por la enzima correspondiente el 4-cumarato y el producto el 4-cumaroil-CoA. Este gen está sobre-expresado en Pro-Pper/A (secciones 4.7. y 5.6). Los perfiles de expresión de la 4-cumarato-CoA ligasa sugieren, por tanto, que aumentan los niveles de CoQ ante una escasez de nutrientes en el medio. El gen de la metilmalonil-CoA epimerasa, relacionado con el metabolismo del propanoato y

Discusión

la degradación de la valina, la leucina y la isoleucina, está sub-expresado en ausencia de HIFBS, lo que sugiere que disminuye la degradación de tales aminoácidos en estas condiciones.

El gen que codifica la SerP51 (ciclina 1), relacionado con la señalización intracelular, está sobre-expresado en S/L y en promastigotes procíclicos de la fase estacionaria (PNA⁺/PNA⁻) y disminuye sus niveles de expresión por la depleción de HIFBS, por lo que alguna vía de señalización intracelular relacionada con la proliferación celular podría estar afectada por la depleción de HIFBS. Por último, la proteína de choque térmico hsp20, que está sobre-expresada en amastigotes en el nivel de proteína (Rosenzweig y col., 2008b), también disminuye sus niveles de expresión con la depleción de nutrientes. En otros organismos protege a otras proteínas contra la desnaturalización y la agregación inducida por calor y es oligomérica probablemente (Kim y Hol, 1998) y, al igual que otras proteínas hsp, tiene un papel importante en la interacción entre el parásito y el hospedador y en la respuesta a los efectos deletéreos de las condiciones ambientales adversas, como es la depleción de HIFBS.

5.6. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LOS PROMASTIGOTES DE *L. infantum* AISLADOS DE *P. perniciosus*.

El considerable número de diferencias halladas entre los perfiles de expresión génica de los promastigotes en cultivo axénico y los derivados de la parte anterior del tubo digestivo del flebotomo indica que las condiciones de cultivo influyen en la diferenciación del parásito. En este estudio se han comparado también por primera vez los estadios fundamentales del ciclo biológico (promastigote y amastigote) obtenidos de su medio natural.

En *L. major*, se observó un patrón de expresión global de los promastigotes metacíclicos de cultivo axénico más coincidente que el de los procíclicos con el de los amastigotes, lo que sugirió que los promastigotes metacíclicos constituyen un estadio pre-adaptativo preparado para la diferenciación al estadio amastigote una vez en contacto con la célula hospedadora (Akopyants y col., 2004). No obstante, se han detectado numerosas coincidencias en los perfiles de expresión de los genes de función conocida detectados en este caso entre los promastigotes en fase estacionaria de cultivo axénico (E) y los amastigotes (A) en relación con los promastigotes obtenidos de la parte anterior del tubo digestivo del vector (Figura 69), o dicho de otro modo, algunos genes que presentan diferencias en sus niveles de expresión entre los amastigotes y los promastigotes derivados de su medio natural que no aparecen en las condiciones de cultivo de promastigotes *in vitro*, ya que no se han detectado algunas de esas coincidencias entre E/A y Pro-Pper/A (Figura 74). Los genes de perfil coincidente entre Pro-Pper/E y Pro-Pper/A están relacionados con la regulación de la expresión génica, incluyendo la organización de la cromatina, el metabolismo, el transporte, la señalización intracelular y la remodelación del citoesqueleto, todos ellos procesos importantes en la diferenciación del parásito, según han puesto de manifiesto los análisis transcriptómicos descritos en las secciones 4.3., 4.4. y 4.5. Los promastigotes metacíclicos PNA⁻ presentan una cantidad considerablemente menor de coincidencias entre los genes de función conocida detectados en el análisis.

La sobre-expresión en Pro-Pper/E de los genes H-deAC, H4 (LinJ36_V3.3320 y LinJ36_V3.0020) y smc3 y de H3 LinJ16_V3.0600 en Pro-Pper/PNA⁻ indica que existen posibles cambios en la condensación de algunas regiones de la cromatina que afectarían probablemente a la expresión génica y a la organización estructural de los cromosomas en los promastigotes cultivados.

En cuanto a la expresión génica y su regulación, la sobre-expresión en Pro-Pper/E de una ARN polimerasa, la PABP (sobre-expresada en promastigotes PNA⁻/PNA⁺, sección 4.4.2.5.), eIF4E, y L23, la sobre-expresión en Pro-Pper/PNA⁻ de eIF2 (sobre-expresado en L/A) y eEF1 β (sobre-expresado por la presencia de acetato de cadmio) y la sub-expresión en Pro-Pper/E de genes de otras proteínas ribosómicas y del gen de la diftina sintasa sugieren posibles cambios en la regulación de la expresión génica en el nivel de estabilidad del ARNm con el mayor grado de diferenciación a promastigote metacíclico. Los perfiles de expresión contrarios de los genes eIF2 y diftina sintasa son coherentes, ya que la diftamina, producto de la reacción de la diftina sintasa, inactiva a este factor de iniciación por la adición de un residuo de ADP ribosa (Moehring y Moehring, 1988).

Una serie de genes relacionados con el transporte de las proteínas al lumen del RE y la modificación post-traduccional también están sobre-expresados en los promastigotes procedentes de su medio natural (Pro-Pper/E): sec13, sec14, Cph LinJ23_V3.0060, Tcp1 η , OTasa, NAGPIBP, GNAT, FTasa- α , ICMT y α 1,3ManT. Éste último gen está relacionado también con la modificación de otros glicoconjugados. Estos datos concuerdan con la variación de la composición de las modificaciones post-traduccionales de algunas proteínas cuando los promastigotes son cultivados. Las proteínas Tcp son chaperonas y, además de la regulación diferencial de Tcp1 η en el nivel de transcrito, se ha hallado la de Tcp1 γ en el nivel de proteína, estando sub-expresada en E/L (sección 4.3.4.). La α 1,3ManT participa también en la modificación de otros glicoconjugados.

También se han detectado diferencias de expresión en genes relacionados con la lipidación de las proteínas. La FNTA está sub-expresada en E/L, y según los datos de la comparación transcriptómica Pro-Pper/E, aparece disminuida en las formas en cultivo, por lo que en estas condiciones podría disminuir probablemente la farnesilación. La ICMT está sobre-expresada en E/A, lo que sugiere junto con la sobre-expresión en Pro-Pper/E que aumenta la metilación del grupo farnesilo en formas más diferenciadas del promastigote.

La degradación de los aminoácidos prolina, leucina, isoleucina y valina parece ser más activa en cultivo, a juzgar por la sub-expresión detectada en Pro-Pper/E de los genes α -cetoIVDH LinJ23_V3.0620, δ -1-pirrolina-5-carboxilato DH y GluDH. También parece disminuir la síntesis del indolacetato por la sub-expresión de IndPC, al igual que la síntesis de lisina por la sub-expresión de la succinil-diaminopimelato desuccinilasa en Pro-Pper/E. La síntesis de glutatión parece estar disminuida también en cultivo por la sub-expresión de la γ GCS, que participa en la síntesis de γ GC a partir de Glu y Cys con hidrólisis de ATP.

La gluconeogénesis parece estar disminuida en las formas en cultivo con respecto a los promastigotes en su medio natural debido a la sobre-expresión en Pper-Pro/E del gen de la gPEPCK, enzima limitante de este proceso metabólico. La sobre-expresión de la invertasa en Pro-Pper/E indica posiblemente un menor grado de utilización de la sacarosa como fuente de energía en cultivo. Sin embargo, en estas condiciones aumenta la expresión del gen de la Glc4'ep, por lo que la transformación de Glc en Gal parece ser más abundante. Además, el gen GT (*lmg2*) está sub-expresado en Pro-Pper/E, por lo que, en conjunto con el patrón de expresión de la invertasa, parece que los promastigotes en cultivo obtienen la glucosa directamente del medio, en el que se encuentra en abundancia, mientras que en el tubo digestivo del vector tienen más limitado el aporte de glucosa y deben activar también la degradación de la sacarosa.

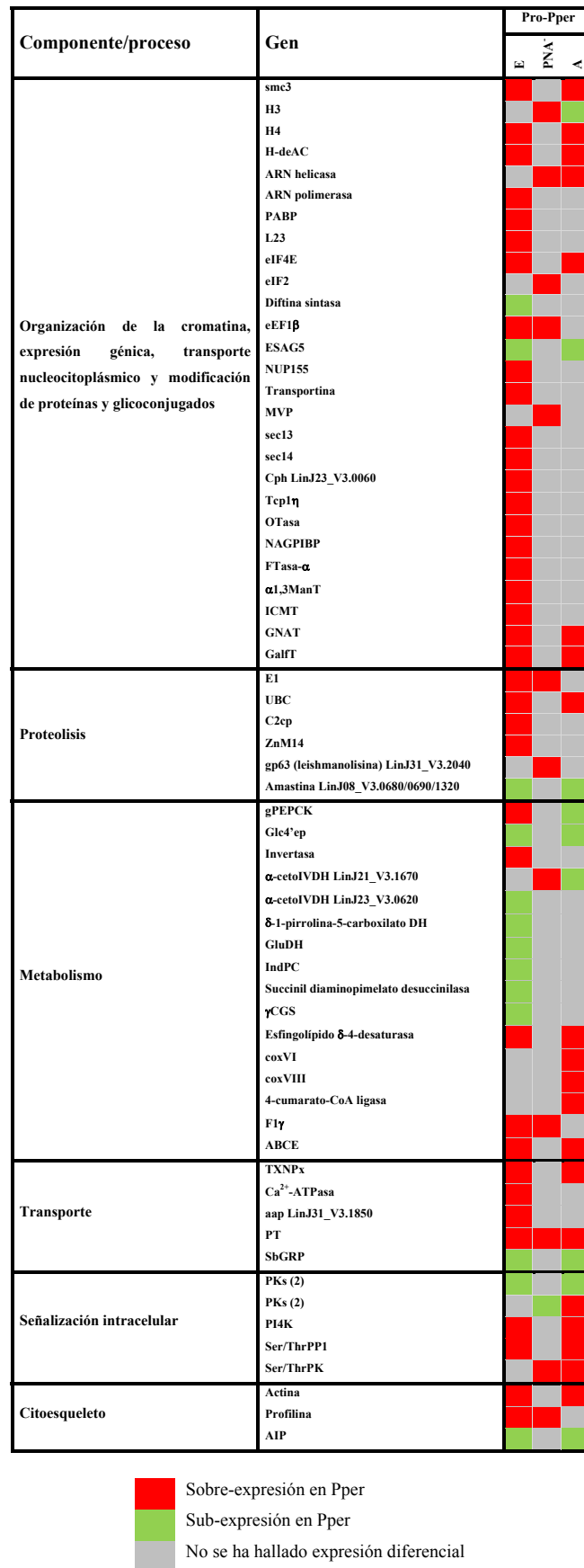


Figura 69. Comparación de los perfiles de expresión de genes de función conocida en Pro-Pper referidos a los promastigotes en fase estacionaria, subpoblación metacíclica PNA⁻ y amastigotes.

Los genes ABCE y F1 γ , relacionados con la cadena respiratoria, se sobre-expresan en Pro-Pper/E y Pro-Pper/PNA⁻, lo que sugiere una mayor actividad de la fosforilación oxidativa en los promastigotes que se encuentran en el tubo digestivo del vector que en los cultivados, así como con el grado de diferenciación a promastigote metacíclico. La sobre-expresión de los genes *coxVI*, *coxVIII* y 4-cumarato-CoA ligasa (sobre-expresado también con la depleción de HIFBS) indican una mayor actividad de la cadena de transporte electrónico en Pro-Pper/A. El gen *coxVI* está sobre-expresado en E/A y el *coxVIII* en L/A, por lo que estos genes disminuyen sus niveles de expresión en amastigotes, tanto si se comparan con promastigotes en cultivo como con promastigotes derivados del vector. En conjunto, estos datos sugieren que el estadio en el que se produce una mayor actividad de la cadena de transporte electrónico es en los promastigotes metacíclicos.

El transportador Ca²⁺-ATPasa está sobre-expresado en promastigotes frente a amastigotes (E/A, L/A), aunque los niveles de expresión que se alcanzan en cultivo son menores que en el tubo digestivo del vector (Pro-Pper/E); como este gen participa en el almacenamiento de Ca²⁺ en el lumen del RE (Lu y col., 1997), el cultivo parece afectar a dicho almacenamiento. Los perfiles de expresión del transportador *aap LinJ31_V3.1850* detectados en promastigotes en cultivo, amastigotes intracelulares y AL (sobre-expresión en E/L y $\Delta T\Delta pH$ y sub-expresión en E/A) frente a la sobre-expresión en Pro-Pper/E sugiere que la sobre-expresión de este gen en promastigotes en relación con los amastigotes se debe al efecto del cultivo axénico de promastigotes, al no haber sido hallada la sub-expresión en Pro-Pper/A.

El gen *TXNPx* se sobre-expresa en promastigotes derivados del vector con respecto a los amastigotes, pero se observó lo contrario en el nivel de proteína (Rosenzweig y col., 2008b), si bien en el último caso los promastigotes provenían de cultivo axénico. Por lo tanto, la esta diferencia podría ser debida al nivel de estudio de la expresión génica o bien a la utilización de formas en cultivo.

La sobre-expresión en Pro-Pper/E del gen del transportador nucleocitoplásmico *NUP155* y de una transportina, proteína que se une a las proteínas que han de ser importadas al núcleo, y de dos genes *MVP* en Pro-Pper/PNA⁻, indica que posiblemente aumenta el transporte de algunas proteínas al nucleoplasma cuando los promastigotes están en fase estacionaria de cultivo en relación con las formas equivalentes en el insecto vector.

Un conjunto de genes relacionados con la señalización intracelular presentan distinta regulación cuando los promastigotes se encuentran en el tubo digestivo del vector y cuando se encuentran en cultivo axénico (sección 4.7.1.), tanto si se trata de la subpoblación PNA⁻ como de la población en fase estacionaria. Estas diferencias podrían ser debidas a la presencia de diferentes estímulos, como la composición nutricional del medio, a pesar de que el grado de diferenciación de los promastigotes PNA⁻ es más próximo que el de E al de los promastigotes Pro-Pper. El significado de la sub-expresión del gen de una lipina en Pro-Pper/PNA⁻ es desconocido; se ha descrito que la lipina es fosforilada por Ser/Thr PKs de tipo TOR en respuesta a la estimulación por insulina en ratones, causando la mutagénesis del gen de la lipina hígado graso (Peterfy y col., 2001). Los patrones de expresión de las quinesinas, Dyn HC, la actina, la profilina y la coronina sugieren que el cultivo afecta a la remodelación del citoesqueleto de los promastigotes.

La sobre-expresión en Pro-Pper/E de *NAGPIBP*, una glucosil transferasa del grupo 1 que participa en la síntesis del anclaje GPI, y de *PI4K*, que participa en la síntesis de fosfatidilinositol 1-fosfato, sustrato utilizado en la reacción de la *NAGPIBP* sugiere una mayor abundancia de moléculas ancladas por GPI en los promastigotes obtenidos del tubo digestivo del flebotomo. La sobre-expresión de *GalfT* en Pro-Pper/E y Pro-Pper/A indica que la modificación con residuos de galactofuranosa que realiza esta

Discusión

proteína, según lo observado en *L. major* (Zhang y col., 2004) es probablemente más abundante en los promastigotes derivados del vector con respecto a los promastigotes en cultivo y los amastigotes intracelulares. Al ser los GIPLs los glicoconjugados más abundantes en el amastigote y a que el LPG está ausente en este estadio (Ilgoutz y McConville, 2001), probablemente se deba la sobre-expresión del gen a la mayor necesidad de adición de residuos de galactosilfurano al LPG en los promastigotes del vector, pudiendo presentar probablemente una capa de LPG más engrosada, al haber sido descrito este aumento de grosor con la diferenciación del promastigote (revisado por Handman, 1999). La β 1,3GalT está sobre-expresada en Pro-Pper/PNA⁻, al igual que en PNA⁻/PNA⁺, por lo que se espera un aumento de este tipo de la galactosilación en promastigotes más diferenciados.

En los experimentos previos que se exponen en esta memoria, no se ha detectado en ningún caso la glicoproteína gp63. Sin embargo, se ha detectado la sobre-expresión de uno de los genes gp63 en Pro-Pper/PNA⁻. Esto puede ser debido a distintas causas: a la pérdida de información en el análisis de *microarrays*, al grado de diferenciación a metacíclicos de los promastigotes comparados o a que se expresa en todos los estadios fundamentales del ciclo biológico de *Leishmania*, aunque se ha descrito que se alcanzan los mayores niveles de expresión en la fase estacionaria de cultivo (revisado por Handman y col., 2008). De hecho, no se ha detectado en Pro-Pper/E, E/L, E/A, L/A ni Δ pH (la acidificación acelera inicialmente el avance hacia la fase estacionaria). En cambio, el gen ZnM14 está sobre-expresado en Pro-Pper/E, dato que constituyen una evidencia adicional a la sobre-expresión en la subpoblación de promastigotes metacíclicos en la fase estacionaria de cultivo axénico (sección 4.4.2.2.) en cuanto a su posible relación con la infectividad, ya que aumentan sus niveles de expresión cuanto mayor es el grado de diferenciación a promastigote metacíclico.

5.7. LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN DE *L. infantum*: INTEGRACIÓN DE LOS DATOS DEL ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE LA GENÓMICA FUNCIONAL EN EL GÉNERO *Leishmania*.

Los análisis transcriptómicos de *L. infantum* mediante hibridación con *microarrays* genómicos completos descritos en esta memoria proporcionan nueva información sobre los procesos fundamentales de la diferenciación del parásito, tanto en su medio natural como en cultivo axénico, sobre la influencia concreta de factores que intervienen en dichos procesos y sobre la respuesta del parásito ante situaciones anómalas del medio. Teniendo en cuenta el creciente número de análisis de expresión génica diferencial en diferentes estadios y especies de *Leishmania*, es importante integrar todos los datos, especialmente en el caso de condiciones experimentales y estadios poco o nada estudiados en el nivel de expresión génica diferencial, con el objetivo de obtener información global de las diferencias entre los estadios y las especies.

La metodología descrita en este estudio para los análisis transcriptómicos y los datos expuestos en las secciones 4.1., 4.2., 4.4. y 4.5. han sido publicados (Alcolea y col., 2009; Alcolea y col., 2010b) y los de las secciones 4.3.1., 4.3.2. y 4.3.3. han sido aceptados para su publicación (Alcolea y col., 2010a). Los datos descritos en esta memoria han sido integrados con los datos publicados por otros grupos de investigación para el avance en los conocimientos de genómica funcional en el género *Leishmania* en general y en cada una de las especies que lo integran en particular (Tablas A37 y A38). Al igual que se han hallado genes específicos de especie en el estudio de los genomas (Tabla 1) (Peacock y col., 2007;

Myler, 2008), de los cuales se ha hallado expresión diferencial de PI3K, p-nitrofenilfosfatasa y MRP en este estudio, también se han hallado diferencias intraespecíficas e interespecíficas en la regulación diferencial de algunos genes. Esta variabilidad puede estar originada por diversas causas, unas debidas a diferencias entre las especies, otras a diferencias entre la regulación post-transcripcional y traduccional y otras a artefactos en el empleo de las técnicas de transcriptómica, es decir, a falsos positivos. Las Tablas A37 y A38 constituyen una revisión de los datos transcriptómicos publicados hasta el momento para diferentes estadios y especies de *Leishmania* en relación a los genes cuya expresión diferencial se describe en este estudio.

Los análisis transcriptómicos realizados hasta el momento han aportado información complementaria, es decir, perfiles de expresión de un mismo gen en diferentes estadios y especies. Éste ha sido el caso de un considerable número de genes cuya expresión diferencial en *L. infantum* ha sido descrita en este estudio (Figura 70, Tablas A37 y A38): dos genes de histonas (uno de H2B y otro de H3), PABP, L-PSP(pb5), eEF1 α , eIF2 α , eIF3s8, TIFSUI1, Ndkb, UBC2, gPEPCK, enolasa, lipasas, MPETS, esteroideDH, PGFS, PT, PT3, latosterol oxidasa, ECH, GT *lmg2*, MAPK LinJ24_V3.2410, INO1, SbGRP, β 1,3GalT, α -tubulina, DynHC, DynLCf, PFR1D, HASPB, MBAP y genes de algunas amastinas y tuzinas. Además, algunos de estos y otros genes presentan perfiles de expresión coincidentes en algunos estadios del ciclo biológico y entre algunas de las cuatro especies mencionadas, teniendo en cuenta que no se han estudiado los perfiles de expresión de todos los estadios fundamentales de todas ellas (Figura 70), y también se han detectado datos complementarios de expresión diferencial y perfiles de expresión coincidentes entre los análisis transcriptómicos descritos en esta memoria (Figuras 71-74). A continuación, se detallan algunos ejemplos:

- El gen PGFS está sobre-expresado en L/A en *L. major* y *L. infantum* y en E/A en *L. infantum* y *L. donovani*. Hay que tener en cuenta que no se han estudiado los perfiles de expresión de todos los estadios fundamentales en estas cuatro especies de *Leishmania*. Por ejemplo, en *L. donovani* se han estudiado los perfiles de expresión E/A mediante la técnica de proteómica de alta procesividad iTRAQ (Rosenzweig y col., 2008b) y con técnicas transcriptómicas parciales que han detectado 25 genes expresados diferencialmente (Srividya y col., 2007). Según los datos de este estudio, el gen PGFS está sobre-expresado en E/A y L/A y sub-expresado en E/L, PNA⁺/PNA⁻ y Δ T Δ pH, por lo que alcanza sus máximos niveles de expresión en los promastigotes más indiferenciados (Figuras 70 y 71).
- El gen MPETS está sobre-expresado en L/A y sub-expresado en E/L y promastigotes PNA⁻/PNA⁺, por lo que los mayores niveles de expresión de este gen se han detectado en los promastigotes más indiferenciados (Figuras 70 y 71).
- Los genes Cph y FKBP están sub-expresados en amastigotes (sobre-expresados en L/A) y en AL generados por Δ T Δ pH. Como están sobre-expresados en promastigotes procíclicos con respecto a los metacíclicos, en estos casos es también en el estadio más indiferenciado donde se alcanzan los mayores niveles de expresión, lo que sugiere que los cambios conformacionales en los que participan suceden posiblemente a lo largo del proceso de diferenciación (Figura 71).

Discusión

- La sobre-expresión de la 3-HMG-CoA reductasa en amastigotes intracelulares (sub-expresión en L/A) está relacionada con $\Delta T\Delta pH$. Sin embargo, el gen de la latosterol oxidasa está sobre-expresado en E/A debido a $\Delta T\Delta pH$, coincidiendo con una descripción de su sobre-expresión en amastigotes intracelulares descrita previamente (Rochette y col., 2009). El significado biológico del presumible aumento de la síntesis de vitamina D3 debido a la sobre-expresión de la latosterol oxidasa se desconoce (Figura 71).
- De los once genes que codifican lipasas que se han anotado en el genoma, se ha detectado la expresión diferencial de seis en los análisis descritos en esta memoria (Figura 72)
- Se describen diferentes perfiles de expresión diferencial detectados para genes de las familias de histonas (Figura 73).
- En las Figuras 72-74 se ha reunido información complementaria entre los análisis transcriptómicos comparativos de los promastigotes derivados del tubo digestivo del vector con promastigotes en cultivo y amastigotes y los restantes análisis que se describen en esta memoria. Por ejemplo, los niveles de expresión del gen de la 3-HMG-CoA reductasa disminuyen con la diferenciación de los promastigotes y alcanzan sus mayores niveles en amastigotes, tanto los intracelulares como los AL obtenidos por $\Delta T\Delta pH$, debido a que se sub-expresan en E/L, L/A y Pro-Pper/PNA⁻ y se sobre-expresan con $\Delta T\Delta pH$.

Se han detectado algunos datos aparentemente contradictorios. Algunos pueden ser debidos a una diferente regulación de la expresión de esos genes concretos en el nivel post-transcripcional y traduccional (Tabla A37). Por ejemplo, el gen *eIF2 α* fue descrito en un mismo trabajo publicado (Rochette y col., 2009) como sobre-expresado y sub-expresado en E/AL. Dicho gen se describe como sobre-expresado en E/A en este estudio. Se han producido otras contradicciones aparentes que aún no han sido explicadas entre los datos de este y otros estudios entre distintas especies y con técnicas similares o distintas: la histona H2B está sobre-expresada en E/A en *L. infantum* en el nivel de transcrito según los datos de este estudio y sub-expresada en *L. donovani* en el nivel de proteína (Rosenzweig y col., 2008); la misma diferencia entre los datos transcriptómicos y proteómicos se ha producido con el gen de una variante de la histona H2B entre *L. infantum* (Rochette y col., 2009) y *L. donovani* (Rosenzweig y col., 2008b); en el estudio transcriptómico que se realizó en *L. mexicana* (Holzer y col., 2006), un gen de la histona H3 se detectó como sobre-expresado en L/A, mientras que en un estudio proteómico posterior de *L. infantum* (Leifso y col., 2007) se observó la sub-expresión en L/A; el gen de la 3'NT/Nasa sobre-expresado en E/A y en AL generados por $\Delta T\Delta pH$ según los datos expuestos en esta memoria y lo descrito con anterioridad (Zilberstein y col., 1991; Zilberstein y Shapira, 1994; Saar y col., 1998; Debrabant y col., 2004; Zilberstein, 2008), mientras que en otro estudio se hallaron datos opuestos en E/A y en AL (Rochette y col., 2009); y en relación con un gen *DynLC*, se describió la sobre-expresión (Almeida y col., 2004) y la sub-expresión (Leifso y col., 2007) en L/A en *L. major* en el nivel post-transcripcional en ambos casos; y el gen *PGM^{BPI}*, sub-expresado en E/A y $\Delta T\Delta pH$ en el nivel de transcrito según este análisis transcriptómico, presenta el perfil de expresión correspondiente en el nivel de proteína (Rosenzweig y col., 2008b) (Figura 70).

Expresión génica diferencial en *Leishmania infantum*

Componente/proceso	Gen	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>
Histonas	H2A				
	H2B				
	H4				
Degradación de ARN	L-PSP (pb5)				
Ribosoma	S4				
	S11				
	S12				
	S14				
	S15				
	S15a				
	S29				
	L1a				
	L6				
	L7				
	L11				
	L18a				
	L19				
L31					
Proteolisis	Catepsina L				
	20S α 2 (proteasoma)				
Biosíntesis de tiamina	MPETs				
Glucólisis	PGM ^{BPI}				
Metabolismo de poliaminas	Agmatinasa				
Metabolismo de nucleótidos	Ndkb				
Biosíntesis de prostaglandinas	PGFS				
Transporte	MRP				
	ANC1/ANC2				
	GT <i>lmg2</i>				
	SbGRP				
Flagelo	DynLC2b				
	DynLCf				
	PFR1D				
Moléculas de superficie	Amastina*				
	Amastina**				
	HASPA1				
	HASPA2				
	HASPB				

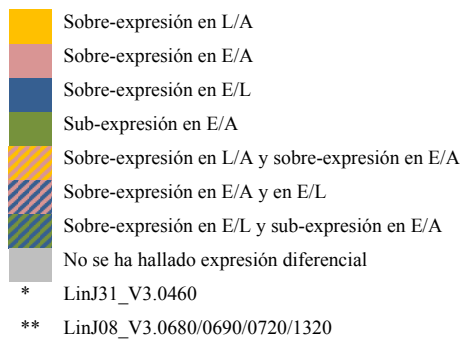


Figura 70. Datos complementarios de expresión diferencial de genes en distintas especies de *Leishmania*.

Componente/proceso	Gen							
		E/L	E/A	L/A	PNA/PNA ⁺	ΔTΔpH	ΔT	ΔpH
Expresión génica	eEF1α	Red	Gray	Gray	Green	Green	Red	Gray
	eIF2α	Gray	Gray	Red	Gray	Gray	Red	Red
	TIFSUII	Gray	Gray	Red	Gray	Gray	Red	Red
	S2	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	S3a	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	S4	Red	Red	Red	Green	Gray	Gray	Gray
	S11	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	S12	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray
	L1a	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	L7	Gray	Red	Red	Green	Gray	Gray	Gray
	L11	Gray	Red	Red	Green	Gray	Gray	Gray
	L19	Gray	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	L31	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Red
L32	Red	Gray	Gray	Green	Gray	Gray	Gray	
Modificación post-traducciona	Cph	Gray	Gray	Red	Green	Green	Gray	Gray
	FKBP	Gray	Gray	Red	Green	Green	Gray	Gray
Proteolisis	Catepsina L	Red	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray
	C2cp	Gray	Red	Red	Red	Green	Gray	Gray
Biosíntesis de tiamina	MPETs	Green	Gray	Red	Green	Gray	Gray	Gray
Metabolismo de lípidos/aminoácidos	ECH	Green	Gray	Gray	Red	Gray	Gray	Gray
	3-HMG-CoA reductasa	Gray	Gray	Green	Gray	Red	Gray	Gray
	Latosterol oxidasa	Gray	Gray	Red	Gray	Green	Gray	Gray
Metabolismo de poliaminas	Agmatinasa	Gray	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
Metabolismo de nucleótidos	Ndkb	Gray	Red	Red	Green	Gray	Gray	Gray
Biosíntesis de prostaglandinas	PGFS	Green	Red	Red	Green	Green	Gray	Gray
Transporte	aap	Red	Red	Red	Green	Gray	Red	Gray
	GT <i>lmg2</i>	Gray	Red	Red	Gray	Green	Gray	Gray
	SbGRP	Red	Red	Red	Gray	Green	Gray	Gray
	ETF	Red	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray
Citoesqueleto y flagelo	DynHC	Gray	Red	Red	Gray	Green	Gray	Gray
	DynLCf	Green	Gray	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	α-tubulina	Green	Gray	Red	Green	Gray	Gray	Gray
Señalización intracelular	INO1	Gray	Green	Gray	Gray	Red	Red	Gray
Moléculas de superficie	Amastina (1)	Gray	Green	Gray	Gray	Red	Red	Gray
	Amastina (2)	Red	Green	Gray	Gray	Red	Red	Gray
	Amastina (3)	Red	Green	Gray	Gray	Red	Red	Gray
	Amastina (4)	Gray	Gray	Gray	Gray	Red	Red	Gray
	Amastina (5)	Red	Gray	Gray	Gray	Red	Red	Gray
	Amastina (6)	Red	Gray	Gray	Gray	Red	Red	Gray
	HASPA1	Red	Red	Red	Gray	Gray	Gray	Gray
	HASPB	Red	Green	Gray	Gray	Red	Gray	Gray

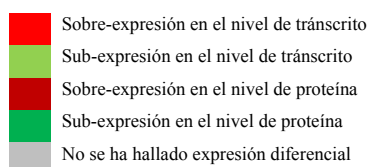


Figura 71. Datos complementarios de expresión diferencial de genes en la diferenciación de promastigotes en cultivo axénico y amastigotes intracelulares de *L. infantum*.

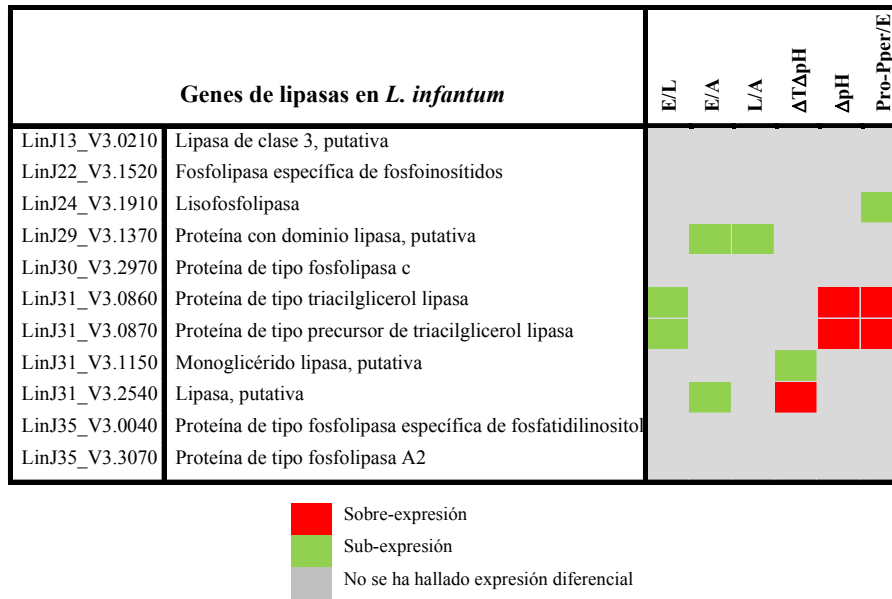


Figura 72. Datos complementarios de la expresión diferencial de los genes de lipasas de *L. infantum*.

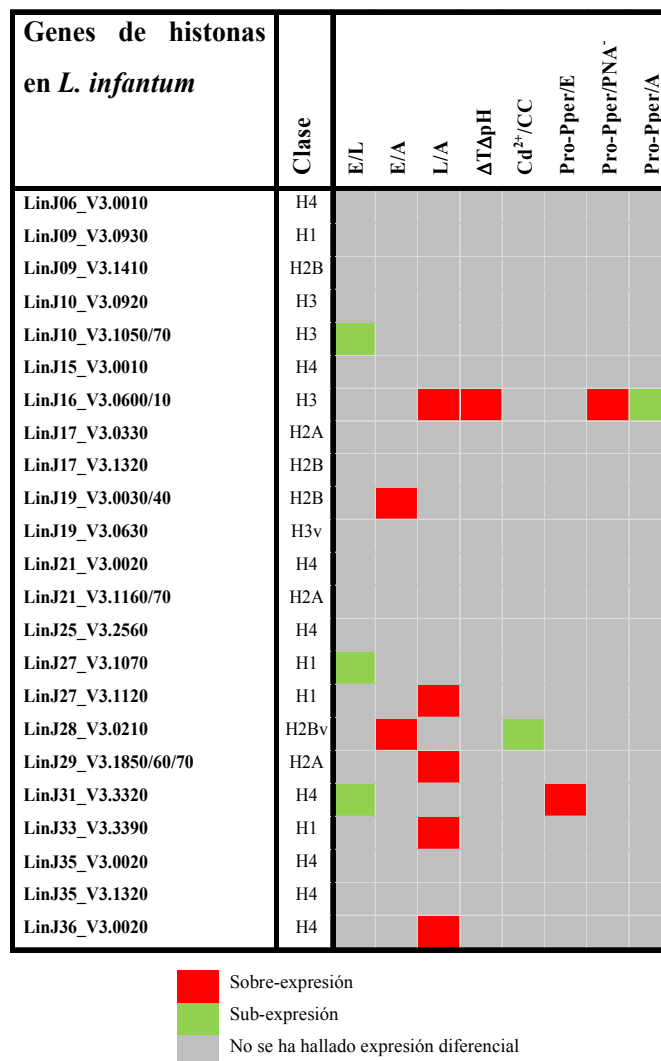


Figura 73. Datos complementarios de la expresión diferencial de los genes de histonas de *L. infantum*.

Discusión

Con el análisis proteómico descrito en la sección 4.3.4., se han obtenido también datos complementarios a los transcriptómicos (Figura 71). Así, el factor traduccional eEF1 α está sobre-expresado en promastigotes en fase estacionaria (en E/L) y en la subpoblación de promastigotes procíclicos PNA⁺ de la población en dicha fase; el polipéptido α de la flavoproteína de transferencia de electrones está sobre-expresado en E/L en el nivel de proteína y también en promastigotes metacíclicos PNA⁻ en el nivel de transcrito, por lo que su expresión es mayor cuanto mayor es el grado de diferenciación de los promastigotes; y, por último, la α -tubulina sobre-expresada en L/A y en procíclicos PNA⁺ en el nivel de transcrito y está sub-expresada en E/L a nivel de proteína, precisamente los estadios más móviles, y menos diferenciados. Por lo tanto, en el análisis proteómico parcial descrito en la sección 4.3.4. no se han detectado datos que pudieran ser aparentemente contradictorios con los obtenidos mediante la aproximación transcriptómica y se ha detectado información complementaria. No obstante, en algunos casos no se corresponden los niveles entre los transcritos y las proteínas correspondientes a un determinado gen, como ocurre con el gen PGM^{BPI} mencionado previamente.

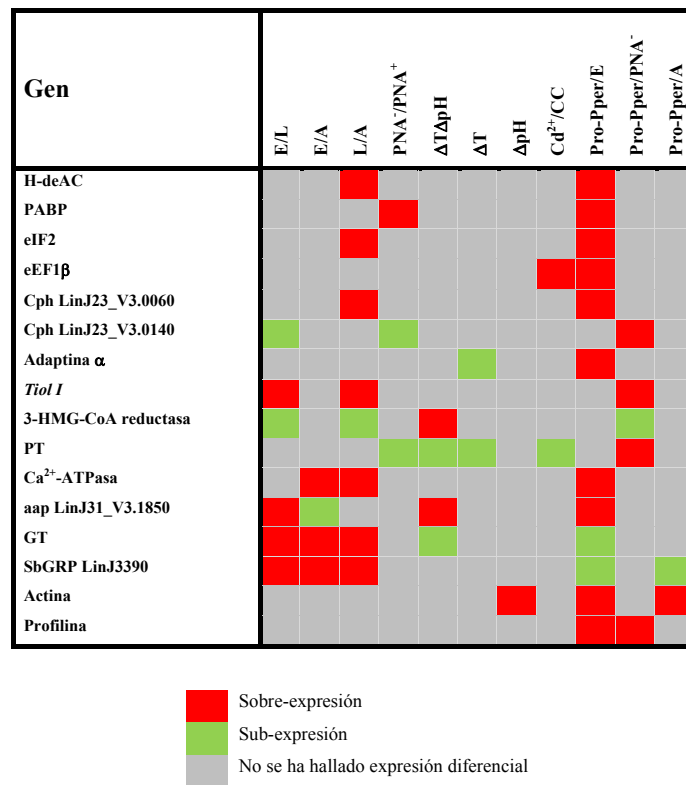


Figura 74. Datos complementarios entre los perfiles de expresión génica de los promastigotes extraídos del tubo digestivo del vector, los promastigotes en cultivo axénico, los amastigotes y otras condiciones experimentales descritas en esta memoria.

A nivel global, las principales aportaciones de este estudio de expresión génica diferencial global mediante análisis de *microarrays* que representan todos los genes de *L. infantum* han sido poner de manifiesto la predominancia de la sub-expresión en amastigotes intracelulares, contribuir a la definición del término controvertido de promastigote metacíclico, esclarecer la mayor tasa de infectividad de los promastigotes metacíclicos PNA⁻ en *L. infantum*, la mayor influencia de la temperatura en el proceso de

diferenciación con respecto al pH y las diferencias entre los promastigotes en cultivo axénico y los derivados de su medio natural, el tubo digestivo del insecto vector, las cuales no habían sido consideradas anteriormente en el estudio de la biología del promastigote. A nivel más pormenorizado, se ha aportado una gran cantidad de datos sobre la expresión diferencial de una gran cantidad de genes en diferentes procesos de diferenciación y bajo diferentes condiciones del medio en cultivo *in vitro*. En algunos casos, los análisis transcriptómicos descritos en este estudio han revelado información complementaria sobre el perfil de expresión génica.

Gracias al empleo de *microarrays* genómicos completos de ADN, se ha observado que la anotación de genes en la secuencia genómica de *L. infantum* no ha sido completada. La genoteca y los *microarrays* genómicos, herramientas cuya construcción se ha descrito en este estudio, permitirán la realización de sucesivos análisis genómicos y transcriptómicos. Los datos de expresión génica diferencial constituyen también la primera etapa del estudio de genes de interés mediante la generación de parásitos *knockout* y transfectantes estables para sobre-expresión de genes en la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas y candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas.

6

Conclusiones

1. Los *microarrays* de ADN contruidos a partir de la genoteca obtenida por fragmentación al azar representan el genoma completo de *Leishmania infantum*. Los análisis de hibridación con los *microarrays* para el estudio de los perfiles de expresión génica diferencial indican que no se han anotado todos los genes en el genoma de esta especie.
2. Los análisis de expresión génica con los *microarrays* completos confirman la expresión constitutiva del genoma de *Leishmania infantum*. En el proceso de validación de los datos de expresión génica diferencial con la técnica de PCR cuantitativa relativa en tiempo real se ha detectado co-regulación de genes adyacentes en algunos casos.
3. La sub-expresión génica predomina en amastigotes intracelulares respecto de los promastigotes, incluyendo numerosos genes relacionados con la expresión génica y su regulación.
4. En la progresión de la diferenciación de los promastigotes en cultivo axénico y en la diferenciación de los promastigotes a amastigotes en *Leishmania infantum* se ha detectado la disminución de los niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de nucleótidos de purina, la farnesilación y la N-glicosilación de las proteínas, el catabolismo de la glucosa, la biosíntesis del grupo hemo y de la prostaglandina F y las estructuras flagelar y paraflagelar.
5. Los promastigotes metacíclicos aislados mediante selección negativa con la lectina de cacahuete a partir de la población en fase estacionaria de cultivo axénico tienen mayor capacidad infectiva y en ellos se sobre-expresan genes relacionados con la infectividad.
6. El aumento de la temperatura es más relevante que la acidificación en la diferenciación de los promastigotes a amastigotes en cuanto a la expresión génica diferencial.
7. La presencia de acetato de cadmio y la depleción de suero bovino fetal en el cultivo axénico ocasionan la disminución del crecimiento y la expresión diferencial de un número muy reducido de genes. La sobre-expresión de los genes de un transportador de metales, la tripanotión reductasa, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal, una metaloproteasa de la familia M20 y una proteína de tipo hidroxilácido deshidrogenasa en presencia de cadmio sugieren una activación de la respuesta al estrés relacionada probablemente con la sobre-expresión de los factores transcripcionales eIF2 α , eIF3s8, eEF1 β y la sub-expresión de eIF4E.
8. El considerable número de genes diferencialmente expresados en *Leishmania infantum* entre los promastigotes establecidos en cultivo axénico y los derivados de la parte anterior del tubo digestivo del vector *Phlebotomus perniciosus* indica que las condiciones del cultivo influyen en los perfiles de expresión génica en el proceso de diferenciación de los promastigotes.

7

Bibliografía

- Abou el Naga, I. F., el Moneim Sharaf, I. A. (2000). Metacyclogenesis of *Leishmania major* in an acidic medium. *J Egypt Soc Parasitol*, **30**, 431-440.
- Abranches, P., Conceicao-Silva, F. M., Silva-Pereira, M. C. (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J Trop Med Hyg*, **87**, 197-200.
- Abranches, P., Silva-Pereira, M. C., Conceicao-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M., Janz, J. G. (1991). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, **77**, 557-561.
- Acedo Sanchez, C., Martin Sanchez, J., Velez Bernal, I. D., Sanchis Marin, M. C., Louassini, M., Maldonado, J. A., Morillas Marquez, F. (1996). Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int J Parasitol*, **26**, 303-310.
- Ajdary, S., Alimohammadian, M. H., Eslami, M. B., Kemp, K., Kharazmi, A. (2000). Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*, **68**, 1760-1764.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Martin, J., Pape, D., Wylie, T., Li, L., Kissinger, J. C., Roos, D. S., Beverley, S. M. (2001). A survey of the *Leishmania major* Friedlin strain V1 genome by shotgun sequencing: a resource for DNA microarrays and expression profiling. *Mol Biochem Parasitol*, **113**, 337-340.
- Akopyants, N. S., Matlib, R. S., Bukanova, E. N., Smeds, M. R., Brownstein, B. H., Stormo, G. D., Beverley, S. M. (2004). Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, **136**, 71-86.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Sanchez-Gorostiaga, A., Moreno-Paz, M., Gomez, M. J., Ramos, I., Parro, V., Larraga, V. (2009). Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics*, **93**, 551-564.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Gómez, M. J., Moreno, I., Domínguez, M., Parro, V., Larraga, V. (2010a). Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. *Int J Parasitol*, **Accepted**.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Gomez, M. J., Sanchez-Gorostiaga, A., Moreno-Paz, M., Gonzalez-Pastor, J. E., Torano, A., Parro, V., Larraga, V. (2010b). Temperature increase prevails over acidification in the gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics*, **11**, 31.
- Almeida, M. C., Cuba, C. A., de Sa, C. M., Pharoah, M. M., Howard, K. M., Miles, M. A. (1993). Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in vitro: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **87**, 325-329.
- Almeida, R., Gilmartin, B. J., McCann, S. H., Norrish, A., Ivens, A. C., Lawson, D., Levick, M. P., Smith, D. F., Dyal, S. D., Vetrie, D., Freeman, T. C., Coulson, R. M., Sampaio, I., Schneider, H., Blackwell, J. M. (2004). Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol Biochem Parasitol*, **136**, 87-100.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Alvar, J., Jimenez, M. (1994). Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *Aids*, **8**, 854.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*, **10**, 298-319.

Bibliografía

- Alvar, J. (2001a). Control. En: Las leishmaniasis: de la biología al control, Laboratorios Intervet, Salamanca, pp. 139-151.
- Alvar, J. (2001b). El vector. En: Las leishmaniasis: de la biología al control., Laboratorios Intervet Salamanca, pp. 55-67.
- Alvar, J. (2001c). Taxonomía. En: Las leishmaniasis: de la biología al control., Laboratorios Intervet Salamanca, pp. 35-54.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, **57**, 1-88.
- Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P. (2006). Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol*, **61**, 223-274.
- Aly, R., Argaman, M., Pinelli, E., Shapira, M. (1993). Intergenic sequences from the heat-shock protein 83-encoding gene cluster in *Leishmania mexicana amazonensis* promote and regulate reporter gene expression in transfected parasites. *Gene*, **127**, 155-163.
- Alzate, J. F., Arias, A., Mollinedo, F., Rico, E., de la Iglesia-Vicente, J., Jimenez-Ruiz, A. (2008). Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 3779-3782.
- Amela, C., Mendez, I., Torcal, J. M., Medina, G., Pachon, I., Canavate, C., Alvar, J. (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol*, **11**, 157-161.
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol*, **6**, 392-401.
- Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H. (2001). Ovoidin and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, **115**, 189-198.
- Ariza, A., Vickers, T. J., Greig, N., Armour, K. A., Dixon, M. J., Eggleston, I. M., Fairlamb, A. H., Bond, C. S. (2006). Specificity of the trypanothione-dependent *Leishmania major* glyoxalase I: structure and biochemical comparison with the human enzyme. *Mol Microbiol*, **59**, 1239-1248.
- Awasthi, A., Mathur, R. K., Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, **119**, 238-258.
- Bacellar, O., Brodskyn, C., Guerreiro, J., Barral-Netto, M., Costa, C. H., Coffman, R. L., Johnson, W. D., Carvalho, E. M. (1996). Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, **173**, 1515-1518.
- Baneth, G., Shaw, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, **106**, 315-324.
- Barros, V. C., Oliveira, J. S., Melo, M. N., Gontijo, N. F. (2006). *Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Exp Parasitol*, **80**, 167-175.
- Bastin, P., Matthews, K. R., Gull, K. (1996). The paraflagellar rod of kinetoplastida: solved and unsolved questions. *Parasitol Today*, **12**, 302-307.
- Bates, P. A., Tetley, L. (1993). *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Exp Parasitol*, **76**, 412-423.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, **37**, 1097-1106.
- Bates, P. A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*, **11**, 340-344.
- Baugh, L. R., Hill, A. A., Brown, E. L., Hunter, C. P. (2001). Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res*, **29**, E29.
- Belli, S. I. (2000). Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol*, **30**, 679-687.

- Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P., Laurentin, A. (1993). Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca(2+)-ATPase. *Biol Res*, **26**, 141-150.
- Bengs, F., Scholz, A., Kuhn, D., Wiese, M. (2005). LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol*, **55**, 1606-1615.
- Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C., Guilbride, D. L. (2005). Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **143**, 125-134.
- Berens, R. L., Marr, J. J. (1978). An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol*, **64**, 160.
- Berger, B. J., Dai, W. W., Wang, H., Stark, R. E., Cerami, A. (1996). Aromatic amino acid transamination and methionine recycling in trypanosomatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4126-4130.
- Bern, C., Adler-Moore, J., Berenguer, J., Boelaert, M., den Boer, M., Davidson, R. N., Figueras, C., Gradoni, L., Kafetzis, D. A., Ritmeijer, K., Rosenthal, E., Royce, C., Russo, R., Sundar, S., Alvar, J. (2006). Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, **43**, 917-924.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E., El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, **309**, 416-422.
- Beverley, S. M., Akopyants, N. S., Goyard, S., Matlib, R. S., Gordon, J. L., Brownstein, B. H., Stormo, G. D., Bukanova, E. N., Hott, C. T., Li, F., MacMillan, S., Muo, J. N., Schwertman, L. A., Smeds, M. R., Wang, Y. (2002). Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **357**, 47-53.
- Bhattacharya, S., Bakre, A., Bhattacharya, A. (2002). Mobile genetic elements in protozoan parasites. *J Genet*, **81**, 73-86.
- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W., Rollinghoff, M. (1996). Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*, **8**, 517-525.
- Boitz, J. M., Ullman, B. (2006). *Leishmania donovani* singly deficient in HGPRT, APRT or XPRT are viable in vitro and within mammalian macrophages. *Mol Biochem Parasitol*, **148**, 24-30.
- Bookout, A. L., Cummins, C. L., Kramer, M. F., Pesola, J. M., Mangelsdorf, D. J. (2006). High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. *Curr Prot Mol Biol*, **15.8**, 1-28.
- Bottrel, R. L., Dutra, W. O., Martins, F. A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R. P., Mayrink, W., Locksley, R., Gollob, K. J. (2001). Flow cytometric

Bibliografia

- determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, **69**, 3232-3239.
- Brandenburg, J., Schimanski, B., Nogoceke, E., Nguyen, T. N., Padovan, J. C., Chait, B. T., Cross, G. A., Gunzl, A. (2007). Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. *Embo J*, **26**, 4856-4866.
- Brennicke, A., Marchfelder, A., Binder, S. (1999). RNA editing. *FEMS Microbiol Rev*, **23**, 297-316.
- Bringaud, F., Ghedin, E., Blandin, G., Bartholomeu, D. C., Caler, E., Levin, M. J., Baltz, T., El-Sayed, N. M. (2006). Evolution of non-LTR retrotransposons in the trypanosomatid genomes: *Leishmania major* has lost the active elements. *Mol Biochem Parasitol*, **145**, 158-170.
- Brown, T., Mackey, K., Du, T. (2004). Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization. *Curr Protoc Mol Biol*, **Chapter 4**, Unit 4.9.
- Burchmore, R. J., Rodriguez-Contreras, D., McBride, K., Merkel, P., Barrett, M. P., Modi, G., Sacks, D., Landfear, S. M. (2003). Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3901-3906.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J. M., Lopez, M. C., Alvar, J., Moreno, J. (2008). Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, **26**, 1902-1911.
- Carvalho, E. M., Correia Filho, D., Bacellar, O., Almeida, R. P., Lessa, H., Rocha, H. (1995). Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, **53**, 273-277.
- Castro-Pinto, D. B., Genestra, M., Menezes, G. B., Waghabi, M., Goncalves, A., De Nigris Del Cistia, C., Sant'Anna, C. M., Leon, L. L., Mendonca-Lima, L. (2008). Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. *Arch Microbiol*, **189**, 375-384.
- Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*, **14**, 461-481.
- Cavener, D. R. (1992). GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol*, **223**, 811-814.
- Clarke, L., Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *Escherichia coli* genome. *Cell*, **9**, 91-99.
- Clayton, C., Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*, **156**, 93-101.
- Cleveland, W. S. (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Ass*, **74**, 829-836.
- Cohen-Freue, G., Holzer, T. R., Forney, J. D., McMaster, W. R. (2007). Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, **37**, 1077-1086.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, **21**, 3674-3676.
- Convit, J., Lapenta, P. (1946). Sobre un caso de leishmaniasis diseminada. *Rev Pat Clin*, 153-158.
- Couppie, P., Clyti, E., Sainte-Marie, D., Dedet, J. P., Carme, B., Pradinaud, R. (2004). Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg*, **71**, 558-560.
- Cozens, A. L., Runswick, M. J., Walker, J. E. (1989). DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase. *J Mol Biol*, **206**, 261-280.

- Croan, D. G., Morrison, D. A., Ellis, J. T. (1997). Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol*, **89**, 149-159.
- Cruz, A. K., Titus, R., Beverley, S. M. (1993). Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1599-1603.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., Grimaldi, G., Jr. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*, **16**, 142-144.
- Chakraborty, A., Sen, B., Datta, R., Datta, A. K. (2004). Isomerase-independent chaperone function of cyclophilin ensures aggregation prevention of adenosine kinase both in vitro and under in vivo conditions. *Biochemistry*, **43**, 11862-11872.
- Chang, C. S., Chang, K. P. (1985). Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol*, **16**, 267-276.
- Chang, K. P., Dwyer, D. M. (1976). Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, **193**, 678-680.
- Chang, K. P., Fong, Y., Bray, R. S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: *Leishmaniasis*. Chang, K. P., Bray, R. S. (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, pp. 1-30.
- Charest, H., Matlashewski, G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 2975-2984.
- Chatterjee, S. N., Gupta, P. C. (1970). Polyribosomes in thin sections of *Leishmania donovani*. *Z Naturforsch B*, **25**, 232-234.
- Chen, D. Q., Lu, H., Chang, K. P. (1999). Replacement of *Leishmania* N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene requires episomal rescue. *Mol Biochem Parasitol*, **100**, 223-227.
- Chenik, M., Chaabouni, N., Ben Achour-Chenik, Y., Ouakad, M., Lakhel-Naouar, I., Louzir, H., Dellagi, K. (2006). Identification of a new developmentally regulated *Leishmania major* large RAB GTPase. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 541-548.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Da'dara, A. A., Walter, R. D. (1998). Molecular and biochemical characterization of S-adenosylmethionine decarboxylase from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*, **336 (Pt 3)**, 545-550.
- da Silva, R., Sacks, D. L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*, **55**, 2802-2806.
- Debrabant, A., Bastien, P., Dwyer, D. M. (2001). A unique surface membrane anchored purine-salvage enzyme is conserved among a group of primitive eukaryotic human pathogens. *Mol Cell Biochem*, **220**, 109-116.
- Debrabant, A., Joshi, M. B., Pimenta, P. F., Dwyer, D. M. (2004). Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *Int J Parasitol*, **34**, 205-217.
- Dedet, J. P. (1993). *Leishmania* et Leishmanioses du continent Américain. *Ann Inst Pasteur Actualités*, **4**, 3-25.
- Degrave, W., Fragoso, S. P., Britto, C., van Heuverswyn, H., Kidane, G. Z., Cardoso, M. A., Mueller, R. U., Simpson, L., Morel, C. M. (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, **27**, 63-70.
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C., Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, **23**, 673-679.
- Denny, P. W., Gokool, S., Russell, D. G., Field, M. C., Smith, D. F. (2000). Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *J Biol Chem*, **275**, 11017-11025.

Bibliografia

- Depledge, D. P., Evans, K. J., Ivens, A. C., Aziz, N., Maroof, A., Kaye, P. M., Smith, D. F. (2009). Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between Species and in Different Host Genetic Backgrounds. *PLoS Negl Trop Dis*, **3**, e476.
- Dereure, J., Reynes, J., Pratlong, F., Lamaury, I., Rioux, J. A., Janbon, F., Dedet, J. P. (1995). Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients in the south of France. *Bull World Health Organ*, **73**, 245-246.
- Descoteaux, A., Turco, S. J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*, **1455**, 341-352.
- Desjeux, P. (1992). Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q*, **45**, 267-275.
- Desjeux, P. (1995). *Leishmania* / HIV co-infections. *Afr Health*, **18**, 20-22.
- Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, **14**, 417-423.
- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**, 239-243.
- Desjeux, P., Piot, B., O'Neill, K., Meert, J. P. (2001). Co-infections of *Leishmania*/HIV in south Europe. *Med Trop (Mars)*, **61**, 187-193.
- Detke, S. (2007). TOR-induced resistance to toxic adenosine analogs in *Leishmania* brought about by the internalization and degradation of the adenosine permease. *Exp Cell Res*, **313**, 1963-1978.
- Dhalia, R., Reis, C. R., Freire, E. R., Rocha, P. O., Katz, R., Muniz, J. R., Standart, N., de Melo Neto, O. P. (2005). Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol*, **140**, 23-41.
- Diehl, S., Diehl, F., El-Sayed, N. M., Clayton, C., Hoheisel, J. D. (2002). Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray. *Mol Biochem Parasitol*, **123**, 115-123.
- Docampo, R., Moreno, S. N. (1999). Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today*, **15**, 443-448.
- Docampo, R., Moreno, S. N. (2001). The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol*, **114**, 151-159.
- Doering, T. L., Masterson, W. J., Englund, P. T., Hart, G. W. (1989). Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J Biol Chem*, **264**, 11168-11173.
- Dominguez, M., Torano, A. (2001). *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. *Parasite Immunol*, **23**, 259-265.
- Dormeyer, M., Reckenfelderbaumer, N., Ludemann, H., Krauth-Siegel, R. L. (2001). Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*, **276**, 10602-10606.
- Dougherty, M., Hamilton, J. G. C., Ward, R. D. (1994). Isolation of oviposition pheromone from eggs of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Med Vet Entomol*, **8**, 119-124.
- Dreyfus, M., Regnier, P. (2002). The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell*, **111**, 611-613.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., Tamar, S., Olivier, M., Papadopoulou, B. (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J*, **16**, 2590-2598.
- Dumas, C., Chow, C., Muller, M., Papadopoulou, B. (2006). A novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in *Leishmania*. *Eukaryot Cell*, **5**, 2033-2046.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M.,

- Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, **309**, 409-415.
- El Fakhry, Y., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (2002). A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, **2**, 1007-1017.
- Ephros, M., Bitnun, A., Shaked, P., Waldman, E., Zilberstein, D. (1999). Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 278-282.
- Erdmann, M., Scholz, A., Melzer, I. M., Schmetz, C., Wiese, M. (2006). Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. *Mol Biol Cell*, **17**, 2035-2045.
- Ersfeld, K., Barraclough, H., Gull, K. (2005). Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol*, **61**, 742-757.
- Espinoza, I., Toro, G. C., Hellman, U., Galanti, N. (1996). Histone H1 and core histones in *Leishmania* and *Crithidia*: comparison with *Trypanosoma*. *Exp Cell Res*, **224**, 1-7.
- Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, **8**, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, **8**, 175-185.
- Fagan, M. J., Saier, M. H., Jr. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol*, **38**, 57-99.
- Feldman, A. L., Costouros, N. G., Wang, E., Qian, M., Marincola, F. M., Alexander, H. R., Libutti, S. K. (2002). Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. *Biotechniques*, **33**, 906-912, 914.
- Ferrer, L. (1989). Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **7**, 293-295.
- Figarella, K., Uzcategui, N. L., Zhou, Y., LeFurgey, A., Ouelette, M., Bhattacharjee, H., Mukhopadhyay, R. (2007). Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol Microbiol*, **65**, 1006-1017.
- Flohe, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., Hecht, H. J. (2002). Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys*, **397**, 324-335.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **251**, 767-773.
- ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/L_infantum, posting date. FTP data download from GeneDB.
- Fu, G., Kolesnikov, A. A. (1994). *Leishmania gymnodactyli* and *Leishmania infantum* minicircles contain the same guide RNA genes as do minicircles of *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*, **67**, 171-174.
- Gbenle, G. O. (1993). Characterization of a filtrable 3'-nucleotidase of *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta*, **1203**, 162-167.

Bibliografia

- Genestra, M., Cysne-Finkelstein, L., Leon, L. (2004). Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochem Funct*, **22**, 315-320.
- Gerald, N. J., Coppens, I., Dwyer, D. M. (2008). Molecular characterization and expression of a novel kinesin which localizes with the kinetoplast in the human pathogen, *Leishmania donovani*. *Cell Motil Cytoskeleton*.
- Ginger, M. L., Chance, M. L., Goad, L. J. (1999). Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *Biochem J*, **342 (Pt 2)**, 397-405.
- Ginger, M. L., Chance, M. L., Sadler, I. H., Goad, L. J. (2001). The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem*, **276**, 11674-11682.
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, **13**, 1422-1437.
- Giunchetti, R. C., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguilar-Soares, R. D., de Souza, J. V., das Dores Moreira, N., Malaquias, L. C., Mota e Castro, L. L., de Lana, M., Reis, A. B. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, **25**, 7674-7686.
- Goff, L. A., Bowers, J., Schwalm, J., Howerton, K., Getts, R. C., Hart, R. P. (2004). Evaluation of sense-strand mRNA amplification by comparative quantitative PCR. *BMC Genomics*, **5**, 76.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A., Larraga, V. (1999). Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem*, **259**, 909-916.
- Gopfert, U., Goehring, N., Klein, C., Ilg, T. (1999). Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes. *Biochem J*, **344 Pt 3**, 787-795.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*, **8**, 195-202.
- Green, P. 1994, posting date. Laboratory of Phil Green. [Online.]
- Griffiths, W. A. D. (1987). Old World cutaneous leishmaniasis. En: The leishmaniasis in Biology and Medicine. Clinical aspects and control. Peters, W., Killick Kendrick, R. (Ed.). The leishmaniasis in Biology and Medicine Vol. 2, Academic Press, London, pp. 617-636.
- Guerfali, F. Z., Laouini, D., Guizani-Tabbane, L., Ottones, F., Ben-Aissa, K., Benkahla, A., Manchon, L., Piquemal, D., Smandi, S., Mghirbi, O., Commes, T., Marti, J., Dellagi, K. (2008). Simultaneous gene expression profiling in human macrophages infected with *Leishmania major* parasites using SAGE. *BMC Genomics*, **9**, 238.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., Bryceson, A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, **2**, 494-501.
- Hanahan, D., Meselson, M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, **100**, 333-342.
- Handman, E., Osborn, A. H., Symons, F., van Driel, R., Cappai, R. (1995). The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. *Mol Biochem Parasitol*, **74**, 189-200.
- Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*, **44**, 1-39.
- Handman, E., Papenfuss, A. T., Speed, T. P., Goding, J. W. (2008). *Leishmania* Surface Proteins. En: *Leishmania after the genome*. Myler, P. J., Fassel, N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, pp. 177-204.

- Hanke, T., Ramiro, M. J., Trigueros, S., Roca, J., Larraga, V. (2003). Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4917-4928.
- Hannaert, V., Blaauw, M., Kohl, L., Allert, S., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. (1992). Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, **55**, 115-126.
- Hannaert, V., Saavedra, E., Duffieux, F., Szikora, J. P., Rigden, D. J., Michels, P. A., Opperdoes, F. R. (2003). Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1067-1071.
- Hart, D. T., Vickerman, K., Coombs, G. H. (1981). A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. *Parasitology*, **82**, 345-355.
- Hart, D. T., Coombs, G. H. (1982). *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol*, **54**, 397-409.
- Hashim, F. A., Khalil, E. A., Ismail, A., el Hassan, A. M. (1995). Apparently successful treatment of two cases of post kala-azar dermal leishmaniasis with liposomal amphotericin B. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **89**, 440.
- Hasne, M. P., Lawrence, F. (1999). Characterization of prenylated protein methyltransferase in *Leishmania*. *Biochem J*, **342 Pt 3**, 513-518.
- Hausmann, K., Hülsmann, N. (1996). Protozoology. 2nd ed. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart.
- Haynes, P. A. (1998). Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology*, **8**, 1-5.
- Hecker, H., Gander, E. S. (1985). The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes. *Biol Cell*, **53**, 199-208.
- Hecker, H., Betschart, B., Bender, K., Burri, M., Schlimme, W. (1994). The chromatin of trypanosomes. *Int J Parasitol*, **24**, 809-819.
- Hermoso, T., Jaffe, C. L. (1993). Phosphorylation of proteins in virulent promastigotes from *Leishmania major*. *Biol Res*, **26**, 267-271.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, **354**, 1191-1199.
- Hilley, J. D., Zawadzki, J. L., McConville, M. J., Coombs, G. H., Mottram, J. C. (2000). *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell*, **11**, 1183-1195.
- Holzer, T. R., McMaster, W. R., Forney, J. D. (2006). Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, **146**, 198-218.
- Hommel, M. (1978). The genus *Leishmania*: biology of the parasites and clinical aspect. *Bull Inst Pasteur*, **75**, 5-102.
- Hopfner, K. P., Eichinger, A., Engh, R. A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R., Angerer, B. (1999). Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3600-3605.
- Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., Ashman, K. (1995). Automation of micro-preparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins. *FEBS Lett*, **376**, 91-94.
- Howard, M. K., Sayers, G., Miles, M. A. (1987). *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Exp Parasitol*, **64**, 147-156.
- Hubscher, U., Maga, G., Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, **71**, 133-163.

Bibliografía

- Iborra, S., Soto, M., Carrión, J., Alonso, C., Requena, J. M. (2004). Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **22**, 29-30.
- Ilg, T., Overath, P., Ferguson, M. A. J., Rutherford, T., Campbell, D. G., McConville, M. J. (1994). O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase: characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J Biol Chem*, **269**, 24073-24081.
- Ilg, T. (2000a). Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today*, **16**, 489-497.
- Ilg, T. (2000b). Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J*, **19**, 1953-1962.
- Ilgoutz, S. C., McConville, M. J. (2001). Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol*, **31**, 899-908.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B., Myler, P. J. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**, 436-442.
- Jackson, A. P. (2010). The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Mol Biol Evol*, **27**, 33-45.
- Jansen, R. P., Hurt, E. C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., Tollervey, D. (1991). Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J Cell Biol*, **113**, 715-729.
- Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., Madhubala, R. (2009). Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, **164**, 111-117.
- Johnson, P. J., Kooter, J. M., Borst, P. (1987). Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*, **51**, 273-281.
- Joshi, P. B., Sacks, D. L., Modi, G., McMaster, W. R. (1998). Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Mol Microbiol*, **27**, 519-530.
- Kabututu, Z., Martin, S. K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C. J., Duszenko, M., Lazarus, M., Thuita, L. W., Urade, Y., Kubata, B. K. (2002). Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, **32**, 1693-1700.
- Kahl, L. P., McMahan-Pratt, D. (1987). Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *J Immunol*, **138**, 1587-1595.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, **119**, 329-341.

- Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, **28**, 27-30.
- Kerr, S. F. (2000). Palaearctic origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **95**, 75-80.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*, **4**, 1-24.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, **17**, 279-289.
- Killick-Kendrick, R. (1979). The biology of *Leishmania* in *Phlebotomus* sandflies. Lumsden, W. H. R., Evans, D. A. (Eds.) Vol. Biology of the Kinetoplastida. Vol. 2., Academic Press, London, pp. 395-460.
- Kim, H., Hol, W. G. (1998). Crystal structure of *Leishmania mexicana* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a new crystal form confirms the putative physiological active site structure. *J Mol Biol*, **278**, 5-11.
- Klein, C., Gopfert, U., Goehring, N., Stierhof, Y. D., Ilg, T. (1999). Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Identification, purification, structural and ultrastructural characterization of the secreted promastigote proteophosphoglycan pPPG2, a stage-specific glycoisoform of amastigote aPPG. *Biochem J*, **344 Pt 3**, 775-786.
- Koonin, E. V., Tatusov, R. L. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J Mol Biol*, **244**, 125-132.
- Koslowsky, D. J., Riley, G. R., Feagin, J. E., Stuart, K. (1992). Guide RNAs for transcripts with developmentally regulated RNA editing are present in both life cycle stages of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **12**, 2043-2049.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Krishnamurthy, G., Vikram, R., Singh, S. B., Patel, N., Agarwal, S., Mukhopadhyay, G., Basu, S. K., Mukhopadhyay, A. (2005). Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. *J Biol Chem*, **280**, 5884-5891.
- Kuhn, D., Wiese, M. (2005). LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Mol Microbiol*, **56**, 1169-1182.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lainson, R., Shaw, J. J. (1988). New World Leishmaniasis- The Neotropical *Leishmania* Species. En: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. Vol. 5. Parasitology. Cox, F. E. G., Kreier, J. P., Wakelin, D. (Eds.). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. Vol. 5, Academic Press, London, pp. 665-696.
- Lamothe, J. (2005). A new formulation of fungizone in the canine model on visceral leishmaniasis: amphotericin B treated by heat. *Third World Congress on Leishmaniasis*. Palermo-Terrasini.
- Lee, M. G. (1998). The 3' untranslated region of the hsp 70 genes maintains the level of steady state mRNA in *Trypanosoma brucei* upon heat shock. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4025-4033.
- Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A., McMaster, W. R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol*, **152**, 35-46.
- Lemma, A., Schiller, E. L. (1964). Extracellular Cultivation of the leishmanial bodies of species belonging to the protozoan genus *Leishmania*. *Exp Parasitol*, **15**, 503-513.
- Leon, W., Fouts, D. L., Manning, J. (1978). Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res*, **5**, 491-504.

Bibliografia

- Li, Q., Zhao, Y., Ni, B., Yao, C., Zhou, Y., Xu, W., Wang, Z., Qiao, Z. (2008). Comparison of the expression profiles of promastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania donovani* using serial analysis of gene expression. *Parasitol Res*, **103**, 821-828.
- Li, Y., Li, T., Liu, S., Qiu, M., Han, Z., Jiang, Z., Li, R., Ying, K., Xie, Y., Mao, Y. (2004). Systematic comparison of the fidelity of aRNA, mRNA and T-RNA on gene expression profiling using cDNA microarray. *J Biotechnol*, **107**, 19-28.
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., Michaeli, S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, **2**, 830-840.
- Liveanu, V., Webster, P., Zilberstein, D. (1991). Localization of the plasma membrane and mitochondrial H(+)-ATPases in *Leishmania donovani* promastigotes. *Eur J Cell Biol*, **54**, 95-101.
- Lopez, J. A., Carvalho, T. U., de Souza, W., Flohe, L., Guerrero, S. A., Montemartini, M., Kalisz, H. M., Nogoceke, E., Singh, M., Alves, M. J., Colli, W. (2000). Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med*, **28**, 767-772.
- Louassini, M., Adroher, F. J., Foulquie, M. R., Benitez, R. (1998). Investigations on the in vitro metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. *Acta Trop*, **70**, 355-368.
- Lu, H. G., Zhong, L., Chang, K. P., Docampo, R. (1997). Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J Biol Chem*, **272**, 9464-9473.
- Lukes, J., Mauricio, I. L., Schonian, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, K. W., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F. J., Miles, M. A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9375-9380.
- Luo, L., Salunga, R. C., Guo, H., Bittner, A., Joy, K. C., Galindo, J. E., Xiao, H., Rogers, K. E., Wan, J. S., Jackson, M. R., Erlander, M. G. (1999). Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med*, **5**, 117-122.
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., Opperdoes, F. R. (2000). Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **111**, 1-14.
- Lysenko, A. J. (1971). Distribution of leishmaniasis in the Old World. *Bull World Health Organ*, **44**, 515-520.
- Magill, A. J., Grogl, M., Gasser, R. A., Jr., Sun, W., Oster, C. N. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med*, **328**, 1383-1387.
- Marsden, P. D. (1986). Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **80**, 859-876.
- Martin Luengo, F., Quiles Mora, J. (1982). Leishmaniasis in Spain. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)*, **56**, 699-726.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*, **11**, 1291-1299.
- Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martinez, L. E., Manning-Cela, R. G., Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*, **2010**, 525241.
- Mauricio, I. L., Stothard, J. R., Miles, M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, **16**, 188-189.
- Mazareb, S., Fu, Z. Y., Zilberstein, D. (1999). Developmental regulation of proline transport in *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol*, **91**, 341-348.

- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, M. A., Sacks, D. L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo J*, **11**, 3593-3600.
- McConville, M. J., Ferguson, M. A. J. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*, **294**, 305-324.
- McConville, M. J., Schnur, L. F., Jaffe, C., Schneider, P. (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan-inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J*, **310**, 807-818.
- McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C., Teasdale, R. D. (2002). Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 122-154.
- McConville, M. J., de Souza, D., Saunders, E., Likic, V. A., Naderer, T. (2007). Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol*, **23**, 368-375.
- McConville, M. J., De Souza, D. P., Saunders, E. C., Pyke, J., Naderer, T., Ellis, M. A., Sernee, F. M., Ralton, J. E., Likic, V. A. (2008). Analysis of the *Leishmania* Metabolome. En: *Leishmania after the genome*. Myler, P. J., Fassel, N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- McNicoll, F., Drummel-Smith, J., Muller, M., Madore, E., Boilard, N., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (2006). A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, **6**, 3567-3581.
- Medrano, F. J., Hernandez-Quero, J., Jimenez, E., Pineda, J. A., Rivero, A., Sanchez-Quijano, A., Velez, I. D., Viciano, P., Castillo, R., Reyes, M. J., et al. (1992). Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? *AIDS*, **6**, 1499-1503.
- Meinkoth, J., Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*, **138**, 267-284.
- Mengeling, B. J., Beverley, S. M., Turco, S. J. (1997). Designing glycoconjugate biosynthesis for an insidious intent: phosphoglycan assembly in *Leishmania* parasites. *Glycobiol*, **7**, 873-880.
- Minta, J. O., Pambrun, L. (1985). In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol*, **119**, 111-126.
- Moehring, J. M., Moehring, T. J. (1988). The post-translational trimethylation of diphthamide studied in vitro. *J Biol Chem*, **263**, 3840-3844.
- Molina, R. (1991). Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: psychodidae). *Res Rev Parasitol* **51**, 83-85.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., Lucientes, J., Alvar, J. (1994a). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **88**, 491-493.
- Molina, R., Canavate, C., Cercenado, E., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Alvar, J. (1994b). Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Aids*, **8**, 277-279.
- Moody-Haupt, S., Patterson, J. H., Mirelman, D., McConville, M. J. (2000). The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *J Mol Biol*, **297**, 409-420.
- Moody, S. F. (1993). Molecular variation in *Leishmania*. *Acta Trop*, **53**, 185-204.
- Moreno, J., Nieto, J., Masina, S., Canavate, C., Cruz, I., Chicharro, C., Carrillo, E., Napp, S., Reymond, C., Kaye, P. M., Smith, D. F., Fasel, N., Alvar, J. (2007). Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*, **25**, 5290-5300.

Bibliografia

- Mottram, J. C., Murphy, W. J., Agabian, N. (1989). A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* hsp83 gene cluster. *Mol Biochem Parasitol*, **37**, 115-127.
- Mottram, J. C., Coombs, G. H., Alexander, J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 375-381.
- Mukherjee, A., Roy, G., Guimond, C., Ouellette, M. (2009). The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. *Mol Microbiol*, **74**, 914-927.
- Mukhopadhyay, N. K., Saha, A. K., Lovelace, J. K., Da Silva, R., Sacks, D. L., Glew, R. H. (1988). Comparison of the protein kinase and acid phosphatase activities of five species of *Leishmania*. *J Protozool*, **35**, 601-607.
- Mullin, K. A., Foth, B. J., Ilgoutz, S. C., Callaghan, J. M., Zawadzki, J. L., McFadden, G. I., McConville, M. J. (2001). Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell*, **12**, 2364-2377.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366**, 1561-1577.
- Myler, P. J., Beverley, S. M., Cruz, A. K., Dobson, D. E., Ivens, A. C., McDonagh, P. D., Madhubala, R., Martinez-Calvillo, S., Ruiz, J. C., Saxena, A., Sisk, E., Sunkin, S. M., Worthey, E., Yan, S., Stuart, K. D. (2001). The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol*, **190**, 9-12.
- Myler, P. J. (2008). Genome Structure and Content. En: *Leishmania* after the genome. Myler, P. J., Fassel, N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Naderer, T., Vince, J. E., McConville, M. J. (2004). Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med*, **4**, 649-665.
- Naula, C., Parsons, M., Mottram, J. C. (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta*, **1754**, 151-159.
- Neal, R. A., Miles, R. A. (1963). Heated blood agar medium for the growth of *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. *Nature*, **198**, 210-211.
- Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H. M., Flohe, L. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem*, **378**, 827-836.
- Nowicki, C., Cazzulo, J. J. (2007). Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.
- Noyes, H. (1998). Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **93**, 657-661.
- Olafson, R. W., Thomas, J. R., Ferguson, M. A., Dwek, R. A., Chaudhuri, M., Chang, K. P., Rademacher, T. W. (1990). Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Biol Chem*, **265**, 12240-12247.
- Oliveira Neto, M. P., Grimaldi, G., Jr., Momen, H., Pacheco, R. S., Marzochi, M. C., McMahon Pratt, D. (1986). Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **81**, 303-309.
- OMS 2000, posting date. Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1.
- Ono, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 289-294.
- Opperdoes, F. R., Coombs, G. H. (2007). Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol*, **23**, 149-158.
- Papin, J. A., Hunter, T., Palsson, B. O., Subramaniam, S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 99-111.
- Pappin, D. J., Hojrup, P., Bleasby, A. J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*, **3**, 327-332.

- Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., Breard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 852-859.
- Parodi, A. J. (1993). N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*, **3**, 193-199.
- Parro, V., Moreno-Paz, M. (2003). Gene function analysis in environmental isolates: the nif regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7883-7888.
- Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N., Mottram, J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, **6**, 127.
- Pasquau, F., Ena, J., Sanchez, R., Cuadrado, J. M., Amador, C., Flores, J., Benito, C., Redondo, C., Lacruz, J., Abril, V., Onofre, J. (2005). Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **24**, 411-418.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, D. F., Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, **39**, 839-847.
- Perez, J. A., Aragon, Z., Pintero, J. E., del Castillo, A., de Armas, F., Valladares, B. (1999). Validation of a rapid method for extraction of total RNA applied to *Leishmania* promastigotes. *J Parasitol*, **85**, 757-758.
- Pessôa S. B., Barreto, M. P. (1944). Leishmaniose tegumentar americana. *Min. Ed. Saúde. Serv. Documentação*. Rio de Janeiro.
- Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., Reue, K. (2001). Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet*, **27**, 121-124.
- Peters, C., Kawakami, M., Kaul, M., Ilg, T., Overath, P., Aebischer, T. (1997). Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *Eur J Immunol*, **27**, 2666-2672.
- Pimenta, P. F., De Souza, W. (1985). Fine structure and cytochemistry of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Submicrosc Cytol*, **17**, 413-419.
- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Sacks, D. L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol*, **72**, 191-204.
- Pinelli, E., Gebhard, D., Mommaas, A. M., van Hoeij, M., Langermans, J. A., Ruitenbergh, E. J., Rutten, V. P. (2000). Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol*, **92**, 181-189.
- Polacek, D. C., Passerini, A. G., Shi, C., Francesco, N. M., Manduchi, E., Grant, G. R., Powell, S., Bischof, H., Winkler, H., Stoeckert, C. J., Jr., Davies, P. F. (2003). Fidelity and enhanced sensitivity of differential transcription profiles following linear amplification of nanogram amounts of endothelial mRNA. *Physiol Genomics*, **13**, 147-156.
- Pral, E. M., da Moitinho, M. L., Balanco, J. M., Teixeira, V. R., Milder, R. V., Alfieri, S. C. (2003). Growth phase and medium pH modulate the expression of proteinase activities and the development of megasomes in axenically cultivated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote-like organisms. *J Parasitol*, **89**, 35-43.
- Preiss, T., Hentze, M. W. (1999). From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 515-521.

Bibliografía

- Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H., Joiner, K. A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*, **145**, 4311-4316.
- Pupkis, M. F., Coombs, G. H. (1984). Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. *J Gen Microbiol*, **130**, 2375-2383.
- Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M., Alonso, C. (1996). During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology*, **112 (Pt 3)**, 277-284.
- Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., Requena, J. M. (2000). Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*, **110**, 79-91.
- Quijada, L., Soto, M., Requena, J. M. (2005). Genomic DNA macroarrays as a tool for analysis of gene expression in *Leishmania*. *Exp Parasitol*, **111**, 64-70.
- Rab, M. A., Evans, D. A. (1995). *Leishmania infantum* in the Himalayas. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **89**, 27-32.
- Rab, M. A., Frame, I. A., Evans, D. A. (1995). The role of dogs in the epidemiology of human visceral leishmaniasis in northern Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **89**, 612-615.
- Ralton, J. E., McConville, M. J. (1998). Delineation of three pathways of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana*. Precursors from different pathways are assembled on distinct pools of phosphatidylinositol and undergo fatty acid remodeling. *J Biol Chem*, **273**, 4245-4257.
- Ramesh, V., Mukherjee, A. (1995). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **34**, 85-91.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., Larraga, V. (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, **21**, 2474-2484.
- Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J. M., Peris, A., Castillo, J. A., Colmenares, M., Larraga, V. (2008). Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine*, **26**, 333-344.
- Ramos, I., Alonso, A., Peris, A., Marcen, J. M., Abengozar, M. A., Alcolea, P. J., Castillo, J. A., Larraga, V. (2009). Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, **27**, 6695-6703.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1994). Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*, **244**, 461-486.
- Ready, P. D., Croset, H. (1980). Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir from southern France. *Bull Entomol Res*, **70**, 511-523.
- Rees, P. H., Kager, P. A., Ogada, T., Eeftinck Schattenkerk, J. K. (1985). The treatment of kala-azar: a review with comments drawn from experience in Kenya. *Trop Geogr Med*, **37**, 37-46.
- Rees, P. H., Kager, P. A. (1987). Visceral leishmaniasis and postkalaazar dermal leishmaniasis. En: The leishmaniasis in Biology and Medicine. Clinical aspects and control. Peters, W., Killick Kendrick, R. (Ed.). The leishmaniasis in Biology and Medicine Vol. 2, Academic Press, London, pp. 583-615.

- Reference Genome Group of the Gene Ontology Consortium (2009). The Gene Ontology's Reference Genome Project: a unified framework for functional annotation across species. *PLoS Comput Biol*, **5**, e1000431.
- Reguera, R. M., Redondo, C. M., Perez-Pertejo, Y., Balana-Fouce, R. (2007). S-Adenosylmethionine in protozoan parasites: functions, synthesis and regulation. *Mol Biochem Parasitol*, **152**, 1-10.
- Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O., Carvalho, E. M. (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, **31**, 143-148.
- Richter, J. D., Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, **433**, 477-480.
- Ridley, D. S. (1987). Pathology. En: The leishmaniasis in Biology and Medicine. Clinical aspects and control. Peters, W., Killick Kendrick, R. (Ed.). The leishmaniasis in Biology and Medicine Vol. 2, Academic Press, London, pp. 665-696.
- Rioux, J. A., Petter, F., Zahaf, A., Lanotte, G., Houin, R., Jarry, D., Perieres, J., Martini, A., Sarhani, S. (1986). Isolation of *Leishmania major* Yakimoff and Shokhor, 1914 (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) in *Meriones shawi-shawi* (Duvernoy, 1842) (Rodentia-Gerbillidae) in Tunisia. *Ann Parasitol Hum Comp*, **61**, 139-145.
- Rioux, J. A., Lanotte, G. (1990). *Leishmania infantum* as a cause of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **84**, 898.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, **65**, 111-125.
- Robinson, K. A., Beverley, S. M. (2003). Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **128**, 217-228.
- Rochette, A., McNicoll, F., Girard, J., Breton, M., Leblanc, E., Bergeron, M. G., Papadopoulou, B. (2005). Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*, **140**, 205-220.
- Rochette, A., Raymond, F., Ubeda, J. M., Smith, M., Messier, N., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (2008). Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics*, **9**, 255.
- Rochette, A., Raymond, F., Corbeil, J., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (2009). Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*, **165**, 32-47.
- Rodríguez-Gonzalez, I., Marín, C., Vargas, F., Cordova, O., Barrera, M., Gutierrez-Sanchez, R., Alunda, J. M., Sánchez-Moreno, M. (2006). Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Exp Parasitol*, **112**, 44-51.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. J., Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, **430**, 463-467.
- Rogers, M. E., Bates, P. A. (2007). *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behaviour results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*, **3**, e91.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Myler, P. J., Olafson, R. W., Zilberstein, D. (2008a). Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics*, **8**, 1843-1850.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R. W., Zilberstein, D. (2008b). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *Faseb J*, **22**, 590-602.

Bibliografia

- Ruis, H., Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays*, **17**, 959-965.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S. J., Zilberstein, D. (1998). Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, **95**, 9-20.
- Sacci, J. B., Jr., Campbell, T. A., Gottlieb, M. (1990). *Leishmania donovani*: regulated changes in the level of expression of the surface 3'-nucleotidase/nuclease. *Exp Parasitol*, **71**, 158-168.
- Sacks, D. L., Perkins, P. V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**, 1417-1419.
- Sacks, D. L., Hieny, S., Sher, A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania* major promastigotes. *J Immunol*, **135**, 564-569.
- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*, **69**, 100-103.
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., Beverley, S. M. (2000). The role of phosphoglycan in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 406-411.
- Sacks, D. L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*, **3**, 189-196.
- Sacks, D. L., Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, **55**, 453-483.
- Sacks, D. L., Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania* major in mice. *Nat Rev Immunol*, **2**, 845-858.
- Sacks, D. L., Lawyer, P., Kamhawi, S. (2008). The biology of *Leishmania*-sandfly interactions. En: *Leishmania* after the genome. Myler, P. J., Fassel, N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Saeed, A., Bhagabati, N. K., Braisted, J. C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E. A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J. A., Quackenbush, J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol*, **411**, 134-193.
- Safjanova, V. M. (1986). The problems of the classification and phylogeny of the *Leishmania*. En: *Leishmania*, Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologique (Colloque International du CNRS/INSERM, 1984). Rioux, J. A. (Ed.), IMEE, Montpellier, pp. 247-255.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Purification of Nucleic Acids. En: *Molecular Cloning* Vol. 3, pp. E.3.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sato, K., Kawashima, S. (2001). Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem*, **382**, 743-751.
- Saxena, A., Worthey, E. A., Yan, S., Leland, A., Stuart, K. D., Myler, P. J. (2003). Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem Parasitol*, **129**, 103-114.
- Saxena, A., Lahav, T., Holland, N., Aggarwal, G., Anupama, A., Huang, Y., Volpin, H., Myler, P. J., Zilberstein, D. (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, **152**, 53-65.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L. (1994). Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitology*, **109 (Pt 1)**, 23-28.
- Seki, M., Marini, F., Wood, R. D. (2003). POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6117-6126.

- Semiao-Santos, S. J., el Harith, A., Ferreira, E., Pires, C. A., Sousa, C., Gusmao, R. (1995). Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res*, **81**, 235-239.
- Sen, B., Venugopal, V., Chakraborty, A., Datta, R., Dolai, S., Banerjee, R., Datta, A. K. (2007). Amino acid residues of *Leishmania donovani* cyclophilin key to interaction with its adenosine kinase: biological implications. *Biochemistry*, **46**, 7832-7843.
- Shapira, M., McEwen, J. G., Jaffe, C. L. (1988). Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *Embo J*, **7**, 2895-2901.
- Siegel, T. N., Tan, K. S., Cross, G. A. (2005). Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **25**, 9586-9594.
- Singh, B. N., Costello, C. E., Beach, D. H., Holz, G. G., Jr. (1988). Di-O-alkylglycerol, mono-O-alkylglycerol and ceramide inositol phosphates of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*, **157**, 1239-1246.
- Slappendel, R. J. (1988). Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, **10**, 1-16.
- Smith, D. F., Peacock, C. S., Cruz, A. K. (2007). Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*, **37**, 1173-1186.
- Somanna, A., Mundodi, V., Gedamu, L. (2002). In vitro cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms. *Acta Trop*, **83**, 37-42.
- Sopwith, W. F., Debrabant, A., Yamage, M., Dwyer, D. M., Bates, P. A. (2002). Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol*, **32**, 449-459.
- Soto, M., Requena, J. M., Morales, G., Alonso, C. (1994). The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta*, **1219**, 533-535.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Garcia, M., Guzman, F., Patarroyo, M. E., Alonso, C. (1995). Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett*, **48**, 209-214.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Alonso, C. (1996). Organization, transcription and regulation of the *Leishmania infantum* histone H3 genes. *Biochem J*, **318** (Pt 3), 813-819.
- Soto, M., Quijada, L., Alonso, C., Requena, J. M. (1997). Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol*, **90**, 439-447.
- Späth, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J., Beverley, S. M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 9258-9263.
- Späth, G. F., Beverley, S. M. (2001). A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol*, **99**, 97-103.
- Srividya, G., Duncan, R., Sharma, P., Raju, B. V., Nakhasi, H. L., Salotra, P. (2007). Transcriptome analysis during the process of in vitro differentiation of *Leishmania donovani* using genomic microarrays. *Parasitology*, **134**, 1527-1539.
- Steenkamp, D. J. (2002). Thiol metabolism of the trypanosomatids as potential drug targets. *IUBMB Life*, **53**, 243-248.
- Steiger, R. F., Steiger, E. (1976). A defined medium for cultivating *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. *J Parasitol*, **62**, 1010-1011.
- Stein, L. D., Mungall, C., Shu, S., Caudy, M., Mangone, M., Day, A., Nickerson, E., Stajich, J. E., Harris, T. W., Arva, A., Lewis, S. (2002). The generic genome browser: a building block for a model organism system database. *Genome Res*, **12**, 1599-1610.
- Steiner, E., Holzmann, K., Elbling, L., Micksche, M., Berger, W. (2006). Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets*, **7**, 923-934.

Bibliografia

- Stierhof, Y. D., Ilg, T., Russell, D. G., Hohenberg, H., Overath, P. (1994). Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *J Cell Biol*, **125**, 321-331.
- Stierhof, Y. D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol*, **78**, 675-689.
- Sturm, N. R., Simpson, L. (1991). *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6277-6281.
- Sundar, S., Murray, H. W. (1996). Cure of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with amphotericin B lipid complex. *J Infect Dis*, **173**, 762-765.
- Sundstrom, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, **17**, 565-577.
- Suzuki, E., Tanaka, A. K., Toledo, M. S., Lavery, S. B., Straus, A. H., Takahashi, H. K. (2008). Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 362-369.
- Taladriz, S., Hanke, T., Ramiro, M. J., Garcia-Diaz, M., Garcia De Lacoba, M., Blanco, L., Larraga, V. (2001). Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3822-3834.
- Tartoff, K. D., Hobbs, C. A. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Labs Focus*, **9**, 12.
- Ternes, P., Franke, S., Zahringer, U., Sperling, P., Heinz, E. (2002). Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem*, **277**, 25512-25518.
- The GeneDB team, Hertz-Fowler, C., Peacock, C. S. (2002). Introducing GeneDB: a generic database. *Trends Parasitol*, **18**, 465-467.
- Theodor, O. (1936). On the relation of *Phlebotomus papatasi* to the temperature and humidity of the environment. *Bull Entomol Res*, **27**, 653-671.
- Thomas, S., Martinez, L. L., Westenberger, S. J., Sturm, N. R. (2007). A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. *BMC Genomics*, **8**, 133.
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Campbell, D. A., Myler, P. J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics*, **10**, 152.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serres, E. (1993a). Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann Parasitol Hum Comp*, **68**, 104-106.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serres, E. (1993b). Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp*, **68**, 107-108.
- Tibayrenc, M. (1992). *Leishmania*: sex, karyotypes and population genetics. *Parasitol Today*, **8**, 305-306; author reply 306.
- Tripp, C. A., Myler, P. J., Stuart, K. D. (1993). Nucleotide sequence of a minicircle from *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*, **62**, 319-320.
- Turco, S. J., Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, **46**, 65-94.
- Turetz, M. L., Machado, P. R., Ko, A. I., Alves, F., Bittencourt, A., Almeida, R. P., Mobashery, N., Johnson, W. D., Jr., Carvalho, E. M. (2002). Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, **186**, 1829-1834.

- Tusher, V. G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5116-5121.
- Van Gelder, R. N., von Zastrow, M. E., Yool, A., Dement, W. C., Barchas, J. D., Eberwine, J. H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1663-1667.
- Vedel, M., Robert-Gero, M. (1987). Characterization of RNA from *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, **24**, 81-87.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D., Wittinghofer, A. (1999). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, **97**, 635-646.
- Vieira, J., Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, **19**, 259-268.
- Vouldoukis, I., Drapier, J. C., Nussler, A. K., Tselentis, Y., Da Silva, O. A., Gentilini, M., Mossalayi, D. M., Monjour, L., Dugas, B. (1996). Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 253-256.
- Walton, B. C. (1987). American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. En: The leishmaniasis in Biology and Medicine. Clinical aspects and control. Peters, W., Killick Kendrick, R. (Ed.). The leishmaniasis in Biology and Medicine Vol. 2, Academic Press, London, pp. 637-664.
- Warburg, O., Christian, W. (1941). Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem Z*, **310**, 384-421.
- Ward, R. D. (1985). Vector biology and control. En: *Leishmaniasis*. Chang, K. P., Bray, R. S. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 199-212.
- Weise, F., Stierhof, Y. D., Kuhn, C., Wiese, M., Overath, P. (2000). Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci*, **113 Pt 24**, 4587-4603.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., Richardson, C. C. (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem*, **243**, 4543-4555.
- Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K. (2003). Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 360-375, table of contents.
- Wiesgigl, M., Clos, J. (2001). The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol*, **190**, 27-31.
- Yamane, H., Kato, T., Nariuchi, H. (1999). Effective stimulation for IL-12 p35 mRNA accumulation and bioactive IL-12 production of antigen-presenting cells interacted with Th cells. *J Immunol*, **162**, 6433-6441.
- Yoffe, Y., Zuberek, J., Lerer, A., Lewdorowicz, M., Stepinski, J., Altmann, M., Darzynkiewicz, E., Shapira, M. (2006). Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryot Cell*, **5**, 1969-1979.
- Zakai, H. A., Chance, M. L., Bates, P. A. (1998). In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology*, **116 (Pt 4)**, 305-309.
- Zhang, K., Barron, T., Turco, S. J., Beverley, S. M. (2004). The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, **136**, 11-23.
- Zhang, W. W., Matlashewski, G. (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8807-8811.
- Zhang, W. W., Matlashewski, G. (2001). Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol*, **39**, 935-948.

Bibliografia

- Zilberstein, D., Dwyer, D. M. (1988). Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem J*, **256**, 13-21.
- Zilberstein, D., Blumenfeld, N., Liveanu, V., Gepstein, A., Jaffe, C. L. (1991). Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, **45**, 175-178.
- Zilberstein, D., Gepstein, A. (1993). Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH. *Mol Biochem Parasitol*, **61**, 197-205.
- Zilberstein, D., Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 449-470.
- Zilberstein, D. (2008). Physiological and biochemical aspects of *Leishmania* development. En: *Leishmania* after the genome. Myler, P. J., Fassel, N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V., Shapira, M. (2001). Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, **276**, 47922-47929.
- Zuckerman, A., Lainson, R. (1977). *Leishmania*. En: Parasitic protozoa. Kreier, J. P. (Ed.), Academic Press., New York., pp. 66-86.

8

Anexos

ANEXO I.

Reactivos, soluciones y medios de cultivo.

Los compuestos inorgánicos $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HCl (solución al 37% v/v), K_2HPO_4 , KCl , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, Na_2CO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (tiosulfato sódico anhidro), NaCl , NaH_2PO_4 y NaOH , se adquirieron de Merck, y el AgNO_3 y el RbCl_2 de Sigma.

Los alcoholes –isopropanol, etanol, alcohol isoamílico, metanol, glicerol 87% (v/v)-, y los disolventes orgánicos acetona y cloroformo, fueron obtenidos de Merck, mientras que el fenol, con su correspondiente disolución amortiguadora de equilibrado (pH 7,9 con Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 1 mM EDTA), procedía de Sigma. Los compuestos orgánicos que se emplearon en disoluciones reguladoras se obtuvieron de Merck –etilendiaminotetraacetato (EDTA *Titriplex*[®] III y EDTA disódico dihidratado), *Tris*-hidroximetilaminometano (*Tris* base), acetatos sódico y potásico- o de Sigma –HEPES-, y otros compuestos orgánicos –SDS, DMSO, betaína, PMA- de Sigma. El ditiotreitól (DTT) se obtuvo de Sigma y, por otro lado, fue suministrado con la retrotranscriptasa *Superscript*TM III (Invitrogen). El ácido acético glacial, el ácido trifluoroacético, el dietilpirocarbonato (DEPC) y el acetonitrilo se obtuvieron de Merck y la urea, la tiourea, la glicina, la yodoacetamida y el formaldehído se obtuvieron de Sigma.

Los colorantes fueron adquiridos de Merck –azul de bromofenol- o de Sigma -xilén-cianol-, y los compuestos fluorescentes de Promega –bromuro de etidio-, de Merck –azul de Evans-, de Agilent Technologies –*RNA 6000 Nano marker*, *RNA 6000 Dye Concentrate*- o de GE –*Cy3 monoreactive dye*, *Cy5 monoreactive dye*. El antibiótico ampicilina y los galactopiranosidos IPTG (indofeniltiogalactósido) y XGal se adquirieron de Sigma. La sacarosa se obtuvo de USB Corp., la agarosa de Pronadisa, el *Bio-Gel*[®] A2 de BioRad y el gel *RNA 6000 Nano Gel Matrix* de Agilent Technologies.

A continuación se detallan por orden alfabético las soluciones y los kits empleados:

- Acetato sódico 3M pH 5,2. Se conserva a temperatura ambiente.
- ADN de esperma de arenque: ver *Herring Sperm DNA Solution*.
- ADN ligasa del fago T4: ver *T4 DNA ligase*.
- Agua tratada con DEPC: se añade el DPC al 1%, se incuba durante toda la noche y se esteriliza en el autoclave a 120 °C durante 30 min a 1,05 Kg/cm².
- Albúmina de suero bovino (Sigma). Solución *stock* 10 mg/ml. Se conserva a -20 °C.
- Aminoalil-dUTP (Ambion). Solución *stock* comercial a 50 mM.
- Ampicilina (Sigma). Solución *stock* a 50 mg/ml. Se esteriliza por filtración (0,22 µm) y se conserva a -20 °C.
- ARNasa A pancreática (Sigma). Solución *stock* a 10 mg/ml con Tris-HCl 10 mM pH7,5 y 15 mM NaCl. Se calienta la solución a 100 °C durante 15 min y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se conserva a -20 °C.
- *Bam*HI 10 U/µl (Roche). Enzima de restricción de *Bacillus amyloliquefaciens*. Una unidad de *Bam* HI es la actividad enzimática capaz de cortar completamente 1 µg de ADNλ durante una hora a 37 °C en un volumen total de 50 µl de *SuRE/Cut buffer* B. Tampón de conservación: Tris-HCl 10 mM, KCl 300 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól (DTE) 1 mM, polidocanol al 0,01% (v/v), glicerol al 50% (v/v), pH aprox. 7,4. Se conserva a -20 °C.
- Betaína (Sigma). Solución *stock* comercial 5M libre de nucleasas. Se conserva a 4 °C.
- Bromuro de etidio. Ver *Ethidium Bromide*.
- BSA. Ver Albúmina de suero bovino.
- Cianinas. Ver *Cy3* y/o *Cy5*.
- *Citospin Collection Fluid* (ShandonTM). Tinción con Giemsa modificado. Se conserva a temperatura ambiente.
- Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (CIA). Se conserva a 4 °C en oscuridad y se manipula en una cabina extractora.
- *Cy3 Mono-Reactive Dye-Pack* (GE). Se conserva a 4 °C con baja humedad relativa. La solución de trabajo se prepara resuspendiendo todo el contenido de cada tubo en 85 µl de DMSO anhidro. Se conserva en un recipiente con CaCl_2 granulado a -20 °C. Manipular con rapidez para evitar la hidratación.
- *Cy5 Mono-Reactive Dye-Pack* (GE). Se conserva a 4 °C con baja humedad relativa. La solución de trabajo se prepara resuspendiendo todo el contenido de cada tubo en 85 µl de DMSO anhidro. Se conserva en un recipiente con CaCl_2 granulado a -20 °C. Manipular con rapidez para evitar la hidratación.
- dATP (Invitrogen). Solución *stock* comercial a 100 mM. Se conserva a -20 °C.
- dCTP (Invitrogen). Solución *stock* comercial a 100 mM. Se conserva a -20 °C.
- *Dephosphorylation buffer* 10X (Roche): Tris-HCl 0,5 M, MgCl_2 50 mM, pH 8,5 (20 °C). Se conserva a -20 °C.
- D-galactosa (Sigma). Solución 50 mM filtrada (0,22 µm).
- dGTP (Invitrogen). Solución *stock* comercial a 100 mM. Se conserva a -20 °C.
- *Diff-Quick*[®] *Stain Solution I* (DADE BEHRING AGTM). Tinción con Giemsa modificado. Se conserva a temperatura ambiente.

Anexo I

- *Diff-Quick® Stain Solution II* (DADE BEHRING AGTM). Tinción con Giemsa modificado. Se conserva a temperatura ambiente.
- *DNA polymerase I, Klenow Fragment* (Invitrogen). 40 U/μl en tampón de conservación K₂PO₄ pH 7,0, KCl 100 mM, DTT 1 mM y glicerol al 50% (v/v). Se conserva a -20 °C.
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (BioRad). Solución stock al 10%. Se conserva a temperatura ambiente.
- dTTP (Invitrogen). Solución *stock* comercial a 100 mM. Se conserva a -20 °C.
- *EcoRI* 10 U/μl (Roche). Una unidad de *EcoRI* es la actividad enzimática que corta completamente 1 μg de ADN λ en 1h a 37 °C en un volumen total de 50 μl en tampón *SuRE/Cut buffer H*. Tampón de conservación: Tris-HCl 10 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, Triton X-100 al 0,2% (v/v), glicerol al 50% (v/v), pH aprox. 7,2. Se conserva a -20 °C.
- EDTA 0,5 M pH 8,0. Para preparar esta solución *stock*, se calienta a 40-60 °C en agitación hasta su completa disolución el volumen necesario de solución NaOH 1M para que se disuelva bien, se ajusta el pH con la misma solución de NaOH y se enrasa con agua milliQ.
- Electroforesis capilar de alta resolución de ARN. (1) Descontaminación de los electrodos: se depositan lentamente 350 μl de *RNAse ZAP* en uno de los pocillos de un limpiador de electrodos suministrado en el kit; se sitúa en el bioanalizador y se deja actuar durante 1 min (a temperatura ambiente); se repite el procedimiento cargando otro limpiador del electrodo con agua libre de nucleasas. (2) Preparación del *Gel Dye Mix*: se centrifugan 400 μl de *RNA 6000 Nano Gel Matrix* en una de las columnas suministradas a 1.500g durante 10 min para filtrarlo; se añaden 130 μl de *RNA Dye Concentrate* a 2 μl de la solución matriz de gel concentrada y se agita vigorosamente durante 5 min. Se puede conservar el *Gel Dye Mix* a 4 °C protegido de la luz durante no más de una semana desde su preparación. (3) Carga del Gel: se cargan 9 μl de *Gel Dye Mix* con el dispositivo *Chip Priming Station* en los tres pocillos indicados en el *chip*, seguidamente 5 μl de *RNA 6000 Nano Marker* en cada uno de los pocillos restantes y, a continuación, el marcador de tamaño *RNA 6000 Ladder* (precalentado a 70 °C durante 2 min y enfriado a 4 °C) en el pocillo indicado. Por último, se carga 1 μl de muestra (en agua libre de nucleasas) en todos los pocillos; en caso de que no se utilicen todos, se rellenan los restantes con 1 μl de agua. Por último, se sitúa el *chip* en el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* y se inicia el programa correspondiente al análisis de ARN.
- *Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml* (Promega). Solución *stock* comercial.
- *Expand Long Template Buffer 1*. Solución *stock* comercial 10X: 17,5 mM MgCl₂ y los demás componentes no están especificados. Se conserva a -20 °C.
- *Expand Long Template Buffer 2*. Solución *stock* comercial 10X: 27,5 mM MgCl₂ y los demás componentes no están especificados. Se conserva a -20 °C.
- *Expand Long Template PCR System* (Roche). Componentes utilizados: ver *Expand Long Template Enzyme Mix*, *Expand Long Template Buffer 1 y 2*. *Expand Long Template Enzyme Mix*. ADN polimerasas *Taq y Tgo* 5 U/μl (no definida la unidad por el fabricante) en Tris-HCl 20 mM pH 7,5 a 25 °C, KCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Nonidet P40 al 0,5% (v/v), Tween 20 al 0,5% (v/v), glicerol al 50% (v/v). Se conserva a -20 °C.
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (PCIA). Se centrifuga la mezcla a 2000g durante 10 min. Se conserva a 4 °C en oscuridad y se manipula en una cabina extractora.
- Forbol 12-miristato 13-acetato (Sigma). Solución stock a 100 μg/ml en DMSO. Se conserva a 4 °C.
- Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (New England BioLabs). Una unidad es la cantidad de enzima que convierte 10 nmoles de dNTPs en su forma ácida e insoluble en 30 min a 37 °C con tampón NEBuffer 2 1X, 33 μM dNTPs incluyendo [³H]-dTTP y 70 μg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Tampón de conservación: Tris-HCl 25 mM, DTT 1mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 50% (v/v), pH7,4. Se conserva a -20 °C.
- Fragmento Klenow. Ver *DNA polymerase I, Klenow Fragment*.
- Glicerol al 87% (Merck) estéril. Se esteriza en el autoclave a 120 °C durante 30 min a 1,05 Kg/cm².
- Glucógeno 5 μg/μl (Ambion). Se conserva a -20 °C.
- *Herring Sperm DNA Solution* (Invitrogen). Se conserva a -20 °C.
- HIFBS. Ver: Suero bovino fetal inactivado por calor.
- *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). *Suspension buffer*: Tris-HCl 50 mM, 10 mM EDTA, pH 8,0; volumen total: 25 ml. ARNasa A, 2,5 mg (concentración final en *Suspension buffer*: 0,1 mg/ml). *Lysis buffer*: NaOH 0,2 M, SDS 1%. *Binding buffer*: hidrocloreuro de guanidinio 4 M y acetato potásico 0,5 M, pH 4,2. *Wash buffer I*: hidrocloreuro de guanidinio 5M, Tris-HCl 20 mM, pH 6,6, etanol al 33% (v/v); el etanol se añade antes del primer uso. *Wash buffer II*: NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, pH 7,5, etanol al 20% (v/v); el etanol se añade antes del primer uso. *Elution buffer*: Tris-HCl 10 mM pH 8,5. En primer lugar, se centrifuga un volumen de hasta 4 ml de cultivo de bacterias a 15.000g y se resuspende en 250 μl de solución *Suspension buffer* con la ARNasa añadida. Se lleva a cabo la lisis añadiendo 250 μl de la solución *Lysis buffer*, mezclando por inversión seis veces e incubando a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se neutraliza la lisis añadiendo 350 μl de *Binding buffer* preenfriado, mezclando seis veces por inversión e incubando a 4 °C durante 5 min. Se centrifuga a 15.000g durante 10 min, se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 15.000g durante 1 min en una columna de fibra de vidrio suministrada en el kit. A continuación, se realizan dos lavados, uno con 700 μl de *Wash buffer I* y otro con 500 μl de *Wash buffer II*; el primer lavado es opcional en este caso, porque los plásmidos utilizados en este estudio son de alto número de copias, aunque se realizaron ambos lavados. Por último, se centrifuga una vez más para eliminar

- los restos de etanol y se eluye en 100 μ l de *Elution buffer*. Todas las soluciones se conservan a temperatura ambiente, excepto la primera una vez que se haya añadido la ARNasa, que se debe conservar a 4 °C.
- *HindIII* (Roche). Enzima de restricción de *Haemophilus influenzae*. Una unidad de esta enzima es la cantidad que corta completamente 1 μ g de ADN λ a 37 °C durante 1 h en *SuRE/Cut buffer B* en un volumen total de 25 μ l. Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 10 mM, NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, polidocanol al 0,01%, glicerol al 50 % (v/v), pH aprox. 7,5. Se conserva a -20 °C.
 - *illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GE). Composición de las soluciones *Sample Buffer*, *Reaction Buffer* y *Enzyme Mix* no especificada por el fabricante. Se almacenan todos los componentes a -80 °C.
 - IPTG (Sigma). Solución *stock* 50 mM. Se esteriliza por filtración (0,22 μ m) y se conserva a -20 °C.
 - *iQTM SYBR[®] Green Supermix* (Bio-Rad). Solución *stock* comercial 2X: KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM pH 8,4, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración de 0,4 mM cada uno), *iTaq DNA polymerase* 5 U/ μ l, MgCl₂ 6 mM, SYBR Green I, fluoreseína 20 nM y estabilizadores. Se conserva a -20 °C; es fotosensible.
 - *JETSTART 2.0 Plasmid Midiprep Kit* (Genomed). Solución E1 (resuspensión): Tris 50 mM, EDTA 10 mM, ajustada a pH 8,0 con HCl (se conserva a temperatura ambiente). Se añade la ARNasa liofilizada que se suministra en el kit a la solución E1 antes de usarla y se conserva a 4 °C a partir de entonces; la concentración final de ARNasa es 100 μ g/ml. Solución E2 (lisis alcalina): NaOH 200 mM, SDS 1% (se conserva a temperatura ambiente). Solución E3 (neutralización): solución de acetato potásico 3,1 M ajustada a pH 5,5 con ácido acético (se conserva a temperatura ambiente). Solución E4 (solución de equilibrado de la columna): NaCl 600 mM, acetato sódico 100 mM, Triton X-100, ajustada a pH 5,0 con ácido acético (se conserva a temperatura ambiente). Solución E5 (lavado): NaCl 800 mM, acetato sódico 100 mM, ajustado a pH 5,0 con ácido acético (se conserva a temperatura ambiente). Solución E6 (elución): NaCl 1,25 M, Tris 100 mM, ajustada a pH 8,5 con HCl (se conserva a temperatura ambiente). Procedimiento: preparar un cultivo de 25 ml en medio LB; equilibrar la columna con 10 ml de solución E4; centrifugar el cultivo, eliminar el sobrenadante completamente y resuspender el sedimento en 4 ml de solución E1 con ARNasa; añadir 4 ml de solución E2 para la lisis durante 5 min y neutralizar inmediatamente añadiendo 4 ml de solución E3 (mezclar por inversión del tubo); centrifugar a 12.000g durante 10 min; cargar el sobrenadante en la columna y dejar que fluya por gravedad; lavar dos veces con 10 ml de solución E5; eluir el plásmido con 5 ml de solución E6; precipitar con 0,7 volúmenes de isopropanol y centrifugar a 4 °C a 12.000g durante 30 min; lavar con etanol al 70% y volver a centrifugar; secar el sedimento al aire y resuspender en agua *milliQ*.
 - Kanamicina (Sigma). Solución *stock* 25 mg/ml. Se esteriliza por filtración (0,22 μ m) y se conserva a -20 °C.
 - LB. Ver Medio LB.
 - LB-agar. Ver Medio LB-agar.
 - Marcador de masa λ -*Hind III DNA* (New England BioLabs). Solución *stock* comercial a 1 μ g/ μ l en TE. Preparación de la solución de trabajo: 200 ng/ μ l en tampón de carga 1X. Se conserva a -20 °C. Antes de usar, se desnaturaliza calentando a 95 °C durante 3 min y se enfría en hielo, así como las muestras que se desea cuantificar. Fragmentos de ADN del fago lambda digerido con Hind III de 23.130 pb (15 x 10⁶ Da), 9.416 pb (6,12 x 10⁶ Da), 6.557 pb (4,26 x 10⁶ Da), 4.361 pb (2,83 x 10⁶ Da), 2.322 pb (1,51x 10⁶ Da), 2.027 pb (1,32 x 10⁶ Da), 564 pb (0,37 x 10⁶ Da) y 125 pb (0,08 x 10⁶ Da).
 - Marcador de tamaño molecular *IKb DNA Ladder* (Invitrogen). Solución *stock* comercial a 1 μ g/ μ l en STE; fragmentos de ADN de 12.216 pb, 11.198 pb, 10.180 pb, 9.162 pb, 8.144 pb, 7.126 pb, 6.108 pb, 5.090 pb, 4.072 pb, 3.054 pb, 2.036 pb, 1636 pb, 1018 pb, 517/506 pb, 396 pb, 344 pb, 298 pb, 220 pb, 201 pb, 154 pb, 134 pb y 75 pb. Se conserva a -20 °C y la solución de trabajo (a 200 ng/ μ l con tampón de carga de ácidos nucleicos a 1X) a 4 ó -20 °C.
 - Marcador *RNA 6000 Ladder* (Agilent). 25 b, 200 b, 1000 b, 4000 b, 6000 b. Se conserva a -80 °C.
 - Medio LB: triptona peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l. Se esteriliza en el autoclave a 120 °C durante 30 min a 1,05 Kg/cm². Se conserva a temperatura ambiente.
 - Medio LB-agar: con 15 g/l de agar. Se esteriliza en el autoclave a 120 °C durante 20 min a 1,05 Kg/cm². Se conserva a temperatura ambiente.
 - Medio RPMI 1640 (Cambrex, Biwhittaker). Composición: Ca(NO₃)₂·4H₂O 100 mg/l, KCl 400 mg/l, MgSO₄·7H₂O 100 mg/l, NaCl 6,4 g/l, NaHCO₃ 1 g/l, Na₂HPO₄ 800 mg/l, D-glucosa 2g/l, glutatión reducido 1 g/l, HEPES 5 mg/l, rojo fenol 5 mg/l, L-arginina 24 mg/l, L-asparagina 50 mg/l, ácido L-aspártico 20 mg/l, L-cisteína 50 mg/l, L-glutamina 300 mg/l, ácido L-glutámico 20 mg/l, glicina 10 mg/l, L-histidina 15 mg/l, L-hidroxiprolina 20 mg/l, L-isoleucina, 50 mg/l, L-leucina, 50 mg/l, L-cisteína 40 mg/l, L-metionina 15 mg/l, L-fenilalanina 15 mg/l, L-prolina 20 mg/l, L-serina 30 mg/l, L-treonina 20 mg/l, L-triptófano 5 mg/l, L-tirosina 20 mg/l, L-valina 20 mg/l, D-biotina 0,20 mg/l, D-pantotenato de calcio 0,30 mg/l, cloruro de colina 3 mg/l, ácido fólico 1 mg/l, inositol 35 mg/l, nicotinamida 1 mg/l, ácido *p*-aminobenzoico 1 mg/l, piridoxal 1 mg/l, riboflavina 0,20 mg/l, tiamina 1 mg/l, vitamina B12 5 μ g/l. Se conserva a 4 °C.
 - Medio SOC (suministrado con *ELECTRO MAXTM DH10BTM Cells* de Invitrogen): triptona peptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM. Solución comercial estéril. Se conserva a temperatura ambiente.

Anexo I

- Medio TB: se prepara una solución de bacto-triptona 13,3 g/l, 26,7 g/l extracto de levadura y glicerol 0,4% (v/v); se esteriliza en el autoclave a 120 °C durante 30 min a 1,05 Kg/cm². Se prepara otra añade a la primera solución con una razón de volumen 9:1 cuando ambas estén por debajo de 60 °C. Se conserva a temperatura ambiente.
- Medio ϕ : triptona peptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,6 g/l, KCl 0,37 g/l, pH 7,6. Se añaden en el momento de usar 0,02 volúmenes de MgSO₄ 1M estéril (filtro 0,22 μ m). Se esteriliza en el autoclave a 120 °C durante 30 min a 1,05 Kg/cm². Se conserva a temperatura ambiente.
- Melibiosa inmovilizada en agarosa (Sigma). Se conserva a 4 °C. Producto descatalogado en la actualidad.
- *MessageAmp™ aRNA Amplification Kit* (Ambion). Los reactivos para la amplificación se conservan a -20 °C y los componentes para la purificación del ADNc y el ARNa o el ARNaa se almacenan a temperatura ambiente. No se especifica la composición de los tampones de reacción (10X First Strand Buffer), la concentración de los dNTP en la mezcla (*dNTP mix*), la composición de la solución inhibidora de ARNasas (*RNase Inhibitor*), del tampón de reacción para la síntesis de la segunda hebra del ADNc (*10X Second Strand Buffer*), el tampón de transcripción *in vitro* (*T7 10X Reaction Buffer*) ni la composición de las mezclas enzimáticas (*ArrayScript*, *RNase H*, *DNA polymerase* y *T7 Enzyme Mix*), así como de las soluciones utilizadas en los procesos de purificación. En primer lugar, se mezcla 1 μ l de *T7 Oligo (dT) Primer* con la muestra de ARN total en un volumen final de 12 μ l, se desnaturaliza a 70 °C durante 10 min, se enfría a 4 °C rápidamente y se añaden los componentes para la reacción de retrotranscripción: 2 μ l de *10X First Strand Buffer*, 4 μ l de *dNTP mix*, 1 μ l de *RNase Inhibitor* y 1 μ l de *Array Script*; se incuba a 42 °C durante 2 h. A continuación, se realiza la degradación del ARN simultánea a la síntesis de la segunda hebra del ADNc: se añaden 63 μ l de agua suministrada en el kit (*Nuclease-free Water*), 10 μ l de *10X Second Strand Buffer*, 4 μ l de *dNTP mix*, 2 μ l de *DNA polymerase* y 1 μ l de *RNase H*; se incuba a 16 °C durante 2 h. Para purificar el ADNc, se añaden 250 μ l de tampón de unión (*Binding Buffer*), se deposita la mezcla en una columna suministrada en el kit (*cDNA Filter Cartridge*) y se centrifuga a 10.000g durante 1 min; se lava con 500 μ l de tampón de lavado (*Wash Buffer*) durante 1 min a 10.000g, se vuelve a centrifugar para eliminar los restos de etanol y se eluye dos veces con 10 μ l de *Nuclease Free Water* precalentada a 55 °C, dejando reposar durante 2 min antes de la centrifugación. La transcripción *in vitro* se realiza añadiendo a todo el volumen de muestra 4 μ l de cada uno de los siguientes componentes: *T7 dATP Solution* 75 mM, *T7 dCTP Solution* 75 mM, *T7 dGTP Solution* 75 mM, *T7 dUTP Solution* 75 mM, *T7 10X Reaction Buffer* y *T7 Enzyme Mix*, se incuba a 37 °C durante 14 h. Por último, se purifica el ARNa del siguiente modo: se lleva la mezcla a 100 μ l con agua *Nuclease Free Water*, se añaden 350 μ l de *aRNA Binding Buffer* y 250 μ l de etanol absoluto, se mezcla y se transfiere lo antes posible a una columna *aRNA Filter Cartridge*; se centrifuga del mismo modo que en la purificación del ADNc, se realiza un lavado con 650 μ l de *Wash Buffer*, se centrifuga para eliminar los restos de etanol y se eluye con 100 μ l de agua *Nuclease Free Water* precalentada a 60 °C. El ARNa se conserva a -80 °C. Para realizar una segunda ronda de amplificación, se mezcla el ARNa (2 μ g como máximo) con 2 μ l de *Second Round Primers* en un volumen final de 12 μ l y se desnaturaliza a 70 °C durante 10 min; a continuación, se añaden 2 μ l de *10X First Strand Buffer*, 4 μ l de *dNTP mix*, 1 μ l de *RNase Inhibitor* y 1 μ l de *Array Script* y se incuba a 42 °C durante 2 h. Se degrada el ARN añadiendo 1 μ l de *RNase H* e incubando a 37 °C durante 30 min. Para la síntesis de la segunda hebra del ADNc, se añaden 5 μ l de *T7 Oligo (dT) Primer*, se desnaturaliza a 70 °C durante 10 min (enfriando seguidamente a 4 °C) y se incuba la mezcla durante 2 h a 16 °C tras añadir lo siguiente: 58 μ l de agua *Nuclease Free Water*, 10 μ l de *Second Strand Buffer*, 4 μ l de *dNTP mix* y 2 μ l de *DNA polymerase*. El resto del procedimiento es el mismo que para la primera ronda de amplificación.
- Mezcla antibiótica para cultivo de promastigotes y de la línea celular U937: penicilina 100.000U/ml, estreptomycin 100.000 μ g/ml.
- Mezcla de nucleótidos para síntesis de ADNc marcado. Solución *stock* 25X: dATP, dCTP y dGTP a una concentración de 13,2 mM cada uno, dTTP 5,3 mM y aminoalil-dUTP 7,9 mM. Se conserva a -20 °C.
- Mezcla de nucleótidos para síntesis de ADNc. Solución *stock* 25X: dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración de 13,2 mM cada uno. Se conserva a -20 °C.
- Miniprep. Ver *High Pure Plasmid Isolation Kit*, *JETSTART 2.0 Plasmid Midiprep Kit* o *PerfectPrep Plasmid 96 Vac, Direct Bind* (Eppendorf).
- NEBuffer 2 10X (New England BioLabs): Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5M, MgCl₂ 0,1 M, DTT 10 mM, pH 7,9. Se conserva a -20 °C.
- N-lauroil sarcosina (Sigma). Se prepara una solución al 10% y se conserva a temperatura ambiente.
- Nucleótidos. Ver *PCR Nucleotide Mix*, mezcla de nucleótidos para síntesis de ADNc, mezcla de nucleótidos para síntesis de aminoalil-ADNc o dATP, dCTP, dGTP, dTTP, aminoalil-dUTP.
- Oligonucleótidos (purificados por HPLC). Suministrados por STABVida-Ecogen. Se resuspenden en agua *milliQ* libre de nucleasas a 100 pmol/ μ l, se preparan alícuotas como soluciones *stock* a 10 pmol/ μ l y se almacenan a -20 °C.
- Oligonucleótidos al azar. Ver *Random Primers*.
- PBS. Solución *stock* 10X. NaCl 1,38 M, KCl 30 mM, Na₂HPO₄ 81 mM, KH₂PO₄ 15 mM. Se ajusta el pH a 6,8. Se conserva a temperatura ambiente.

Expresión génica diferencial en *Leishmania infantum*

- *PCR Nucleotide Mix* (Roche). Solución *stock* comercial dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración de 10 mM cada uno. Se conserva a -20 °C.
- *PerfectPrep Plasmid 96 Vac, Direct Bind* (Eppendorf). No se facilita la composición de las soluciones. En primer lugar, se centrifuga la placa con los cultivos bacterianos a 1900g durante 5 min y se elimina completamente el sobrenadante. Se añaden a cada pocillo 150 µl de solución 1 (previa adición de la solución de ARNasa proporcionada en el kit) y se resuspende el sedimento completamente, tras lo cual se añaden 150 µl de solución 2 (lisis), que se mezcla por inversión durante 20-30 s. Se añaden otros 150 µl de solución 3 (neutralización) a cada pocillo y se vuelve a mezclar. Se depositan las muestras lisadas en una placa *Filter Plate A* y se aplica el vacío gradualmente hasta un máximo de -70 KPa durante 5 min, se retira la placa *Filter Plate A* de la bomba de vacío y se sustituye por la placa *Filter Plate DB*. Se añaden 300 µl de *Binding Buffer* y se vuelve a aplicar el vacío. Se lava con 400 µl/pocillo de *Purification Solution* (se prepara inicialmente añadiendo etanol al 60%) y se sustituye la placa de filtros por la placa *Collection Plate* y se eluye con 70 µl de solución *Elution Buffer* incubando 2 min a temperatura ambiente y aplicando de nuevo el vacío.
- *Permout*[®] (Fisher Scientific). Se conserva a temperatura ambiente.
- Proteínasa K (Sigma). Solución *stock* 20 mg/ml. Se conserva a -20 °C.
- *QIAquick*[®] *PCR Purification Kit* (QIAGEN). Contiene la solución PB, que contiene sales caotrópicas para la unión del ADN a la columna, con un indicador que se añade opcionalmente a la solución para comprobar si el pH es óptimo para la unión, la solución de lavado PE (composición no especificada por el fabricante) y la solución de elución EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). Se añaden 5 volúmenes de *Buffer PB* por volumen de mezcla de PCR y se centrifuga en una de las columnas suministradas en el kit a 15.000g durante 1 min. Se realizan dos lavados con 750 µl de *Buffer PE*, se centrifuga de nuevo para eliminar los restos de etanol y se eluye con 35-50 µl de *Buffer EB*. Todos los componentes se mantienen a temperatura ambiente.
- *Random Primers 3* µg/µl (Invitrogen). Se conservan a -20 °C.
- *Ready Prep 2-D Cleanup Kit* (BioRad). No se especifica la composición de las soluciones que componen el kit. Se almacena a temperatura ambiente todo menos la solución de lavado 2, que se conserva a -20 °C; la solución de lavado 1 se debe enfriar a -20 °C durante 1 h antes de ser usada.
- *RNA 6000 Ladder*. ver Marcador *RNA 6000 Ladder*. Ver Electroforesis capilar de alta resolución de ARN. Antes de usar, se precalienta la alícuota que se va a utilizar a 70 °C durante 2 min y se enfría a 4 °C. Se conserva a -80 °C.
- *RNA 6000 Nano Gel Matrix*. Ver Electroforesis capilar de alta resolución de ARN. Se conserva a 4 °C.
- *RNA 6000 Nano Marker* (Ambion). Ver Electroforesis capilar de alta resolución de ARN. Indica la entrada de la muestra al fotodetector en la electroforesis capilar. Se conserva a 4 °C.
- *RNA Dye Concentrate*. Ver Electroforesis capilar de alta resolución de ARN. Se conserva a 4 °C.
- *RNAse ZAP* (Ambion). Ver Electroforesis capilar de alta resolución de ARN. Solución de descontaminación del electrodo. Se conserva a temperatura ambiente.
- *RNeasy*[®] *Mini Kit* (Qiagen). La composición de las soluciones no ha sido especificada por el fabricante. Se conservan todos los componentes a temperatura ambiente. Se ajusta la muestra de ARN (100 µg como máximo) a un volumen de 100 µl con solución tampón RLT, se añaden 250 µl de etanol absoluto, se mezcla con la pipeta, se añade todo el volumen a la columna y se centrifuga a 15.000g durante 1 min. Se realizan lavados con solución RPE (a la que se añade previamente 4 volúmenes de etanol) centrifugando del mismo modo. Se centrifuga de nuevo sin añadir solución de lavado y se eluye con 30-50 µl de agua libre de nucleasas suministrada con el kit.
- RPMI 1640. Ver Medio RPMI 1640.
- *Sau3AI 4 U/µl* (Roche). Enzima de restricción de *Staphylococcus aureus*. Se define una unidad de esta enzima como la actividad enzimática capaz de cortar completamente 1 µg de ADNλ durante 1 h a 37 °C en un volumen total de 25 µl de *SuRE/Cut buffer A*. Tampón de conservación: Tris-HCl 20 mM, NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, polidocanol al 0,01% (v/v), glicerol al 50% (v/v), pH aprox. 7,5. Se conserva a -20 °C.
- *Shrimp Alkaline Phosphatase 10 U/µl* (Roche). Una unidad de SAP se define como la actividad enzimática que hidroliza 1 µmol de 4-nitrofenil fosfato en 1 minuto a 37 °C en tampón glicina/NaOH. Tampón de conservación: Tris-HCl 25 mM pH 7,6, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, glicerol al 50%. Se conserva a -20 °C.
- *SmaI* (Roche). Enzima de restricción de *Serratia marcescens*. Una unidad de esta enzima es la cantidad que corta completamente 1 µg de ADN λ a 25 °C durante 1 h en *SuRE/Cut buffer A* en un volumen total de 25 µl. Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 20 mM, NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, polidocanol al 0,01% (v/v), glicerol al 50% (v/v), pH aprox. 7,5. Se conserva a -20 °C.
- SOC. Ver Medio SOC.
- Solución de acrilamida:bisacrilamida al 30% (37,1:1) (BioRad).
- Solución de congelación de promastigotes y células de la línea U937: DMSO al 10% en HIFBS.
- Solución de lisis de células U937 para el aislamiento de promastigotes: SDS al 0,1% en RPMI 1640).
- Solución de lisis para ADN genómico (solución de trabajo): Tris-HCl 10 mM pH 9,5, EDTA 0,1 M pH 8,0, SDS al 2%, ARNasa A pancreática 20 µg/ml, proteínasa K 0,1 mg/ml. Se conserva a temperatura sin la ARNasa A, la proteínasa K y el SDS, que se añaden en el momento de uso en este orden.
- Solución matriz (Sigma). Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico 3g/l en solución para MALDI.

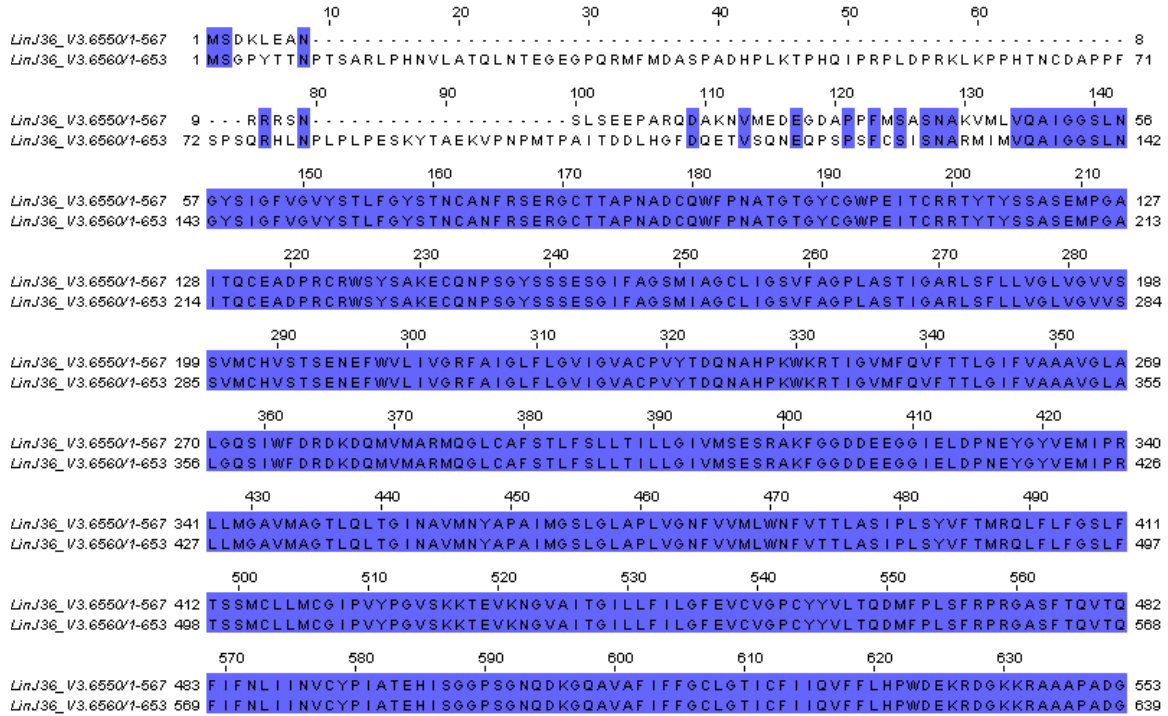
Anexo I

- Soluciones de sacarosa al 20% y al 40% en STE. Una vez que se ha disuelto bien la sacarosa, se esteriliza por filtración (0,22 µm). Se conserva a temperatura ambiente.
- STE. Solución *stock* 10X: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA. Se conserva a -20 °C.
- Suero bovino fetal inactivado por calor. Se incuba a 56 °C durante 1 h, se deja enfriar, se divide en alícuotas, se esteriliza por filtración (0,22 µm) y se conserva a -20 °C.
- *Superscript[®] III Direct cDNA Labeling System* (Invitrogen). Todos los componentes se almacenan a -20 °C. El método de marcaje del ADNc utilizado es indirecto, aunque se han usado algunos componentes de este kit: la enzima *Superscript[®] III*, suministrada a 400 U/µl en una solución de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, NP-40 al 0,01% (v/v) y glicerol al 50% (v/v); el tampón de reacción 5X First-Strand Buffer, solución de Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM; el DTT 0,1 M; y el agua tratada con DEPC.
- *SuRE/Cut buffer A* 10X (Roche). Tris-acetato 33 mM, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM y ditiotreititol 0,5 mM, pH 7,9 a 37 °C. Se conserva a -20 °C.
- *SuRE/Cut buffer B* 10X (Roche). Tris-HCl 100 mM, NaCl 1M, MgCl₂ 50 mM y 10 mM β-mercaptoetanol, pH 8,0 a 37 °C. Se conserva a -20 °C.
- *SuRE/Cut buffer H* 10X (Roche). Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM. Se conserva a -20 °C.
- *T4 DNA ligase* 400 U Weiss/µl (Invitrogen). Una unidad de ligación de extremos cohesivos es la cantidad de enzima que se requiere para producir un 50% de ligación de fragmentos Hind III de ADNλ durante 30 min a 16 °C en 20 µl a una concentración 0,12 µM de extremos 5'. Una unidad Weiss (de intercambio ATP-PP) equivale a 67 unidades de ligación de extremos cohesivos (Weiss y col., 1968). Tampón de conservación: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, BSA 200 µg/ml, glicerol al 50%. Se conserva a -20 °C.
- *T4-DNA Ligase Buffer* 10X (New England BioLabs). Tris-HCl 0,5 M, MgCl₂ 0,1 M, DTT 0,1 M, ATP 10 mM, BSA 250 µg/ml, pH 7,5 a 25 °C. Se conserva a -20 °C.
- TAE 50X. Solución *stock* de Tris-acetato EDTA: Tris-base 2 M, ácido acético glacial al 5,7% (v/v) y EDTA 50 mM, pH 8,0. Se conserva a temperatura ambiente.
- Tampón de *Bam*HI: ver *SuRE/Cut buffer B* 10X.
- Tampón de carga de ADN. Solución *stock* 10X. EDTA 10 mM pH 8,0, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,1%, xilen-cianol 0,1%. Se conserva a 4 °C o a -20 °C.
- Tampón de carga de proteínas (es 5X, ponerlo; a 1X es Tris-HCl 50 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,1%, glicerol al 1%).
- Tampón de carga para ácidos nucleicos (*Loading buffer*). Solución *stock* 10X: azul de bromofenol al 0,25%, xilén cianol al 0,25%, EDTA 10 mM pH 8,0 y glicerol al 30%. Se conserva a 4 ó -20°C.
- Tampón de defosforilación. Ver *Dephosphorylation buffer*.
- Tampón de *Eco*RI: ver *SuRE/Cut buffer H* 10X.
- Tampón de electroforesis para PAGE-SDS. Solución *stock* 10X (sin SDS): Tris base 0,2 M, glicina 1,5 M. En el momento de uso, se añade SDS al 0,1% a la solución diluida a 1X.
- Tampón de equilibrado (Tris-acetato 0,12M pH 7,0, SDS al 5%, urea 6M, glicerol al 30%).
- Tampón de *Sau*3AI. Ver *SuRE/Cut buffer A* 10X.
- TB. Ver Medio TB.
- TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA. Se conserva a temperatura ambiente.
- TEMED (NNNN-tetrametilendiamina) se obtuvo de USB Corp (Cleveland, Estados Unidos).
- Tfb I. RuCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%. Se ajusta el pH 5,8 con ácido acético y se esteriliza por filtración (0,22 µm). Se conserva a temperatura ambiente.
- Tfb II. RuCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, MOPS 10 mM, glicerol 15%. Se ajusta el pH 6,8 con una solución de NaOH 1M y se esteriliza por filtración (0,22 µm). Se conserva a temperatura ambiente.
- Tripsina porcina modificada (Promega). Se conserva a -20 °C.
- Tripsina-verseno: Trypsin-versene (Cambrex,). Composición: tripsina 0,25% (p/v) estéril, EDTA 0,5 mM, filtrado (0,22 µm). Se conserva a -20 °C.
- Tris-HCl 1M pH 9,5. Se conserva a temperatura ambiente.
- *TRIzol[®] Reagent* (Invitrogen). Se conserva a 4 °C y se manipula en una cabina extractora.
- XGal. Solución *stock* a 20 mg/ml (2%) en DMSO. Se esteriliza por filtración (0,22 µm) y se conserva a -20 °C.
- *96 Well PCR Purification Kit* (*Telechem*). Todos los componentes (las dos soluciones, las placas *SuperFilter800* –no contienen fibra de vidrio; no especificado- y las placas colectoras) se almacenan a temperatura ambiente. Composición de las soluciones (*Binding Buffer* y *Wash Buffer*) no especificada por el fabricante. Se añaden 500 µl de *Binding Buffer* a la placa con los filtros y se añaden rápidamente los 45 µl del producto de PCR (una alícuota de 5 µl fue comprobada mediante electroforesis), mezclando rápidamente con la pipeta multicanal (se recomienda realizar las mezclas de 4 en 4 columnas como máximo). Se aplica vacío para que pase todo el volumen a través de la columna. Se lava una vez con 800 µl y dos veces con 100 µl de *Wash Buffer*. Se sitúa debajo una placa colectora y se centrifuga a 500g durante 5 min. Se eluye con Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (se incuba 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga del mismo modo).

ANEXO II

Oligonucleótidos para los análisis de qRT-PCR.

A



B

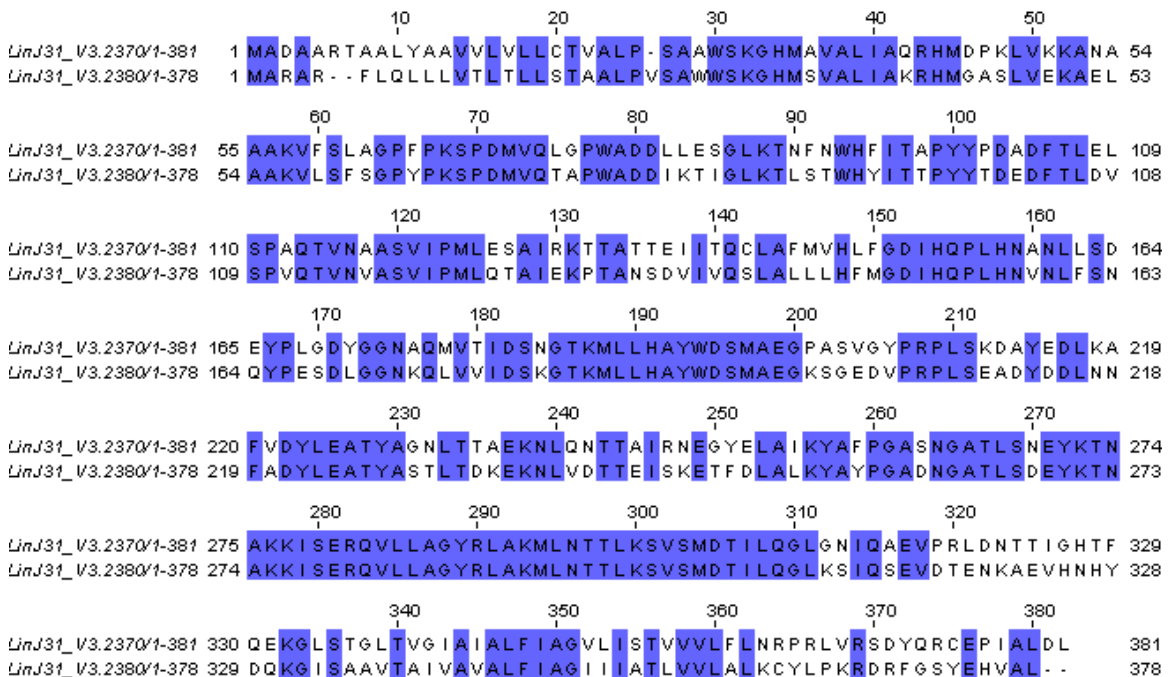


Figura A1. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de copias en tándem de genes que difieren en el extremo N-terminal o en zonas internas. (A) GT. (B) 3'NT/Nasa.

ANEXO III

Construcción de los *microarrays* genómicos de *L. infantum*.

GENOTECA COMPLETA DE *L. infantum*

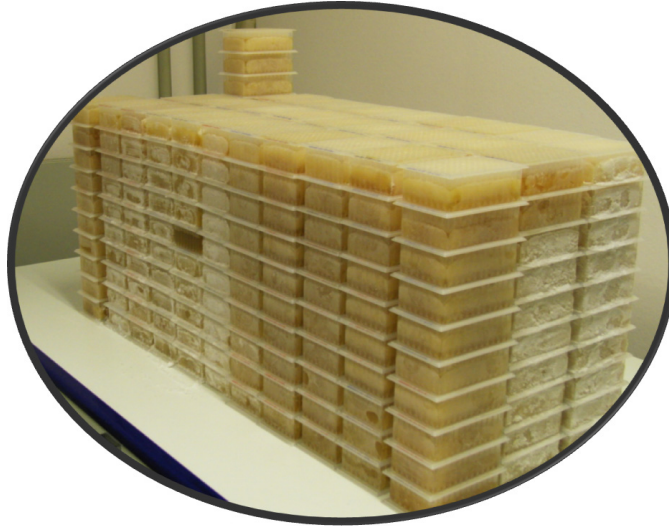


Figura A2. Genoteca completa de *L. infantum* para la construcción de *microarrays* de ADN.

ELECTROFORESIS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

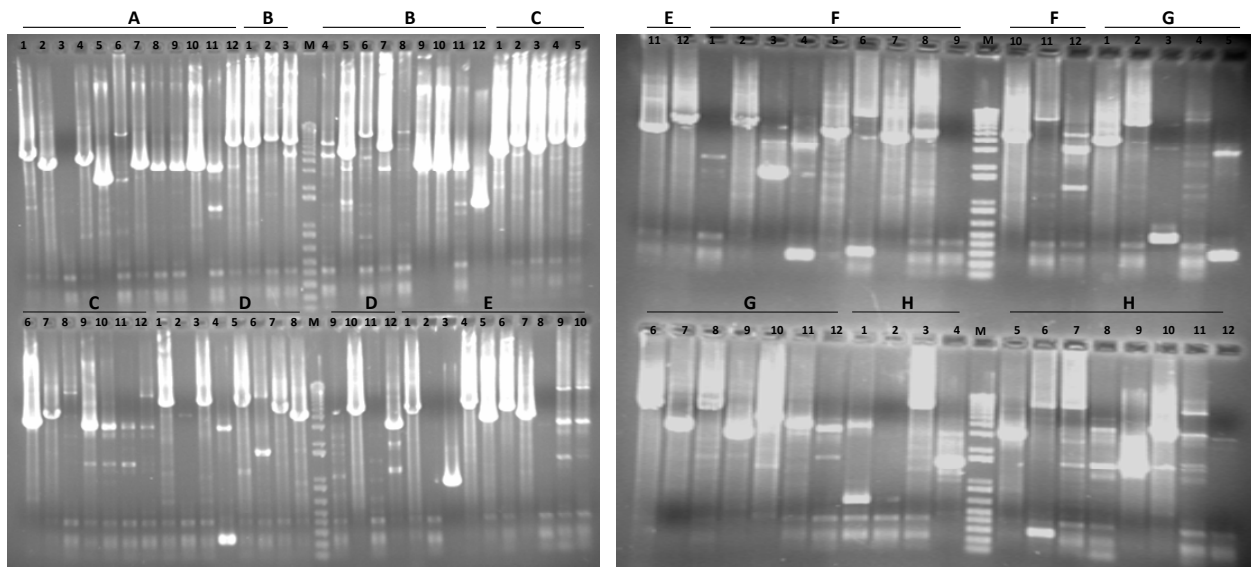


Figura A3. Electroforesis en gel de agarosa convencional de los insertos de la genoteca amplificados por PCR. Placa Lin7.

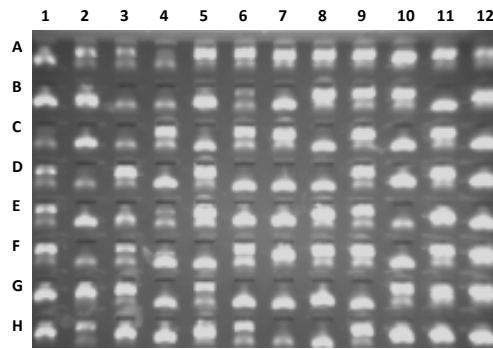


Figura A4. Electroforesis en gel *Ready To Run* de los fragmentos de la genoteca amplificados por PCR. Placa Lin9.

PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES INTERNOS DE LOS *MICROARRAYS*

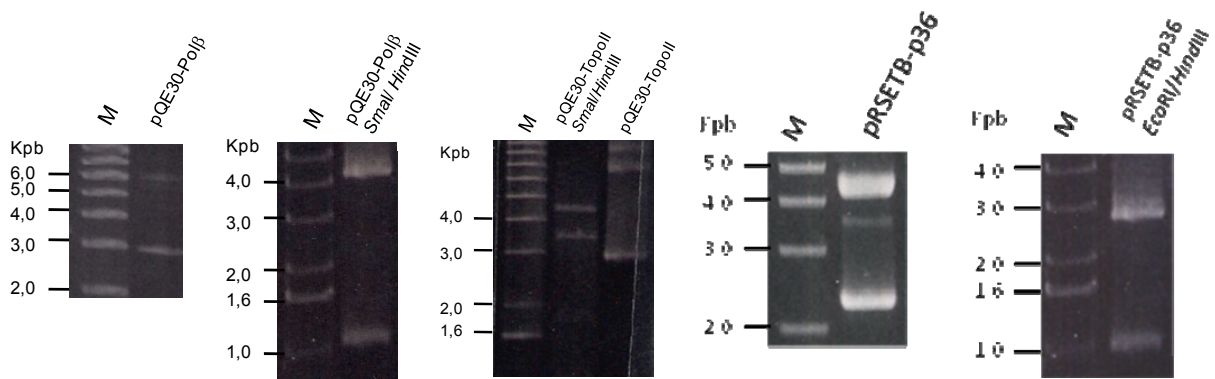


Figura A5. Preparación de los genes control positivo Pol β , TopoII y p36. Digestión durante 2 h a 37 °C en presencia de BSA 0,1 mg/ml con las endonucleasas correspondientes (secciones 3.2.4., 3.3.1. y 3.9.2., Tabla 3, Anexo I).

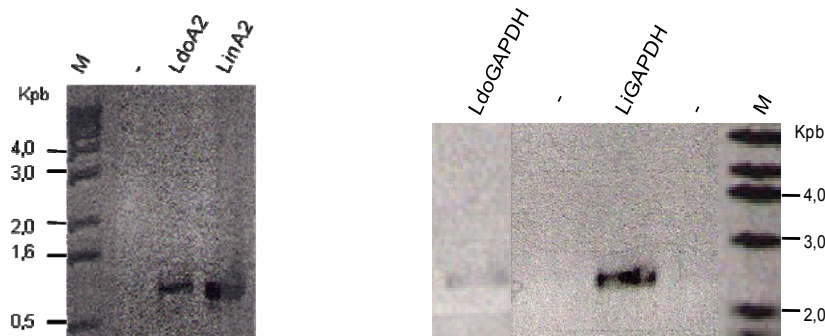


Figura A6. Productos de amplificación por PCR de los genes A2 y GAPDH de *L. infantum* y *L. donovani*. Electroforesis del 5% del volumen de la reacción de PCR. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. El protocolo de amplificación por PCR fue el utilizado para la amplificación de los insertos de la genoteca (3.9.1), excepto una temperatura constante de 50 y 53 °C (para el gen A2 y GAPDH respectivamente) y la utilización de 50 ng de ADN genómico de cada especie como molde. Se purificaron los productos con *QIAquick PCR Purification Kit* y se secuenciaron.

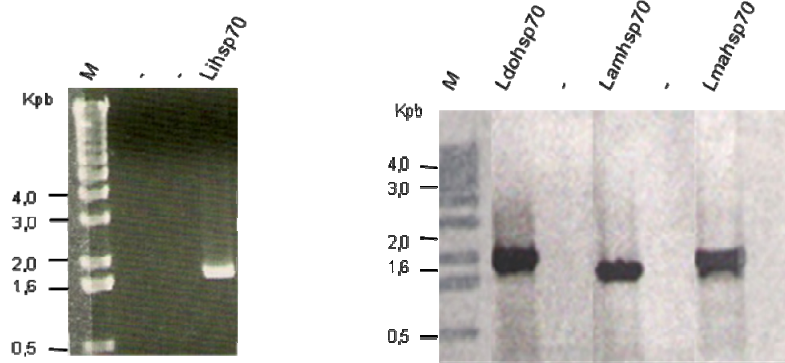


Figura A7. Productos de amplificación por PCR del gen hsp70 de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. amazonensis* y *L. major*. Electroforesis del 5% del volumen de la reacción de PCR. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. El protocolo de amplificación por PCR fue el utilizado para la amplificación de los insertos de la genoteca (3.9.1), excepto una temperatura constante de 52 °C y la utilización de 50 ng de ADN genómico de cada especie como molde. Se purificaron los productos con *QIAquick PCR Purification Kit* y se secuenciaron.

CONTROLES NEGATIVOS

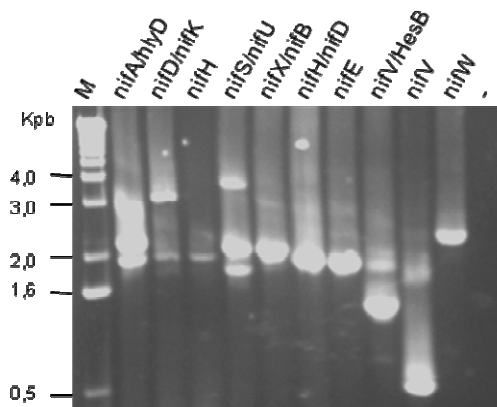


Figura A8. Productos de amplificación por PCR de los genes de *Le. ferrooxidans* que se utilizaron como controles negativos internos de los *microarrays* de *L. infantum*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los insertos de la genoteca de *Le. ferrooxidans* en pENTR 1 amplificados con los oligonucleótidos cebadores ccdF y ccdR (sección 3.9.2.) a partir de 5 ng de plásmido recombinante como molde. Se purificaron los productos con *QIAquick PCR Purification Kit* y se secuenciaron.

ANEXO IV

Genes de función desconocida y clones no resueltos en los análisis de expresión génica con *microarrays* de *L. infantum*.

Tabla A2. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas diferencialmente expresados en E/L.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Ry			
Lin21A6	1,93	0,9 ± 0,2	0,017	GS882549	0	0	a	LinJ07_V3.1060	Proteína hipotética, función desconocida
Lin43D9	2,08	1,1 ± 0,3	0,031	GS882550	0	1e-180	b	LinJ08_V3.0280 LinJ35_V3.4550 LinJ35_V3.4560	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin86C2	1,97	1,0 ± 0,2	0,018	GS882551	-	5e-137	b	LinJ04_V3.0540	Proteína hipotética conservada
Lin106B12	1,85	0,9 ± 0,1	0,002	GS882552	2e-105	-	b	LinJ29_V3.2330	Proteína hipotética, función desconocida
Lin111G5	1,74	0,8 ± 0,1	0,014	GS882553	0	0	b	LinJ12_V3.0090	Proteína hipotética conservada
Lin121C5	1,96	1,0 ± 0,2	0,022	GS882554	0	0	b	LinJ06_V3.1290	Proteína hipotética conservada
Lin138B4	1,76	0,8 ± 0,2	0,028	GS882556	0	0	b	LinJ32_V3.3700 LinJ32_V3.3710	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin139E2	1,74	0,8 ± 0,2	0,045	GS882557	0	0	b	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin142D1	2,00	1,0 ± 0,1	0,004	GS882558	2e-74	2e-108	b	LinJ08_V3.1090 LinJ08_V3.1100	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin147B4	1,79	0,8 ± 0,2	0,027	GS882559	1e-134	0	b	LinJ08_V3.1090 LinJ08_V3.1100	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin163A9	1,94	0,9 ± 0,2	0,034	S19A3	0	0	b	LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2320 LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin165D2	1,81	0,9 ± 0,2	0,023	GS882560	0	0	b	LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2320 LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin169B8	1,74	0,8 ± 0,2	0,023	GS882561	0	0	b	LinJ24_V3.2320 LinJ24_V3.2330	Proteína hipotética con múltiples dominios transmembranales Proteína hipotética conservada
Lin173H5	1,93	0,9 ± 0,2	0,038	GS882562	0	0	b	LinJ31_V3.2340	Proteína hipotética conservada
Lin238G11	2,05	1,0 ± 0,4	0,044	GS882563	6e-158	0	b	LinJ12_V3.0090	Proteína hipotética conservada
Lin312C2	1,84	0,9 ± 0,1	0,002	GS882564	0	0	b	LinJ27_V3.0120	Proteína hipotética conservada
Lin12F8	-1,91	-0,9 ± 0,0	0,001	GS882565	0	0	b	LinJ28_V3.0820	Proteína hipotética conservada
Lin13A1	-1,93	-0,9 ± 0,3	0,031	GS882566	6e-44	4e-14	b	LinJ28_V3.3260	Proteína hipotética conservada
Lin16A6	-1,97	-1,0 ± 0,4	0,051	GS882567	0	0	a	LinJ33_V3.1740 LinJ33_V3.1750	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin27H9	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,044	GS882568	0	0	b	LinJ17_V3.0010	Proteína hipotética conservada
Lin41A10	-1,75	-0,8 ± 0,3	0,040	GS882569	0	0	b	LinJ09_V3.1610 LinJ09_V3.1620 LinJ09_V3.1630	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin44H5	-1,92	-0,9 ± 0,2	0,051	GS882570	0	0	b	LinJ31_V3.0090 LinJ31_V3.0100	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin47D11	-1,71	-0,8 ± 0,2	0,032	GS882571	0	0	b	LinJ30_V3.2860 LinJ30_V3.2870	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin50C5	-1,79	-0,8 ± 0,0	0,002	GS882572	0	0	b	LinJ20_V3.0560	Proteína hipotética conservada
Lin83E8	-1,93	-0,9 ± 0,2	0,021	GS882573	0	0	b	LinJ35_V3.0140 LinJ35_V3.0150 LinJ35_V3.0160	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin122B10	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,027	GS882576	0	0	a	LinJ29_V3.2070	Proteína hipotética conservada
Lin159H6	-1,86	-0,9 ± 0,3	0,044	GS882577	0	0	b	LinJ18_V3.1630 LinJ18_V3.1640	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin173C7	-2,08	-1,0 ± 0,1	0,009	GS882578	0	2e-170	b	LinJ33_V3.0650 LinJ33_V3.0660 LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin204D8	-2,05	-1,0 ± 0,1	0,006	GS882579	0	0	b	LinJ33_V3.0650 LinJ33_V3.0660 LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin223E7	-1,92	-0,9 ± 0,1	0,019	GS882581	0	0	b	LinJ28_V3.2040	Proteína hipotética conservada
Lin239G8	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,005	GS882582	0	0	b	LinJ32_V3.3180	Proteína hipotética conservada (pseudogén)
Lin276F12	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,034	GS882583	0	0	b	LinJ34_V3.0730 LinJ34_V3.0740	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin283E8	-2,05	-1,0 ± 0,2	0,000	GS882585	0	0	b	LinJ31_V3.1110	Proteína hipotética conservada
Lin292E2	-1,89	-0,9 ± 0,2	0,029	GS882586	0	0	b	LinJ36_V3.6610 LinJ36_V3.6620	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin309E6	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,020	GS882587	0	0	b	LinJ35_V3.2950 LinJ35_V3.2960	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada

Tabla A3. Clones que contienen genes diferencialmente expresados en E/L no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin13H10	1,96	0,7 ± 0,2	0,015	GS882588	0	0	b		
Lin33C4	1,74	0,8 ± 0,1	0,005	GS882589	0	0	c	LinJ36_V3.3500 LinJ36_V3.3510 LinJ22_V3.0340 LinJ22_V3.0350 LinJ22_V3.0360	Proteína hipotética transmembrana Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 40S S15, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin37A10	1,72	0,8 ± 0,2	0,022	GS882590	0	0	c	LinJ32_V3.3560 LinJ32_V.33570	Proteína hipotética conservada Canal de cloro, putativo
Lin43B1	2,28	1,2 ± 0,3	0,025	GS882591	-	4e-76	b		
Lin48E3	1,71	0,8 ± 0,1	0,009	GS882592	0	0	a	LinJ28_V3.1030 LinJ28_V3.1040 LinJ28_V3.1050	Proteína de tipo oxidoreductasa Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 40S S14
Lin50E2	1,88	0,9 ± 0,2	0,012	GS882593	4e-23	0	b	LinJ07_V3.0540 LinJ07_V3.0550	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L7a, putativa
Lin62H12	1,70	0,8 ± 0,0	0,001	GS882594	0	0	c		
Lin72H4	2,42	1,3 ± 0,4	0,025	GS882595	-	3e-135	b		
Lin73E5	1,75	0,8 ± 0,2	0,024	GS882596	0	0	b	LinJ36_V3.2010 LinJ36_V3.2020	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L37a
Lin76C12	1,74	0,8 ± 0,3	0,055	GS882597	0	0	c	LinJ08_V3.0910 LinJ34_V3.3450	Proteína hipotética conservada Proteína de tipo transmembranal de endomembranas
Lin77H11	2,05	1,0 ± 0,2	0,018	GS882598	0	0	c	LinJ31_V3.1930 LinJ31_V3.1090	Proteína de fusión ubiquitina Proteína hipotética conservada
Lin81H2	2,52	1,3 ± 0,4	0,030	GS882599	0	0	b	LinJ24_V3.2290 LinJ24_V3.2300 LinJ24_V3.2310 LinJ24_V3.2320	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L12, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin91F10	2,84	1,5 ± 0,4	0,019	GS882600	-	5e-72	c		
Lin105B7	1,57	0,6 ± 0,1	0,015	GS882601	5e-134	3e-163	b	LinJ11_V3.1220 LinJ11_V3.1230 LinJ11_V3.1240	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L28, putativa Proteína de transporte de proteínas sec31, putativa
Lin106D5	2,60	1,4 ± 0,1	0,003	GS882602	0	0	b		
Lin113G1	1,78	0,8 ± 0,2	0,034	GS882603	0	0	b		
Lin115E3	1,73	0,8 ± 0,1	0,010	GS882604	0	0	b	LinJ35_V3.4430 LinJ35_V3.4440 LinJ35_v3.4450	Subunidad catalítica de la ADN polimerasa ε, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin125E7	1,78	0,8 ± 0,1	0,003	GS882605	4e-131	4e-131	b		
Lin126D11	1,70	0,8 ± 0,3	0,029	GS882606	5e-32	8e-37	b		
Lin129G3	1,75	0,8 ± 0,2	0,029	GS882555	0	0	c	LinJ33_V3.1570 LinJ22_V3.1080	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin135F11	1,90	0,9 ± 0,2	0,032	GS882607	4e-48	1e-44	b		
Lin137A7	1,80	0,8 ± 0,2	0,014	GS882608	1e-66	0	b		
Lin139B3	1,93	0,9 ± 0,1	0,015	GS882609	0	0	b	LinJ16_V3.0460 LinJ16_V3.0470	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L21, putativa
Lin159D1	1,72	0,8 ± 0,2	0,035	GS882610	0	0	b	LinJ01_V3.0430 LinJ01_V3.0440 LinJ01_V3.0440	Proteína ribosómica S7, putativa Proteína ribosómica S7, putativa Proteína hipotética conservada
Lin165H2	2,29	1,2 ± 0,1	0,001	GS882611	3e-131	7e-136	b		
Lin174G2	1,92	0,9 ± 0,1	0,001	GS882612	0	0	b		
Lin177D10	2,02	1,0 ± 0,3	0,024	GS882613	3e-126	0	b		
Lin194D11	1,52	0,6 ± 0,2	0,031	GS882614	0	0	b		
Lin199E11	3,05	1,6 ± 0,5	0,026	GS882615	0	5e-103	b		
Lin200A6	1,71	0,8 ± 0,1	0,014	GS882616	0	6e-161	b		
Lin201H8	1,77	0,8 ± 0,3	0,034	GS882617	0	0	c	LinJ36_V3.3400 LinJ36_V3.3410	Proteína hipotética, función desconocida Proteína hipotética conservada
Lin209G3	1,78	0,8 ± 0,3	0,037	GS882618	0	0	c	LinJ17_V3.0230 LinJ17_V3.0240	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin213A1	1,98	1,0 ± 0,3	0,033	GS882619	6e-118	9e-114	b		
Lin217F1	1,75	0,8 ± 0,3	0,044	GS882620	0	0	b		
Lin218D10	1,92	0,9 ± 0,2	0,016	GS882621	0	0	b		
Lin227D10	1,96	1,0 ± 0,4	0,051	GS882622	0	0	b		
Lin228C8	2,18	1,1 ± 0,3	0,019	GS882623	0	0	c	LinJ33_V3.0850	Proteína hipotética conservada
Lin232B5	1,70	0,8 ± 0,1	0,010	GS882624	0	0	b		
Lin241B9	1,83	0,9 ± 0,3	0,003	GS882625	0	0	b		
Lin256D7	1,73	0,8 ± 0,1	0,005	GS882626	0	0	b		
Lin264F3	1,71	0,8 ± 0,2	0,040	GS882627	2e-160	0	b	LinJ22_V3.1480 LinJ22_V3.1490	Factor asociado a CCR4, putativa Proteína hipotética conservada
Lin269B5	1,73	0,8 ± 0,2	0,027	GS882628	4e-11	5e-35	a	LinJ22_V3.1480 LinJ22_V3.1490	Factor asociado a CCR4, putativo Proteína hipotética conservada
Lin276C7	2,03	0,9 ± 0,1	0,013	GS882629	0	0	b		
Lin279A11	1,74	0,8 ± 0,1	0,011	GS882630	0	0	b		
Lin283D9	1,90	0,9 ± 0,1	0,005	GS882631	0	0	c	LinJ28_V3.2050 LinJ28_V3.2060	Transportador de zinc, putativo Transportador de zinc, putativo
Lin16E9	-1,71	-0,8 ± 0,1	0,014	GS882632	3e-52	1e-57	b		
Lin21D12	-1,78	-0,8 ± 0,3	0,029	GS882633	0	0	b	LinJ29_V3.2450 LinJ29_V3.2460 LinJ29_V3.2470	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Metaloproteasa, Clan MH, Familia M20
Lin21G5	-1,82	-0,9 ± 0,2	0,016	GS882634	0	0	b		
Lin35B5	-1,75	-0,8 ± 0,3	0,051	GS882350	1e-131	7e-130	a		
Lin52F10	-2,24	-1,2 ± 0,2	0,008	GS882635	1e-100	2e-154	b		
Lin56H12	-1,71	-0,8 ± 0,2	0,017	S20C9	5e-180	0	b		
Lin65D5	-1,92	-0,9 ± 0,2	0,018	S20C12	0	0	c	LinJ35_V3.1010 LinJ35_V3.1020 LinJ35_V3.1030	Proteína hipotética conservada Caseína quinasa I, putativa Proteína hipotética, función desconocida
Lin76D2	-1,99	-1,0 ± 0,1	0,002	GS882636	7e-59	7e-59	b		
Lin78B12	-1,75	-0,8 ± 0,1	0,008	S20D4	0	0	b		
Lin80G6	-2,14	-1,1 ± 0,3	0,032	GS882637	0	0	b		
Lin86D3	-1,72	-0,8 ± 0,1	0,010	GS882638	0	0	b		
Lin88H3	-1,75	-0,8 ± 0,1	0,012	GS882574	0	0	c	LinJ31_V3.1160 LinJ31_V3.1170	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin93C7	-1,95	-1,0 ± 0,3	0,026	GS882639	0	0	b	LinJ18_V3.1630 LinJ18_V3.1640 LinJ18_V3.1650	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Chaperona DnaJ, putativa

Expresión génica diferencial en *Leishmania infantum*

Continuación Tabla A3

Lin94H3	-1,85	-0,9 ± 0,3	0,032	GS882640	0	5e-180	b	LinJ22_V3.1480 LinJ22_V3.1490 LinJ22_V3.1500	Factor asociado a CCR4, putativo Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin102E2	-1,79	-0,8 ± 0,2	0,023	GS882575	0	0	c	LinJ18_V3.0710 LinJ18_V3.0720 LinJ26_V3.0800 LinJ26_V3.0810	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin105E9	-1,83	-0,9 ± 0,1	0,004	GS882641	0	0	a		
Lin109C6	-2,24	-1,2 ± 0,4	0,033	GS882642	0	3e-169	a		
Lin110F4	-1,88	-0,9 ± 0,1	0,009	GS882643	0	2e-176	a	LinJ31_V3.1620 LinJ31_V3.1630 LinJ31_V3.1640	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína de tipo diftina sintasa
Lin111A10	-1,70	-0,8 ± 0,1	0,005	GS882644	0	0	b		
Lin112H3	-1,70	-0,8 ± 0,2	0,019	GS882645	0	2e-151	c	LinJ29_V3.2070	
Lin116C2	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,014	GS882646	0	0	a		
Lin118B11	-1,84	-0,9 ± 0,2	0,023	GS882647	0	4e-119	a		
Lin119A2	-1,88	-0,9 ± 0,2	0,029	GS882648	0	0	b	LinJ29_V3.1930	
Lin122E10	-1,79	-0,8 ± 0,3	0,051	GS882649	0	0	b	LinJ24_V3.2350 LinJ24_V3.2360 LinJ24_V3.2370 LinJ36_V3.7230 LinJ36_V3.7240	Homólogo de <i>notchless</i> , putativo Proteína con múltiples dominios transmembrana con dedos de zinc Proteína de reparación de ADN por escisión de base, putativa Proteína hipotética conservada Proteína 1 del complejo 1, subunidad 0, putativa
Lin124E11	-1,70	-0,8 ± 0,1	0,006	GS882650	0	0	b		
Lin127A1	-1,85	-0,9 ± 0,1	0,006	GS882651	0	0	b		
Lin135B3	-2,10	-1,0 ± 0,1	0,010	GS882652	0	0	b	LinJ30_V3.0750 LinJ30_V3.0760 LinJ30_V3.0770	Proteína hipotética conservada Co-chaperona GrpE, putativa Desconocida
Lin138B12	-1,85	-0,9 ± 0,4	0,054	GS882653	0	0	a	LinJ15_V3.1600 LinJ15_V3.1610 LinJ15_V3.1620 LinJ15_V3.1520 LinJ15_V3.1530 LinJ15_V3.1540	Peptidasa aspártica de tipo presenilina, clan AD, familia A22A, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína de tipo NPH2/RS6 Fosfodiesterasa específica de cAMP, putativa
Lin145E5	-1,76	-0,8 ± 0,1	0,07	GS882654	0	0	c		
Lin203E9	-1,88	-0,9 ± 0,3	0,024	GS882655	1e-149	2e-145	a		
Lin204F3	-1,76	-0,8 ± 0,2	0,040	GS882656	0	0	b		
Lin209B12	-2,29	-1,2 ± 0,3	0,024	GS882580	0	0	c	LinJ35_V3.4170 LinJ35_V3.4180	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin237G11	-1,77	-0,8 ± 0,2	0,001	GS882657	7e-164	1e-140	b		
Lin261A10	-2,67	-1,4 ± 0,1	0,039	GS882658	0	0	b	LinJ22_V3.1480 LinJ22_V3.1490	Factor asociado a CCR4, putativo Proteína hipotética conservada
Lin270C4	-1,96	-1,0 ± 0,3	0,054	GS882659	3e-27	1e-11	b		
Lin270F7	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,018	GS882660	0	5e-60	b		
Lin268H6	-1,84	-0,9 ± 0,2	0,048	GS882661	0	0	a	LinJ10_V3.0650	Proteína hipotética conservada
Lin282A4	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,043	GS882584	0	0	b	LinJ29_V3.1160 LinJ29_V3.1170 LinJ29_V3.1180 LinJ29_V3.1190	Proteína ribosómica L1a, putativa Proteína ribosómica L1a, putativa Proteína ribosómica L1a, putativa Proteína hipotética conservada
Lin287F2	-1,85	-0,9 ± 0,2	0,041	GS882662	0	0	b	LinJ33_V3.1900 LinJ33_V3.1910 LinJ33_V3.1920 LinJ33_V3.1930 LinJ27_V3.1120 LinJ27_V3.1130	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína quinasa de especificidad dual, putativa Histona H1, putativa Carboxipeptidasa, putativa
Lin288C8	-1,85	-0,9 ± 0,2	0,004	GS882663	1e-122	0	b		
Lin292F2	-1,83	-0,9 ± 0,3	0,043	GS882664	0	0	b		
Lin302C2	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,002	GS882665	9e-154	0	b	LinJ15_V3.1140 LinJ15_V3.1150	Triparedoxina peroxidasa Proteína hipotética conservada

Tabla A4. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas diferencialmente expresadas en E/A.

Clon	F	Log ₂ R ±S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin44G7	2,75	1,5 ± 0,0	0,007	GS882666	0	0	b	LinJ31_V3.0960	Proteína hipotética conservada
Lin45A12	1,76	0,8 ± 0,1	0,041	GS882667	0	0	b	LinJ31_V3.0970	Proteína hipotética conservada
								LinJ25_V3.0660	Proteína hipotética conservada
Lin53F1	3,78	1,9 ± 0,2	0,049	GS882668	0	0	b	LinJ25_V3.0670	Proteína hipotética conservada
								LinJ33_V3.0950	Proteína hipotética conservada
Lin93F9	2,04	1,0 ± 0,1	0,032	GS882670	0	0	b	LinJ33_V3.0960	Proteína hipotética conservada
Lin94G6	1,84	0,9 ± 0,1	0,045	GS882671	0	0	b	LinJ34_V3.2140	Proteína hipotética conservada
								LinJ30_V3.3250	Proteína hipotética conservada
Lin119E7	1,87	0,9 ± 0,0	0,017	GS882672	0	0	b	LinJ30-V3.3260	Proteína hipotética conservada
								LinJ30_V3.3270	Proteína hipotética conservada
Lin123C12	2,61	1,4 ± 0,0	0,006	GS882673	0	0	b	LinJ31_V3.1480	Proteína hipotética, función desconocida
Lin134A3	2,75	1,5 ± 0,1	0,045	GS882675	0	0	b	LinJ35_V3.0190	Proteína hipotética conservada
								LinJ04_V3.0630	Proteína hipotética conservada
Lin158A10	2,51	1,3 ± 0,0	0,016	GS882676	0	0	b	LinJ04_V3.0640	Proteína hipotética
								LinJ23_V3.0870	Proteína hipotética conservada
Lin163E7	3,65	1,9 ± 0,0	0,012	GS882677	0	0	a	LinJ06_V3.0270	Proteína hipotética conservada
Lin172G11	1,78	0,8 ± 0,1	0,035	GS882678	0	0	b	LinJ30_V3.3400	Proteína hipotética conservada
Lin189D8	1,74	0,8 ± 0,1	0,048	GS882679	0	0	a	LinJ26_V3.1840	Proteína hipotética conservada
								LinJ26_V3.1850	Proteína hipotética conservada
Lin200B11	1,82	0,9 ± 0,0	0,018	GS882680	0	0	b	LinJ29_V3.1030	Proteína hipotética conservada
Lin203A1	2,92	1,5 ± 0,1	0,016	GS882681	7e-130	7e-133	a	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin205H2	1,88	0,9 ± 0,1	0,027	GS882682	1e-180	0	b	LinJ23_V3.0130	Proteína hipotética conservada
Lin206H3	3,42	1,8 ± 0,1	0,026	GS882683	0	0	b	LinJ10_V3.1370	Proteína hipotética conservada
Lin208D6	2,70	1,4 ± 0,1	0,042	GS882684	0	0	a	LinJ29_V3.1150	Proteína hipotética conservada
Lin239F8	2,06	1,1 ± 0,1	0,036	GS882686	0	2e-151	b	LinJ32_V3.3360	Proteína hipotética, conserve
								LinJ32_V3.3370	Proteína hipotética conservada
Lin252G12	1,91	0,9 ± 0,1	0,039	GS882687	1e-97	4e-88	b	LinJ02_V3.0310	Proteína hipotética conservada
Lin228E5	2,65	1,4 ± 0,1	0,042	GS882688	7e-56	7e-56	b	Lin02_V3.0320	Proteína hipotética conservada
								LinJ06_V3.1290	Proteína hipotética conservada
Lin236A4	1,73	0,8 ± 0,0	0,022	GS882689	0	3e-166	b	LinJ35_V3.4620	Proteína hipotética conservada
								LinJ35_V3.4630	Proteína hipotética conservada
Lin243B8	1,79	0,8 ± 0,1	0,049	GS882690	0	0	b	LinJ35_V3.4640	Proteína hipotética conservada
								LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida
Lin14A9	-1,75	-0,8 ± 0,0	0,024	GS882691	1e-91	4e-91	b	LinJ23_V3.1170	Proteína hipotética, función desconocida
Lin16D7	-1,79	-0,8 ± 0,1	0,035	GS882692	1e-168	0	b	LinJ36_V3.5780	Proteína hipotética conservada
								LinJ36_V3.5790	Proteína hipotética conservada
Lin22E1	-1,73	-0,8 ± 0,0	0,013	GS882693	5e-171	0	b	LinJ19_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin31C4	-1,71	-0,8 ± 0,1	0,047	GS882694	0	0	b	LinJ11_V3.1360	Proteína hipotética conservada
								LinJ11_V3.1370	Proteína hipotética conservada
Lin36D11	-1,74	-0,8 ± 0,1	0,038	GS882695	5e-35	8e-34	b	LinJ36_V3.0850	Proteína hipotética, función desconocida
Lin44E11	-2,13	-1,1 ± 0,1	0,028	GS882696	0	0	b	LinJ20_V3.0020	Proteína hipotética conservada
Lin47E12	-1,72	-0,8 ± 0,0	0,021	GS882697	1e-143	1e-143	b	LinJ16_V3.1060	Proteína hipotética conservada
Lin62C5	-1,91	-0,9 ± 0,1	0,038	GS882698	0	4e-82	b	LinJ13_V3.0880	Proteína hipotética conservada
Lin94C9	-2,41	-1,3 ± 0,1	0,029	GS882699	0	0	a	LinJ32_V3.0220	Proteína hipotética conservada
Lin106F12	-1,84	-0,9 ± 0,0	0,008	GS882700	0	0	a	LinJ36_V3.0850	Proteína hipotética, función desconocida
Lin110H2	-1,73	-0,8 ± 0,0	0,017	GS882702	0	0	b	LinJ36_V3.3060	Proteína hipotética conservada
								LinJ36_V3.3070	Proteína hipotética conservada
Lin125F4	-2,26	-1,2 ± 0,1	0,049	GS882703	0	0	b	LinJ34_V3.2530	Proteína hipotética conservada
								LinJ34_V3.2540	Proteína hipotética conservada
Lin126C12	-2,11	-1,1 ± 0,1	0,043	GS882704	0	0	b	LinJ29_V3.2720	Proteína hipotética conservada
Lin131E1	-1,71	-0,8 ± 0,1	0,052	GS882705	0	0	a	LinJ29_V3.2730	Proteína hipotética conservada
								LinJ15_V3.1270	Proteína hipotética conservada
Lin131F10	-2,16	-1,1 ± 0,0	0,020	GS882706	0	0	b	LinJ32_V3.3160	Proteína hipotética conservada
Lin138D2	-1,76	-0,8 ± 0,0	0,021	GS882707	0	0	b	LinJ07_V3.0630	Proteína hipotética conservada
								LinJ07_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin139B8	-2,75	-1,5 ± 0,1	0,026	GS882708	0	0	a	LinJ33_V3.3280	Proteína hipotética conservada
Lin144H7	-1,84	-0,9 ± 0,1	0,044	GS882709	0	0	b	LinJ31_V3.1210	Proteína hipotética, función desconocida
Lin154G1	-3,30	-1,7 ± 0,0	0,001	GS882710	0	2e-179	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
								LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
Lin158B7	-2,18	-1,1 ± 0,0	0,020	GS882711	0	0	b	LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
								LinJ31_V3.0250	Proteína hipotética conservada
Lin167F2	-1,88	-0,9 ± 0,1	0,037	GS882712	0	0	b	LinJ28_V3.1770	Proteína hipotética conservada
								LinJ28_V3.1780	Proteína hipotética conservada
Lin182G8	-1,97	-1,0 ± 0,1	0,038	GS882713	0	0	b	LinJ36_V3.6410	Proteína hipotética conservada
								LinJ36_V3.6420	Proteína hipotética conservada
Lin194D5	-2,56	-1,4 ± 0,1	0,037	GS882714	0	0	b	LinJ30_V3.0810	Proteína hipotética conservada
Lin210A10	-1,73	-0,8 ± 0,0	0,000	GS882716	0	0	b	LinJ27_V3.0020	Proteína hipotética conservada
								LinJ27_V3.0030	Proteína hipotética conservada
Lin222B7	-1,75	-0,8 ± 0,0	0,018	GS882717	1e-168	0	b	LinJ21_V3.1070	Proteína hipotética conservada
								LinJ21_V3.1080	Proteína hipotética conservada
Lin281H8	-28,20	-4,8 ± 0,6	0,026	GS882718	4e-14	4e-156	b	LinJ21_V3.1090	Proteína hipotética conservada
								LinJ03_V3.0540	Proteína hipotética

Tabla A5. Clones que contienen genes diferencialmente expresados en E/A no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada	
					Fw	Rv				
Lin10F7	2,85	1,5 ± 0,1	0,031	GS882719	0	0	b			
Lin11G12	1,91	0,9 ± 0,0	0,011	GS882720	6e-41	9e-40	b			
Lin13H10	1,84	0,9 ± 0,1	0,043	GS882721	0	0	b			
Lin46E9	1,79	0,8 ± 0,1	0,031	S23B9	1e-94	1e-94	b			
Lin48F10	2,11	1,1 ± 0,0	0,016	GS882722	0	7e-136	b			
Lin56G3	2,81	1,5 ± 0,0	0,042	GS882723	4e-45	2e-59	a			
Lin63A10	3,81	1,9 ± 0,0	0,000	GS882724	0	0	b			
Lin65B9	2,41	1,3 ± 0,1	0,026	GS882725	0	0	b			
Lin72E2	1,95	1,1 ± 0,1	0,046	GS882726	7e-173	0	b			
Lin79C10	2,99	1,6 ± 0,0	0,002	GS882727	0	0	b			
Lin81H6	2,27	1,2 ± 0,1	0,044	GS882728	0	0	b			
Lin86D3	5,17	2,01 ± 0,0	0,006	GS882729	0	0	b			
Lin91F9	3,03	1,6 ± 0,1	0,017	GS882669	0	0	c	LinJ31_V3.1630	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
								LinJ31_V3.1640	Diflina sintasa, putativa	-
								LinJ31_V3.1650	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ35_V3.5080	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin92C9	1,71	0,8 ± 0,0	0,027	GS882730	0	0	b			
Lin96B8	2,72	1,4 ± 0,2	0,042	GS882731	0	0	b			
Lin97A12	2,66	1,4 ± 0,0	0,016	GS882732	0	0	b			
Lin101D2	1,77	0,8 ± 0,1	0,031	GS882733	0	0	b			
Lin122C8	2,90	1,5 ± 0,2	0,049	GS882734	0	0	b			
Lin122H12	4,47	2,2 ± 0,1	0,014	GS882735	0	0	b			
Lin123C9	2,52	1,3 ± 0,1	0,032	GS882736	0	0	b			
Lin124D12	2,38	1,3 ± 0,1	0,027	GS882737	0	0	b			
Lin125E7	3,16	1,7 ± 0,0	0,003	GS882738	0	0	c			
Lin132B12	3,44	1,8 ± 0,1	0,024	GS882674	0	0	c	LinJ06_V3.0810	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
								LinJ31_V3.2090	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin165B11	2,20	1,1 ± 0,1	0,033	GS882739	0	0	b			
Lin194F7	3,02	1,6 ± 0,0	0,009	GS882740	0	0	b			
Lin200G6	1,86	0,9 ± 0,1	0,027	GS882741	0	0	b			
Lin209B6	2,99	1,6 ± 0,1	0,040	GS882742	0	0	b			
Lin204G10	2,68	1,4 ± 0,0	0,006	GS882743	0	0	b			
Lin210A5	2,30	1,2 ± 0,0	0,015	GS882744	0	2e-148	b	LinJ30_V3.2060	Proteína de tipo succinildiaminopimelato desuccinilasa	N.D.
								LinJ30_V3.2070	Proteína de fusión ubiquitina	N.D.
Lin225G6	3,55	1,8 ± 0,2	0,042	GS882745	0	2e-151	b			
Lin228A2	4,30	2,1 ± 0,1	0,014	GS882685	2e-176	8e-179	c	LinJ27_V3.2470	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin241G4	1,99	1,0 ± 0,0	0,005	GS882746	0	0	b			
Lin242C5	2,20	1,1 ± 0,1	0,025	GS882747	0	0	b			
Lin251E12	1,90	0,9 ± 0,1	0,034	GS882748	0	0	b			
Lin252C12	1,99	1,0 ± 0,0	0,005	GS882749	3e-175	1e-100	b			
Lin9B10	-1,99	-1,0 ± 0,1	0,032	S25A1	0	0	c	LinJ32_V3.3810	Proteína de tipo 3-hidroxiisobutil-CoA hidrolasa	N.D.
								LinJ27_V3.0300	Proteína portadora de acilo, putativa	N.D.
								LinJ27_V3.0310	Metilmalonil-CoA mutasa, putativa	N.D.
Lin13E5	-2,37	-1,2 ± 0,1	0,045	GS882750	0	0	c	LinJ24_V3.0530	Proteína con dominio DnaJ, putativa	N.D.
								LinJ24_V3.0540	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ24_V3.0550	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
								LinJ31_V3.2910	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ31_V3.2920	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin22G2	-12,66	-3,7 ± 0,1	0,018	GS882751	0	0	b			
Lin24G2	-1,91	-0,9 ± 0,0	0,007	GS882752	0	0	b	LinJ32_V3.1250	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ32_V3.1260	Subunidad no-ATPasa reguladora del proteasoma, putativa	N.D.
								LinJ32_V3.1270	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin31C6	-1,83	-0,9 ± 0,1	0,032	GS882753	0	0	b	LinJ15_V3.1630	Proteína quinasa, putativa	N.D.
								LinJ15_V3.1640	Subunidad 1 de la condensina, putativa	N.D.
Lin48B7	-2,10	-1,1 ± 0,1	0,041	GS882754	0	0	b	LinJ36_V3.6250	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ36_V3.6260	Proteína de tipo I6202.3	N.D.
Lin99F1	-1,72	-0,8 ± 0,0	0,004	GS882755	0	0	b	LinJ30_V3.3430	Fosfoglicerato quinasa con motivo PAS, putativa	N.D.
								LinJ30_V3.3440	Importina con dominio CAS/CSE, putativa	N.D.
Lin107F4	-1,77	-0,8 ± 0,0	0,001	GS882701	0	0	b	LinJ18_V3.0780	ARN polimerasa II dirigida a ADN, putativa	-
								LinJ18_V3.0790	ARN polimerasa II dirigida a ADN, putativa	-
								LinJ18_V3.0800	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin118F12	-2,06	-1,0 ± 0,1	0,035	GS882756	1e-146	3e-147	b			
Lin122G6	-2,57	-1,4 ± 0,0	0,012	GS882757	0	0	c	LinJ27_V3.1930	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ27_V3.1940	Proteína de tipo D-lactato deshidrogenasa	-
								LinJ27_V3.1950	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados, putativa	N.D.
								LinJ27_V3.1960	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin124E11	-2,04	-1,0 ± 0,1	0,038	GS882758	0	0	b	LinJ36_V3.7230	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ36_V3.7240	Proteína 1 del complejo T, subunidad θ, putativa	N.D.
Lin125G2	-2,56	-1,4 ± 0,1	0,045	GS882759	0	0	c	LinJ31_V3.3240	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ31_V3.3250	Proteína de tipo fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa	-
								LinJ36_V3.1950	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ36_V3.1960	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin146F1	-2,19	-1,1 ± 0,0	0,010	GS882760	4e-91	4e-91	b			
Lin152A7	-2,31	-1,2 ± 0,1	0,030	GS882761	0	0	c	LinJ27_V3.1920	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ27_V3.1930	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ27_V3.1950	Proteína de tipo aminoácido aminotransferasa, putativa	N.D.
								LinJ27_V3.1960	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin161C6	-1,89	-0,9 ± 0,1	0,046	GS882762	0	0	b	LinJ35_V3.4910	Subunidad α1 del proteasoma, putativa	N.D.
								LinJ35_V3.4920	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin164G2	-2,00	-1,0 ± 0,0	0,019	GS882763	0	0	b	LinJ29_V3.0070	Sintaxina, putativa	N.D.
								LinJ29_V3.0080	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin168B7	1,73	0,8 ± 0,1	0,046	GS882764	-	3e-154	c	LinJ23_V3.0620	Proteína de tipo oxidoreductasa	N.D.
								LinJ23_V3.0630	Proteína de tipo oxidoreductasa	N.D.
Lin190D7	-2,14	-1,1 ± 0,1	0,031	GS882765	0	0	b	LinJ29_V3.0900	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
								LinJ29_V3.0910	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ29_V3.0920	Guanina desaminasa, putativa	N.D.
Lin199F4	-1,91	-0,9 ± 0,0	0,022	GS882715	0	0	a	LinJ07_V3.1270	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ07_V3.1280	Subunidad 9 de ATPasa, putativa, pseudogén	N.D.

Continuación Tabla A5

Lin223G12	-1,99	-1,0 ± 0,1	0,042	GS882766	0	0	c	LinJ27_V3.1930 LinJ27_V3.1940	Proteína hipotética conservada Proteína de tipo D-lactato deshidrogenasa, putativa	N.D. -	1,3 ± 0,0
								LinJ27_V3.1950	Aminotranferasa de aminoácidos ramificados, putativa	N.D.	
								LinJ27_V3.1960	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin227H5	-1,71	-0,8 ± 0,0	0,016	GS882767	2e-105	3e-110	a				
Lin290F10	-2,87	-1,5 ± 0,0	0,006	GS882768							
Lin298C1	-1,71	-0,8 ± 0,1	0,037	GS882770	0	0	a	LinJ16_V3.1630	Oxidorreductasa del retículo endoplásmico, putativa	N.D.	
								LinJ16_V3.1640	Subunidad catalítica de la ADN polimerasa I α , putativa	N.D.	
Lin306G4	-2,13	-1,1 ± 0,0	0,013	GS882769	0	0	b				

Tabla A6. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas diferencialmente expresadas en L/A.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor Fw	Rv	Def.	Anotación	Función génica anotada
Lin21C1	2,19	1,1 ± 0,4	0,049	GS882777	0	0	b	LinJ23_V3.0100 LinJ23_V3.0110	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin26G3	2,57	1,4 ± 0,1	0,001	GS882776	6e-161	7e-59	a	LinJ36_V3.5190	Proteína hipotética, función desconocida
Lin47D11	2,12	1,1 ± 0,2	0,015	GS882775	0	0	b	LinJ30_V3.2860 LinJ30_V3.2870	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin47F5	3,20	1,7 ± 0,4	0,015	GS882774	0	0	a	LinJ02_V3.0060	Proteína hipotética conservada
Lin70C4	2,86	1,5 ± 0,4	0,027	GS882771	0	0	b	Lin J32_V3.0370	Proteína hipotética conservada
Lin77G12	2,02	1,0 ± 0,3	0,026	GS882773	0	0	b	LinJ32_V3.1720	Proteína hipotética conservada
Lin83E8	2,21	1,1 ± 0,1	0,005	GS882778	0	0	b	LinJ35_V3.0140 LinJ35_V3.0150 LinJ35_V3.0160	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin109E2	2,04	1,0 ± 0,3	0,025	GS882779	0	0	b	LinJ31_V3.1420	Proteína hipotética conservada
Lin119E7	2,39	1,3 ± 0,4	0,025	GS882780	0	0	b	LinJ31_V3.1480	Proteína hipotética, función desconocida
Lin121C6	3,18	1,7 ± 0,0	0,000	GS882781	0	0	b	LinJ09_V3.1600 LinJ09_V3.1610 LinJ09_V3.1620	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin128C11	2,21	1,1 ± 0,1	0,002	GS882783	1e-168	1e-168	b	LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin130D8	2,64	1,4 ± 0,1	0,002	GS882784	0	0	b	LinJ09_V3.0910	Proteína hipotética conservada
Lin131G3	2,93	1,6 ± 0,3	0,013	GS882785	6e-121	0	b	LinJ35_V3.3770	Proteína hipotética conservada
Lin132B12	2,13	1,1 ± 0,2	0,016	GS882786	0	8e-179	b	LinJ06_V3.0810 LinJ31_V3.2090	Proteína hipotética, función desconocida Proteína hipotética, función desconocida
Lin133F9	3,63	1,9 ± 0,4	0,017	GS882787	0	0	b	LinJ35_V3.5310	Proteína hipotética conservada
Lin134A3	2,45	1,3 ± 0,2	0,011	GS882788	0	0	b	LinJ04_V3.0630 LinJ04_V3.0640	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética
Lin136D8	6,75	2,8 ± 0,6	0,014	GS882789	0	0	b	LinJ33_V3.0650 LinJ33_V3.0660 LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin143H10	2,04	1,0 ± 0,1	0,005	GS882790	0	0	a	LinJ31_V3.0690	Proteína hipotética conservada
Lin147B4	2,04	1,0 ± 0,3	0,032	GS882792	0	1e-134	b	LinJ08_V3.1090 LinJ08_V3.1100	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin157C6	2,24	1,2 ± 0,3	0,019	GS882793	0	0	b	LinJ26_V3.2580	Proteína hipotética conservada
Lin158A10	2,19	1,1 ± 0,2	0,016	GS882794	0	0	b	LinJ23_V3.0870	Proteína hipotética conservada
Lin158F5	2,45	1,3 ± 0,1	0,002	GS882795	0	0	b	LinJ31_V3.1620 LinJ31_V3.1630	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin160E1	3,69	1,9 ± 0,6	0,034	GS882796	0	2e-111	b	LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2320 LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin163E7	2,89	1,5 ± 0,5	0,029	GS882797	0	0	a	LinJ06_V3.0270	Proteína hipotética conservada
Lin166D11	2,50	1,3 ± 0,3	0,012	GS882798	0	0	b	LinJ23_V3.1350 LinJ23_V3.1360	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin166H10	3,87	2,0 ± 0,7	0,038	GS882799	0	0	a	LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2320 LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin177B9	2,01	1,0 ± 0,3	0,020	GS882800	0	0	b	LinJ26_V3.2580	Proteína hipotética conservada
Lin194B7	2,04	1,0 ± 0,2	0,012	GS882801	0	0	b	LinJ23_V3.1830	Proteína hipotética, función desconocida
Lin200D7	2,17	1,1 ± 0,0	0,000	GS882802	0	0	b	LinJ36_V3.0520	Proteína hipotética conservada
Lin200F4	2,00	1,0 ± 0,4	0,042	GS882803	0	0	b	LinJ31_V3.2080	Proteína hipotética, función desconocida
Lin201C10	2,26	1,2 ± 0,3	0,017	GS882804	2e-102	7e-130	b	LinJ34_V3.2770 LinJ34_V3.2780	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin203A1	2,77	1,5 ± 0,6	0,044		5e-134	7e-130	a	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin204D8	7,49	2,9 ± 0,4	0,005	GS882806	0	0	b	LinJ33_V3.0650 LinJ33_V3.0660 LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin209B12	5,35	2,4 ± 0,1	0,000	GS882807	7e-93	0	a	LinJ35_V3.4190	Proteína hipotética conservada
Lin215A9	2,15	1,1 ± 0,4	0,038	GS882808	0	0	b	LinJ10_V3.1230 LinJ10_V3.1240 LinJ36_V3.2290	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin226F12	2,16	1,1 ± 0,3	0,024	GS882810	0	0	b	LinJ27_V3.2090	Proteína hipotética conservada
Lin226G2	2,08	1,1 ± 0,3	0,029	GS882811	0	0	b	LinJ23_V3.1330	Proteína hipotética, función desconocida
Lin230F8	2,45	1,1 ± 0,5	0,042	GS882812	0	0	b	LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida
Lin230H7	4,56	2,2 ± 0,6	0,027	GS882813	0	5e-103	b	LinJ08_V3.0020	Proteína hipotética conservada
Lin233D10	2,24	1,2 ± 0,3	0,027	GS882814	0	-	b	LinJ13_V3.0320 LinJ13_V3.0330	Proteína hipotética conservada Desconocida
Lin238B10	2,43	1,3 ± 0,4	0,028	GS882815	0	0	a	LinJ34_V3.0770	Proteína hipotética conservada
Lin239G8	3,25	1,7 ± 0,6	0,043	GS882816	0	0	b	LinJ32_V3.3180	Proteína hipotética conservada (pseudogén)
Lin288E4	2,80	1,5 ± 0,5	0,042	GS882817	0	1e-140	b	LinJ21_V3.1920	Proteína hipotética, función desconocida
Lin289C9	2,48	1,3 ± 0,4	0,036	GS882818	0	0	b	LinJ28_V3.1110	Proteína hipotética conservada
Lin289G12	2,07	1,1 ± 0,3	0,027	GS882819	0	0	b	LinJ31_V3.1760	Proteína hipotética conservada
Lin246C5	2,60	1,4 ± 0,4	0,031	GS882820	0	0	b	LinJ08_V3.1010	Proteína hipotética conservada
Lin250G5	2,82	1,5 ± 0,1	0,002	GS882821	0	0	b	LinJ09_V3.1610	Proteína hipotética conservada
Lin265F5	2,53	1,3 ± 0,4	0,029	GS882823	0	5e-171	b	LinJ13_V3.0330	Desconocida
Lin269B4	3,11	1,6 ± 0,5	0,032	GS882824	0	0	b	LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada

Continuación Tabla A6

Lin271B5	2,06	1,0 ± 0,4	0,042	GS882825	0	0	b	LinJ09_V3.0020	Proteína hipotética conservada
Lin14C11	-1,90	-0,9 ± 0,1	0,003	GS882826	0	0	b	LinJ24_V3.1740 LinJ24_V3.1750	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin23A8	-1,77	-0,8 ± 0,1	0,009	GS882827	0	0	b	LinJ13_V3.0890 LinJ13_V3.0900	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin23E10	-2,65	-1,4 ± 0,3	0,019	GS882828	0	2e-81	a	LinJ31_V3.1230	Proteína hipotética conservada
Lin29B5	-1,86	-0,9 ± 0,1	0,007	GS882829	0	0	b	LinJ29_V3.1200	Proteína hipotética conservada
Lin31C7	-1,86	-0,9 ± 0,2	0,013	S28C12	0	0	b	LinJ29_V3.1200	Proteína hipotética conservada
Lin62C5	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,013	GS882830	3e-67	0	b	LinJ13_V3.0880	Proteína hipotética conservada
Lin129H5	-2,04	-1,0 ± 0,4	0,048	GS882831	0	0	b	LinJ16_V3.1110	Proteína hipotética conservada
Lin134B11	-1,93	-0,9 ± 0,4	0,054	GS882832	0	0	b	LinJ29_V3.0110	Proteína hipotética conservada
Lin135A8	-1,98	-1,0 ± 0,3	0,033	GS882833	0	0	b	LinJ35_V3.4270	Proteína hipotética, función desconocida
Lin138D2	-1,78	-0,8 ± 0,2	0,022	GS882834	0	0	b	LinJ07_V3.0630 LinJ07_V3.0640	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin139B8	-2,16	-1,1 ± 0,5	0,053	GS882835	0	0	b	LinJ33_V3.3280	Proteína hipotética conservada
Lin139F9	-2,19	-1,1 ± 0,5	0,052	GS882836	0	0	a	LinJ31_V3.3110 LinJ31_V3.3120	Proteína hipotética, función desconocida Proteína hipotética, función desconocida
Lin154A5	-2,25	-1,2 ± 0,2	0,006	GS882837	0	0	b	LinJ10_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin154G1	-2,92	-1,5 ± 0,5	0,033	GS882838	0	0	b	LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin171B2	-2,92	-1,5 ± 0,2	0,005	GS882839	3e-135	0	b	LinJ24_V3.0560	Proteína hipotética conservada
Lin177B5	-2,47	-1,3 ± 0,2	0,007	GS882840	5e-94	0	b	LinJ24_V3.1970	Proteína hipotética conservada
Lin183A3	-1,95	-1,0 ± 0,4	0,045	GS882841	0	0	b	LinJ24_V3.2250	Proteína hipotética conservada
Lin209F8	-1,92	-0,9 ± 0,3	0,028	GS882842	0	0	b	LinJ31_V3.1270	Proteína hipotética conservada
Lin234B2	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,025	GS882844	0	4e-159	b	LinJ28_V3.0960	Proteína hipotética conservada
Lin236E4	-1,96	-1,0 ± 0,3	0,023	GS882845	0	0	a	LinJ33_V3.3280 LinJ33_V3.3290	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin241H12	-2,31	-1,2 ± 0,5	0,049	GS882846	0	0	b	LinJ34_V3.1120	Proteína hipotética conservada
Lin243C7	-1,79	-0,8 ± 0,2	0,014	GS882847	5e-109	1e-48	b	LinJ02_V3.0280	Proteína hipotética conservada
Lin267A6	-2,21	-1,1 ± 0,2	0,001	GS882848	0	0	b	LinJ06_V3.1270	Proteína hipotética, función desconocida
Lin274C4	-1,87	-0,9 ± 0,2	0,017	GS882849	0	0	b	LinJ07_V3.0630	Proteína hipotética conservada
Lin280G2	-2,29	-1,2 ± 0,3	0,017	GS882850	0	0	b	LinJ31_V3.1470	Proteína hipotética, función desconocida
Lin281H8	-42,32	-5,4 ± 1,3	0,018	GS882851	8e-68	0	b	LinJ03_V3.0540	Proteína hipotética
Lin284E12	-2,09	-1,1 ± 0,2	0,011	GS882852	3e-70	8e-176	b	LinJ03_V3.0540	Proteína hipotética
Lin287C10	-2,50	-1,3 ± 0,4	0,026	GS882853	0	0	b	LinJ32_V3.3600 LinJ32_V3.3610	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada

Tabla A7. Clones que contienen genes diferencialmente expresados en L/A no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e Fw	Rv	Def.	Anotación	Función génica anotada
Lin7D12	2,53	1,3 ± 0,5	0,042	GS882871	0	-	c		
Lin9F12	2,42	1,3 ± 0,4	0,029	GS882870	1e-91	6e-121	b		
Lin12G9	2,34	1,2 ± 0,1	0,002	GS882869	3e-27	3e-27	b		
Lin13B7	3,25	1,7 ± 0,5	0,030	GS882868	0	0	b		
Lin24C4	5,35	2,4 ± 0,5	0,012	GS882867	0	0	a		
Lin25B5	3,02	1,6 ± 0,5	0,030	GS882866	0	0	b		
Lin32B5	2,77	1,5 ± 0,5	0,038	GS882865	1e-29	1e-23	b		
Lin34D7	2,09	1,1 ± 0,2	0,010	GS882864	1e-128	3e-018	b		
Lin49F3	2,22	1,2 ± 0,2	0,013	GS882876	7e-136	0	b	LinJ27_V3.0020 LinJ27_V3.0030 LinJ27_V3.0040	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Metalopeptidasa, Clan M-, Familia M48
Lin53D8	2,15	1,1 ± 0,3	0,029	GS882863	0	0	b		
Lin55B1	3,04	1,6 ± 0,3	0,011	GS882855	0	0	b		
Lin56G3	2,73	1,4 ± 0,5	0,036	GS882856	4e-45	2e-59	a		
Lin56G7	2,43	1,3 ± 0,0	0,000	GS882857	0	0	b		
Lin63A10	2,40	1,3 ± 0,1	0,004	GS882858	0	0	b		
Lin67B10	3,37	1,8 ± 0,3	0,011	GS882859	0	0	b		
Lin72E2	2,04	1,0 ± 0,2	0,015	GS882860	7e-173	0	b		
Lin74D2	2,44	1,3 ± 0,4	0,033	GS882861	0	0	b		
Lin76A8	3,05	1,6 ± 0,5	0,033	GS882862	0	0	b		
Lin77D11	2,06	1,0 ± 0,2	0,015	GS882772	0	0	c	LinJ32_V3.1580 LinJ32_V3.1590 LinJ10_V3.0460	Proteína hipotética Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin81B5	2,05	1,0 ± 0,1	0,003	GS882872	0	0	b		
Lin81H6	2,47	1,3 ± 0,2	0,006	GS882873	0	0	b		
Lin86D3	6,41	2,7 ± 0,1	0,001	GS882874	0	0	b		
Lin93C7	2,34	1,2 ± 0,3	0,020	GS882875	0	0	b	LinJ18_V3.1630 LinJ18_V3.1640 LinJ18_V3.1650	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Chaperona DnaJ, putativa
Lin93D7	2,26	1,2 ± 0,3	0,016	GS882890	0	0	b		
Lin96B8	2,22	1,1 ± 0,0	0,000	GS882891	0	0	b		
Lin100F11	2,57	1,4 ± 0,3	0,014	GS882892	0	5e-137	b		
Lin105H10	2,04	1,0 ± 0,3	0,022	GS882877	0	0	b	LinJ18_V3.0570	Proteína hipotética conservada
Lin109E12	2,06	1,0 ± 0,2	0,008	GS882893	3e-166	0	b		
Lin111F8	2,07	1,0 ± 0,1	0,003	GS882894	1e-140	1e-137	b		
Lin122B2	2,11	1,1 ± 0,2	0,014	GS882878	0	0	b	LinJ19_V3.1490 LinJ19_V3.1500	Proteína de tipo oxidoreductasa Proteína hipotética conservada
Lin122H12	2,09	1,1 ± 0,3	0,023	GS882895	0	0	b		
Lin124D12	2,43	1,3 ± 0,1	0,001	GS882896	0	0	b		
Lin125A7	2,16	1,1 ± 0,3	0,022	GS882782	0	0	c	LinJ31_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin127A1	2,94	1,6 ± 0,1	0,000	GS882897	0	0	b		
Lin131C1	2,23	1,2 ± 0,4	0,044	GS882879	0	0	b	LinJ10_V3.0080 LinJ10_V3.0090	Proteína hipotética conservada Proteína con repeticiones WD, putativa
Lin132C4	2,32	1,2 ± 0,2	0,009	GS882880	0	0	a	LinJ21_V3.2040 LinJ21_V3.2050	Proteína hipotética conservada Proteína de unión a ARN reguladora (familia pumilio), putativa

Anexo IV

Continuación Tabla A7

Lin132C5	2,16	1,1 ± 0,3	0,028	GS882898	0	0	a		
Lin139B3	3,12	1,6 ± 0,5	0,030	GS882881	0	0	b	LinJ16_V3.0460	Proteína hipotética conservada
								LinJ16_V3.0470	Proteína ribosómica 60S L21, putativa
Lin145E8	4,08	2,0 ± 0,2	0,004	GS882791	0	-	c	LinJ23_V3.1380	Proteína hipotética, función desconocida
Lin149C8	2,48	1,3 ± 0,5	0,042	GS882899	0	0	a		
Lin166G8	2,54	1,3 ± 0,2	0,005	GS882900	0	0	b		
Lin174G2	2,68	1,4 ± 0,6	0,049	GS882901	0	0	b		
Lin189F2	2,09	1,1 ± 0,3	0,025	GS882902	0	0	b		
Lin202D11	2,62	1,4 ± 0,3	0,013	GS882882	0	0	b	LinJ06_V3.0340	Proteína de tipo serina peptidasa, clan SC, familia S9A
								LinJ06_V3.0350	Proteína de tipo esteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(p)
								LinJ06_V3.0360	Proteína hipotética conservada
Lin202G8	20,1	1,0 ± 0,3	0,033	GS882883	0	0	b	LinJ06_V3.0340	Proteína de tipo serina peptidasa, clan SC, familia S9A
								LinJ06_V3.0350	Proteína de tipo esteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(p)
								LinJ06_V3.0360	Proteína hipotética conservada
Lin205G10	2,69	1,4 ± 0,4	0,029	GS882903	0	0	a		
Lin209B6	2,34	1,2 ± 0,1	0,001	GS882904	0	0	b		
Lin209H1	2,50	1,3 ± 0,2	0,012	GS882884	0	0	a	LinJ20_V3.0030	Proteína hipotética conservada
								LinJ20_V3.0040	Fosfatasa permeasa reprimible por fosfato
Lin211G3	2,58	1,4 ± 0,1	0,002	GS882885	5e-171	0	b	LinJ27_V3.0610	Proteína hipotética conservada
								LinJ27_V3.0620	Proteína pequeña de unión a GTP Rab1, putativa
Lin213C10	2,38	1,3 ± 0,2	0,010	GS882905	8e-37	0	b		
Lin215C12	2,34	1,2 ± 0,3	0,024	GS882906	6e-87	4e-91	a		
Lin216D9	3,12	1,6 ± 0,2	0,004	GS882907	0	0	b		
Lin219D1	1,81	0,9 ± 0,3	0,037	GS882843	0	0	c	LinJ02_V3.0720	Proteína hipotética conservada
								LinJ02_V3.0730	Proteína hipotética conservada
								LinJ02_V3.0740	Proteína hipotética conservada
								LinJ27_V3.2470	Proteína hipotética conservada
Lin224B12	2,71	1,4 ± 0,3	0,010	GS882886	0	0	b	LinJ33_V3.0220	Proteína hipotética, función desconocida
Lin225C1	2,30	1,2 ± 0,3	0,016	GS882809	2e-71	3e-83	b	LinJ29_V3.1250	Triparedoxina
								LinJ29_V3.1260	Proteína hipotética conservada
Lin225G6	2,24	1,2 ± 0,4	0,044	GS882908	0	1e-156	b		
Lin229G11	3,05	1,6 ± 0,2	0,004	GS882887	0	0	a	LinJ23_V3.0340	Triptofanil-ARNt sintasa, putativa
								LinJ23_V3.0350	Proteína hipotética conservada
Lin241G4	2,34	1,2 ± 0,3	0,021	GS882909	3e-178	0	b		
Lin252G9	2,22	1,1 ± 0,4	0,038	GS882822	-	0	c	LinJ31_V3.1340	Proteína hipotética conservada
Lin280B7	3,86	1,9 ± 0,6	0,030	GS882910	0	0	b		
Lin284G3	2,15	1,1 ± 0,4	0,041	GS882911	0	2e-176	b		
Lin288F7	3,69	1,9 ± 0,3	0,006	GS882912	0	0	b		
Lin252E9	2,44	1,3 ± 0,5	0,039	GS882913	0	0	b		
Lin256D11	3,81	1,9 ± 0,4	0,016	GS882914	0	0	b		
Lin257F10	2,25	1,2 ± 0,2	0,011	GS882915	0	0	b		
Lin271H5	2,11	1,1 ± 0,0	0,001	GS882916	5e-137	1e-137	b		
Lin272G8	2,57	1,4 ± 0,0	0,000	GS882917	0	0	b		
Lin302C2	2,55	1,4 ± 0,5	0,037	GS882888	7e-161	0	b	LinJ15_V3.1140	Triparedoxina peroxidasa
								LinJ15_V3.1150	Proteína hipotética conservada
Lin309G6	2,17	1,1 ± 0,4	0,046	GS882889	0	0	a	LinJ34_V3.2580	Proteína de tipo metiltransferasa
								LinJ34_V3.2590	Proteína hipotética conservada
Lin4B9	-2,40	-1,3 ± 0,2	0,05	GS882941	0	0	c	LinJ29_V3.1450	Proteína de tipo amastina
								LinJ06_V3.1280	Proteína hipotética conservada
								LinJ06_V3.1290	Proteína hipotética conservada
								LinJ06_V3.1300	Proteína hipotética conservada
Lin7H4	-3,07	-1,6 ± 0,1	0,001	GS882942	5e-119	-	c	LinJ29_V3.3010	Amastina, putativa
								LinJ29_V3.3020	Proteína de tipo tuzina, putativa
Lin8D4	-2,00	-1,0 ± 0,3	0,024	GS882918	0	0	b		
Lin22G2	-16,58	-4,1 ± 0,4	0,003	GS882919	0	0	b		
Lin25B8	-2,08	-1,1 ± 0,1	0,003	GS882920	0	6e-161	b		
Lin25B12	-1,88	-0,9 ± 0,3	0,038	S28B4	0	-	c	Lin29_V3.2310	Proteína de unión a GTP, putativa
								Lin29_V3.2320	Proteína hipotética conservada
Lin25C5	-2,70	-1,4 ± 0,0	0,000	GS882921	0	4e-113	b		
Lin32G7	-2,17	-1,1 ± 0,1	0,003	GS882922	5e-134	0	b		
Lin37B3	-2,14	-1,1 ± 0,4	0,047	GS882923	-	4e-141	c	LinJ31_V3.3100	Proteína hipotética conservada
								LinJ31_V3.3110	Proteína hipotética, función desconocida
Lin37E5	-1,88	-0,9 ± 0,3	0,028		0	0	a	LinJ27_V3.0970	Proteína hipotética conservada
								LinJ27_V3.0980	gBP21, MRP1
Lin46H3	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,012	GS882943	1e-128	0	c	LinJ27_V3.1950	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados, putativa
								LinJ27_V3.1960	Proteína hipotética conservada
Lin58D8	-1,72	-0,8 ± 0,2	0,020	GS882944	0	0	b	Lin35_V3.3620	Proteína hipotética conservada
								LinJ15_V3.0340	Proteína hipotética conservada
								LinJ15_V3.0350	Ecotina, putativa
Lin129F11	-3,19	-1,7 ± 0,6	0,035	GS882945	-	0	c	LinJ15_V3.0360	Proteína hipotética, función desconocida
								LinJ22_V3.0630	Serina/treonina proteína quinasa SOS2, putativa
								LinJ22_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin137B5	-1,83	-0,9 ± 0,3	0,032	GS882924	0	0	b	LinJ35_V3.1930	Proteína hipotética conservada
								LinJ35_V3.1940	Proteína hipotética conservada
								LinJ35_V3.1950	Proteína ribosómica L32
Lin144G1	-1,93	-0,9 ± 0,3	0,026	GS882946	0	0	c	LinJ36_V3.0120	Proteína hipotética conservada
								LinJ36_V3.0130	Proteína de metilación del cap del ARNm, putativa
								LinJ31_V3.1450	Proteína hipotética conservada
								LinJ31_V3.1460	Glicoproteína de tipo P
Lin162A9	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,014	GS882947	0	0	b	LinJ22_V3.0470	Proteína hipotética conservada
								LinJ22_V3.0480	Enzima de tipo conjugante de ubiquitina
Lin164F3	-2,28	-1,2 ± 0,4	0,038	GS882925	0	0	b		
Lin165D2	-2,10	-1,1 ± 0,4	0,045	GS882926	0	7e-127	b		
Lin172A9	-2,00	-1,0 ± 0,4	0,047	GS882948	0	0	a	LinJ06_V3.1200	Proteína hipotética conservada
								LinJ06_V3.1210	Factor de transporte nuclear 2 (NTF2), putativa
Lin184D12	-2,27	-1,2 ± 0,5	0,047	GS882927	0	0	b		
Lin198E5	-1,75	-0,8 ± 0,1	0,002	GS882928	0	3e-150	b		
Lin199B4	-1,92	-0,9 ± 0,2	0,017	GS882929	0	9e-148	b		
Lin200H6	-12,07	-3,6 ± 1,5	0,055	GS882930	3e-36	7e-59	b		
Lin201F12	-1,79	-0,8 ± 0,3	0,038	GS882949	0	0	b	LinJ36_V3.6360	Proteína hipotética conservada
								LinJ36_V3.6360	Centrina, putativa
Lin209D12	-1,77	-0,8 ± 0,1	0,006	GS882931	4e-45	1e-60	b		

Continuación Tabla A7

Lin211C5	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,022	GS882932	0	0	b		
Lin216A8	-1,81	-0,9 ± 0,3	0,029	GS882933	0	0	a		
Lin224B5	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,017	GS882950	0	0	b	LinJ16_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin226G7	-1,84	-0,9 ± 0,3	0,041	GS882951	0	0	c	LinJ16_V3.0730	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C19, putativa
Lin244G7	-3,25	-1,7 ± 0,7	0,046	GS882934	3e-67	7e-65	a	LinJ15_V3.0490	Proteína hipotética
Lin301G2	-2,51	-1,3 ± 0,5	0,047	GS882935	0	0	b	LinJ22_V3.1120	Poliproteína, putativa
Lin285C9	-2,15	-1,1 ± 0,1	0,004	GS882936	0	0	b		
Lin287B10	-3,36	-1,7 ± 0,3	0,008	GS882937	0	0	b		
Lin294H2	-1,75	-0,8 ± 0,3	0,048	GS882938	0	0	b		
Lin297C3	-2,52	-1,3 ± 0,1	0,002	GS882952	0	0	b	LinJ36_V3.6750	Proteína hipotética conservada
Lin297H12	-2,18	-1,1 ± 0,2	0,015	GS882939	0	0	b	LinJ36_V3.6760	MAP quinasa, putativa
Lin300A12	-1,81	-0,9 ± 0,3	0,029	GS882940	0	6e-115	b		
Lin301A6	-1,80	-0,8 ± 0,4	0,053	GS882854	6e-118	0	c	LinJ26_V3.2190	Proteína hipotética conservada
								LinJ26_V3.2200	Proteína hipotética conservada
								LinJ26_V3.2210	Proteína hipotética conservada
								LinJ26_V3.2220	Proteína hipotética conservada

Tabla A8. Clones que contienen probablemente genes ARNg diferencialmente expresados en los estadios fundamentales del ciclo biológico de *L. infantum*.

Clon	Exp. dif.	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Contenido
Lin100B7	uE/L	1,72	0,8 ± 0,2	0,029	GS882953	Contig 917. Posible secuencia de micirculo
Lin110D9		1,75	0,8 ± 0,1	0,006	GS882954	Contig 957. Posible secuencia de micirculo
Lin117A10		1,73	0,8 ± 0,2	0,023	GS882955	Contig 957. Posible secuencia de micirculo
Lin232H8		2,01	1,0 ± 0,1	0,004	GS882956	Contig 957. Posible secuencia de micirculo
Lin228H1	dE/A	-2,10	-1,1 ± 0,1	0,036	GS882957	Contig 957. Posible secuencia de micirculo
Lin43C12	dL/A	-19,32	-4,3 ± 1,7	0,048	GS882958	Contig 957. Posible secuencia de micirculo

Tabla A9. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresados en promastigotes PNA⁺.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin15B10	-2,22	-1,1 ± 0,3	0,019	FI104200	0	0	b	LinJ32_V3.3750 LinJ32_V3.3760 LinJ32_V3.3770 LinJ32_V3.3780	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin25D9	-2,29	-1,2 ± 0,4	0,033	FI104201	0	0	b	LinJ31_V3.0380 LinJ31_V3.0390	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin29D9	-7,61	-2,9 ± 0,8	0,023	FI104202	-	0	c	LinJ28_V3.1290	Proteína hipotética conservada
Lin42F4	-2,03	-1,0 ± 0,2	0,008	FI104203	0	0	a	LinJ20_V3.1470	Proteína hipotética conservada
Lin49C1	-2,73	-1,4 ± 0,4	0,021	FI104204	0	0	b	LinJ36_V3.4930 LinJ36_V3.4940	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin50C5	-2,07	-1,0 ± 0,3	0,025	FI104205	0	0	a	LinJ20_V3.0560	Proteína hipotética
Lin52F6	-2,01	-1,0 ± 0,3	0,024	FI104206	0	0	a	LinJ26_V3.1770 LinJ26_V3.1780	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin84D8	-2,11	-1,1 ± 0,2	0,008	FI104124	8e-68	5e-66	b	LinJ35_V3.3270	Proteína hipotética conservada
Lin84H2	-2,13	-1,1 ± 0,1	0,001	FI104207	0	0	a	LinJ31_V3.1110	Proteína hipotética conservada
Lin86A11	-2,17	-1,1 ± 0,1	0,004	FI104208	0	0	a	LinJ05_V3.0080	Proteína hipotética conservada
Lin90F10	-2,31	-1,2 ± 0,3	0,023	FI104209	0	0	c	LinJ24_V3.1390	Proteína hipotética conservada
Lin95G10	-2,06	-1,0 ± 0,2	0,009	FI104210	0	0	a	LinJ22_V3.1420	Proteína hipotética conservada
Lin97B10	-2,01	-1,0 ± 0,2	0,012	FI104211	0	0	a	LinJ32_V3.3160 LinJ32_V3.3170 LinJ32_V3.3180	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada, pseudogén
Lin100C12	-2,30	-1,2 ± 0,1	0,002	FI104212	0	0	a	LinJ07_V3.0020 LinJ07_V3.0030	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin106E3	-2,40	-1,3 ± 0,2	0,012	FI104213	0	0	a	LinJ17_V3.1440	Proteína hipotética conservada
Lin108B9	-2,06	-1,0 ± 0,2	0,011	FI104214	0	0	a	LinJ25_V3.0410	Proteína hipotética conservada
Lin111A11	-2,73	-1,4 ± 0,2	0,009	FI104215	0	0	a	LinJ12_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin121G9	-2,05	-1,0 ± 0,1	0,002	FI104216	0	0	a	LinJ28_V3.0510 LinJ28_V3.0520	Proteína hipotética, función desconocida Proteína hipotética conservada
Lin140D6	-2,40	-1,3 ± 0,3	0,016	FI104217	0	0	a	LinJ13_V3.0140	Proteína hipotética conservada
Lin177B10	-2,03	-1,1 ± 0,2	0,017	FI104218	0	0	a	LinJ19_V3.0610	Proteína hipotética conservada
Lin178B6	-2,06	-1,1 ± 0,1	0,003	FI104219	0	-	c	LinJ19_V3.1220	Proteína hipotética conservada
Lin178D3	-2,09	-1,1 ± 0,3	0,026	FI104148	0	0	b	LinJ29_V3.2450	Proteína hipotética conservada
Lin182B9	-2,23	-1,2 ± 0,2	0,013	FI104220	0	0	a	LinJ27_V3.2100 LinJ27_V3.2110	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin187D12	-2,23	-1,2 ± 0,0	0,000	FI104221	4e-162	0	c	LinJ36_V3.2190	Proteína hipotética conservada
Lin188G10	-2,24	-1,2 ± 0,1	0,005	FI104222	0	0	a	LinJ28_V3.1290	Proteína hipotética conservada
Lin192F6	-2,49	-1,3 ± 0,2	0,008	FI104223	3e-129	7e-124	b	LinJ13_V3.0330	Desconocida
Lin193H8	-2,26	-1,2 ± 0,3	0,015	FI104224	0	0	a	LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida
Lin204D8	-2,04	-1,0 ± 0,1	0,002	FI104225	0	0	b	LinJ33_V3.0650 LinJ33_V3.0660 LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin220H6	-2,71	-1,4 ± 0,1	0,003	FI104226	0	0	a	LinJ31_V3.2340	Proteína hipotética conservada
Lin221C12	-2,31	-1,2 ± 0,3	0,018	FI104227	0	0	b	LinJ36_V3.3910 LinJ36_V3.3920	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin222H1	-2,19	-1,1 ± 0,3	0,021	FI104228	0	0	a	LinJ31_V3.0500	Proteína hipotética conservada
Lin223F2	-2,34	-1,2 ± 0,3	0,014	FI104229	0	0	b	LinJ13_V3.0330	Desconocida
Lin225A10	-2,46	-1,3 ± 0,2	0,008	FI104230	0	0	c	LinJ06_V3.0840 LinJ17_V3.0670	Proteína hipotética, función desconocida Proteína hipotética, función desconocida

Continuación Tabla A9

Lin226E2	-2,10	-1,1 ± 0,1	0,006	FI104231	0	0	b	LinJ21_V3.0780	Proteína hipotética conservada
Lin230F8	-2,47	-1,3 ± 0,1	0,002	FI104091	0	0	b	LinJ16_V3.1650	Proteína hipotética, función desconocida
Lin230F9	-2,07	-1,1 ± 0,4	0,045	FI104161	0	0	c	LinJ26_V3.2060	Proteína hipotética conservada
								LinJ31_V3.2740	Glutamil carboxipeptidasa (pseudogén), putativa
Lin232A11	-2,21	-1,1 ± 0,4	0,041	FI104232	0	0	a	LinJ09_V3.0890	Proteína hipotética conservada
Lin233D10	-2,00	-1,0 ± 0,2	0,017	FI104233	0	-	c	LinJ13_V3.0330	Desconocida
Lin238A1	-2,13	-1,1 ± 0,3	0,025	FI104234	0	0	a	LinJ08_V3.1160	Proteína hipotética conservada
								LinJ08_V3.1170	Proteína hipotética conservada
Lin264A6	-2,12	-1,1 ± 0,1	0,004	FI104235	0	0	a	LinJ01_V3.0500	Proteína predicha desconocida
Lin281F8	-2,12	-1,1 ± 0,3	0,032	FI104236	5e-171	5e-171	a	LinJ35_V3.4880	Proteína hipotética conservada
Lin289C7	-2,11	-1,1 ± 0,2	0,010	FI104237	0	0	a	LinJ12_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin310E8	-2,19	-1,1 ± 0,3	0,020	FI104238	0	0	b	LinJ29_V3.2860	Proteína hipotética conservada
								LinJ29_V3.2870	Proteína hipotética conservada

Tabla A10. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresados en promastigotes PNA⁻.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin4F12	4,82	2,3 ± 0,7	0,028	FI104048	0	0	a	LinJ31_V3.1950	Proteína hipotética conservada
Lin22D6	2,24	1,2 ± 0,4	0,030	FI104049	0	0	a	LinJ30_V3.1500	Proteína hipotética conservada
Lin22D8	2,01	1,0 ± 0,4	0,046	FI104050	0	0	a	LinJ36_V3.4530	Proteína hipotética conservada
Lin32A2	3,10	1,6 ± 0,4	0,018	FI104051	0	1e-143	c	LinJ31_V3.0330	Proteína hipotética conservada
Lin32F3	2,47	1,3 ± 0,4	0,032	FI104052	0	0	c	LinJ23_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin37B7	2,43	1,3 ± 0,4	0,032	FI104053	0	0	b	LinJ32_V3.3360	Proteína hipotética conservada
								LinJ32_V3.3370	Proteína hipotética conservada
								LinJ32_V3.3380	Proteína hipotética conservada
Lin42A6	2,02	1,0 ± 0,2	0,011	FI104054	0	2e-179	a	LinJ36_V3.5190	Proteína hipotética, función desconocida
Lin42G6	2,81	1,5 ± 0,1	0,002	FI104055	0	2e-179	b	LinJ31_V3.1740	Proteína hipotética conservada
Lin43F2	3,27	1,7 ± 0,5	0,023	FI104056	0	0	c	LinJ23_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin44F1	2,09	1,1 ± 0,4	0,042	FI104057	0	0	c	LinJ23_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin46G10	2,46	1,3 ± 0,3	0,019	FI104058	0	0	c	LinJ25_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin54F11	2,17	1,1 ± 0,1	0,002	FI104059	0	3e-138	a	LinJ36_V3.4830	Proteína hipotética conservada
								LinJ36_V3.4840	Proteína hipotética conservada
Lin56B5	2,12	1,1 ± 0,3	0,021	FI104060	0	0	a	LinJ36_V3.3090	Proteína hipotética conservada
Lin58D4	2,27	1,2 ± 0,4	0,040	FI104061	0	9e-117	c	LinJ25_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin62G5	4,41	2,1 ± 0,6	0,027	FI104062	0	0	b	LinJ26_V3.1840	Proteína hipotética conservada
Lin64A5	2,15	1,1 ± 0,4	0,046	FI104063	1e-149	0	b	LinJ35_V3.3240	Proteína hipotética conservada
Lin65C2	2,62	1,4 ± 0,2	0,009	FI104064	0	0	b	LinJ31_V3.2050	Proteína hipotética conservada
Lin66C5	2,08	1,1 ± 0,2	0,013	FI104065	0	0	a	LinJ36_V3.2080	Proteína hipotética conservada
Lin68B8	2,81	1,5 ± 0,6	0,047	FI104066	0	0	a	LinJ35_V3.2870	Proteína hipotética conservada
Lin68D6	2,13	1,1 ± 0,2	0,016	FI104067	3e-144	0	a	LinJ36_V3.5530	Proteína hipotética conservada
Lin71G9	2,29	1,2 ± 0,2	0,011	FI104068	0	0	a	LinJ05_V3.0940	Proteína hipotética conservada
Lin87G5	3,57	1,8 ± 0,6	0,039	FI104069	0	0	b	LinJ35_V3.5000	Proteína hipotética conservada
Lin89D3	2,22	1,1 ± 0,3	0,018	FI104070	0	0	a	LinJ25_V3.0270	Proteína hipotética conservada
								LinJ25_V3.0280	Proteína hipotética conservada
Lin89G10	2,24	1,2 ± 0,2	0,009	FI103935	3e-138	0	b	LinJ31_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida
Lin91C8	2,25	1,2 ± 0,3	0,018	FI104071	0	0	a	LinJ33_V3.1020	Proteína hipotética conservada
								LinJ30_V3.1240	Proteína hipotética conservada
Lin93C6	4,62	2,2 ± 0,8	0,040	FI104072	0	0	a	LinJ31_V3.2260	Proteína hipotética conservada
Lin99A11	2,72	1,4 ± 0,3	0,017	FI104073	0	0	c	LinJ20_V3.1610	Proteína hipotética conservada
Lin100H10	2,09	1,1 ± 0,1	0,001	FI104074	0	0	a	LinJ31_V3.2230	Proteína hipotética conservada
Lin103E3	2,95	1,6 ± 0,5	0,030	FI104075	0	0	b	LinJ34_V3.3770	Proteína hipotética conservada
Lin104H7	2,02	1,0 ± 0,4	0,041	FI104076	0	0	a	LinJ30_V3.0310	Proteína hipotética conservada
								LinJ30_V3.0320	Proteína hipotética conservada
								LinJ31_V3.1990	Proteína hipotética conservada
Lin111G4	3,76	1,9 ± 0,6	0,031	FI104077	0	0	c	LinJ27_V3.1870	Proteína hipotética conservada
Lin115G8	2,81	1,5 ± 0,4	0,029	FI104078	0	0	a	LinJ13_V3.0200	Proteína hipotética, función desconocida
Lin144E11	3,00	1,6 ± 0,4	0,018	FI104079	2e-124	0	b	LinJ29_V3.2240	Proteína hipotética conservada
Lin150F4	2,38	1,3 ± 0,5	0,046	FI104080	0	0	b	LinJ31_V3.2050	Proteína hipotética, función desconocida
Lin156A5	3,07	1,6 ± 0,5	0,035	FI104081	0	2e-124	a	LinJ29_V3.2240	Proteína hipotética conservada
Lin166C7	2,48	1,3 ± 0,3	0,018	FI104082	0	0	b	LinJ33_V3.3050	Proteína hipotética conservada
Lin175H9	2,32	1,2 ± 0,4	0,043	FI104083	0	0	b	LinJ31_V3.2240	Proteína hipotética, función desconocida
Lin187C4	2,00	1,00 ± 0,1	0,003	FI104084	0	0	a	LinJ29_V3.1190	Proteína hipotética conservada
								LinJ29_V3.1200	Proteína hipotética conservada
								LinJ19_V3.1500	Proteína hipotética conservada
								LinJ19_V3.1510	Proteína quinasa, putativa
Lin201G9	3,03	1,6 ± 0,6	0,040	FI104085	0	0	b	LinJ32_V3.3020	Proteína hipotética, función desconocida
Lin206E3	2,06	1,0 ± 0,0	0,001	FI104086	0	0	a	LinJ21_V3.1600	Proteína hipotética conservada
Lin206H11	5,02	2,3 ± 0,5	0,013	FI104087	3e-123	3e-129	a	LinJ29_V3.2240	Proteína hipotética conservada
Lin213A9	2,46	1,3 ± 0,5	0,050	FI104088	1e-128	7e-127	b	LinJ31_V3.0510	Proteína hipotética conservada
Lin214F11	2,36	1,2 ± 0,2	0,018	FI104089	0	6e-146	a	LinJ22_V3.0570	Proteína hipotética conservada
Lin222D6	2,15	1,1 ± 0,1	0,003	FI104090	0	0	b	LinJ36_V3.1340	Proteína hipotética conservada
Lin230F8	-2,47	-1,3 ± 0,1	0,002	FI104091	0	0	b	LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida
Lin239F4	2,02	1,0 ± 0,3	0,029	FI104092	0	4e-165	a	LinJ16_V3.1280	Proteína hipotética conservada
Lin240C12	2,62	1,4 ± 0,5	0,033	FI104093	2e-161	0	a	LinJ23_V3.1550	Proteína hipotética, función desconocida
Lin240H9	3,12	1,6 ± 0,4	0,018	FI104094	0	0	b	LinJ35_V3.1250	Proteína hipotética conservada
Lin262G5	2,16	1,1 ± 0,4	0,038	FI104095	0	0	b	LinJ12_V3.0510	Proteína hipotética, función desconocida
Lin269B10	2,52	1,3 ± 0,4	0,024	FI104096	4e-128	-	c	LinJ07_V3.0380	Proteína hipotética conservada
Lin308A5	2,06	1,0 ± 0,3	0,022	FI104097	0	5e-128	b	LinJ11_V3.0590	Proteína hipotética conservada

Tabla A11. Clones seleccionados en el análisis de expresión diferencial PNA^{+/-} no alineados con genes anotados en la secuencia genómica que mapean con anotaciones propias realizadas con *Glimmer*.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin197E6	-3,74	-1,9 ± 0,1	0,001	FI104189	0	0	c	LinJ27_Gdef.00572	Desconocido
Lin199E11	-2,06	-1,0 ± 0,1	0,005	FI104190	5e-103	0	b	LinJ36_Gdef.00528	Desconocido
Lin249D12	-2,25	-1,2 ± 0,2	0,008	FI104195	0	0	a	LinJ26_Gdef.00023	Desconocido
Lin251D10	-2,46	-1,3 ± 0,3	0,016	FI104196	0	0	c	LinJ27_Gdef.00567	Desconocido
Lin285F4	-2,35	-1,2 ± 0,2	0,008	FI104199	0	0	a	LinJ27_Gdef.00572 LinJ14_Gdef.00309 LinJ14_Gdef.00311	Desconocido
Lin14B6	4,24	2,1 ± 0,5	0,017	FI103969	0	5e-171	b	LinJ31_Gdef.00289	Desconocido
Lin36F5	2,26	1,2 ± 0,3	0,019	FI103977	0	0	b	LinJ30_Gdef.00382	Desconocido
Lin64B8	5,72	2,5 ± 0,6	0,017	FI103979	5e-103	4e-91	b	LinJ34_Gdef.00259 LinJ34_Gdef.00260 LinJ34_Gdef.00261	Desconocido
Lin73G6	3,17	1,7 ± 0,3	0,008	FI103983	0	5e-109	b	LinJ35_Gdef.00875	Desconocido
Lin89E6	2,12	1,1 ± 0,3	0,026	FI103987	0	0	b	LinJ35_Gdef.00876 LinJ36_Gdef.00159	Desconocido
Lin89E7	3,01	1,6 ± 0,3	0,015	FI103988	0	7e-133	b	LinJ36_Gdef.00160 LinJ18_Gdef.00047	Desconocido
Lin90C8	2,71	1,4 ± 0,4	0,023	FI103989	0	5e-146	c	LinJ18_Gdef.00048 LinJ10_Gdef.00118 LinJ19_Gdef.00142	Desconocido
Lin113D11	2,04	1,0 ± 0,1	0,006	FI103996	1e-137	0	b	LinJ22_Gdef.00374 LinJ22_Gdef.00375	Desconocido
Lin113G1	3,65	1,9 ± 0,2	0,003	FI103997	0	0	b	LinJ31_Gdef.00658	Desconocido
Lin123G8	2,27	1,2 ± 0,4	0,041	FI104000	0	5e-174	c	LinJ35_Gdef.00741 LinJ12_Gdef.00287 LinJ12_Gdef.00288	Desconocido
Lin126A12	2,24	1,2 ± 0,4	0,037	FI104001	0	0	c	LinJ03_Gdef.00014 LinJ03_Gdef.00019 LinJ30_Gdef.00383	Desconocido
Lin137D11	2,89	1,5 ± 0,4	0,025	FI104002	0	0	c	LinJ30_Gdef.00384 LinJ03_Gdef.00014 LinJ03_Gdef.00019	Desconocido
Lin142F6	2,85	1,5 ± 0,5	0,030	FI104003	4e-156	0	b	LinJ30_Gdef.00383 LinJ30_Gdef.00384	Desconocido
Lin170B10	2,87	1,5 ± 0,4	0,025	FI104006	0	0	b	LinJ35_Gdef.00951 LinJ35_Gdef.00952	Desconocido
Lin170C6	3,22	1,7 ± 0,5	0,026	FI104007	0	0	c	LinJ33_Gdef.00466 LinJ33_Gdef.00467 LinJ33_Gdef.00468	Desconocido
Lin187G6	4,19	2,1 ± 0,4	0,012	FI104010	0	0	b	LinJ30_Gdef.00382 LinJ30_Gdef.00383	Desconocido
Lin197E8	2,16	1,1 ± 0,3	0,026	FI104013	0	1e-156	b	LinJ30_Gdef.00384 LinJ12_Gdef.00196 LinJ33_Gdef.00609	Desconocido
Lin201D9	2,14	1,1 ± 0,4	0,043	FI104014	0	0	c	LinJ33_Gdef.00611 LinJ32_Gdef.00767 LinJ32_Gdef.00768	Desconocido
Lin206H5	3,84	1,9 ± 0,7	0,036	FI104019	8e-108	8e-108	b	LinJ32_Gdef.00770	Desconocido
Lin243C4	2,06	1,0 ± 0,2	0,018	FI104028	3e-107	0	b	LinJ24_Gdef.00349	Desconocido
Lin245E12	2,10	1,1 ± 0,4	0,036	FI104029	2e-170	0	b	LinJ22_Gdef.00123	Desconocido
Lin248A9	2,12	1,1 ± 0,3	0,021	FI104030	3e-157	-	c	LinJ11_Gdef.00354	Desconocido
Lin251C12	2,11	1,1 ± 0,3	0,033	FI104031	0	-	c	LinJ06_Gdef.00305	Desconocido
Lin263H2	3,14	1,6 ± 0,4	0,018	FI104035	0	0	b	LinJ06_Gdef.00305	Desconocido
Lin288F7	2,02	1,0 ± 0,4	0,039	FI104039	0	0	b	LinJ31_Gdef.00282	Desconocido
Lin292D2	2,06	1,0 ± 0,3	0,026	FI104040	2e-130	0	b	LinJ31_Gdef.00348	Desconocido
Lin295G6	2,28	1,2 ± 0,4	0,042	FI104042	0	0	b	LinJ31_Gdef.00264	Desconocido
Lin304G6	2,33	1,2 ± 0,4	0,036	FI104044	0	0	b	LinJ35_Gdef.00576	Desconocido
Lin305F7	2,07	1,1 ± 0,4	0,041	FI104045	0	0	b	LinJ31_Gdef.00315 LinJ12_Gdef.00062	Desconocido
								LinJ12_Gdef.00064	Desconocido

Tabla A12. Clones que contienen genes diferencialmente expresados en promastigotes PNA^{+/-} no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.
					Fw	Rv	
Lin5C7	-2,26	-1,2 ± 0,2	0,011	FI104174	5e-69	2e-96	b
Lin16A1	-2,34	-1,2 ± 0,4	0,033	FI104175	3e-178	0	b
Lin17G11	-2,01	-1,0 ± 0,2	0,014	FI104176	5e-180	0	b
Lin27G5	-3,02	-1,6 ± 0,1	0,002	FI104177	2e-77	5e-75	b
Lin50F4	-2,08	-1,1 ± 0,3	0,019	FI104178	0	1e-150	b
Lin54B4	-2,61	-1,4 ± 0,1	0,001	FI104179	5e-180	0	b
Lin69A2	-2,43	-1,3 ± 0,1	0,003	FI104180	2e-59	2e-59	b
Lin69A11	-3,25	-1,7 ± 0,2	0,003	FI104181	1e-152	1e-152	a
Lin76D2	-2,36	-1,2 ± 0,4	0,039	FI104182	7e-59	7e-59	b
Lin86H3	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,007	FI104183	5e-143	2e-130	a
Lin109C6	-2,69	-1,4 ± 0,0	0,000	FI104184	5e-174	0	a

Continuación Tabla A12

Lin109E6	-2,53	-1,3 ± 0,4	0,033	FI104185	1e-66	2e-68	b
Lin158D9	-2,05	-1,0 ± 0,1	0,005	FI104186	0	0	b
Lin177E10	-2,39	-1,3 ± 0,2	0,005	FI104187	3e-67	4e-91	b
Lin189F2	-2,54	-1,3 ± 0,1	0,003	FI104188	0	0	b
Lin204F3	-2,51	-1,3 ± 0,4	0,034	FI104191	0	0	b
Lin209F1	-2,30	-1,2 ± 0,2	0,007	FI104192	6e-16	2e-12	b
Lin232C11	-2,04	-1,0 ± 0,4	0,042	FI104193	2e-65	1e-54	b
Lin238B12	-2,11	-1,1 ± 0,2	0,008	FI104194	2e-96	2e-99	b
Lin257F10	-2,57	-1,4 ± 0,2	0,006	FI104197	0	0	b
Lin258E1	-2,01	-1,0 ± 0,2	0,008	FI104198	0	1e-168	b
Lin2E10	2,46	1,3 ± 0,3	0,021	FI103965	1e-69	3e-83	b
Lin2H2	3,53	1,8 ± 0,6	0,037	FI103966	0	9e-117	b
Lin8D12	2,52	1,3 ± 0,5	0,044	FI103967	0	1e-128	b
Lin10F7	2,29	1,2 ± 0,4	0,034	FI103968	0	0	b
Lin14E1	2,52	1,3 ± 0,5	0,015	FI103970	0	0	b
Lin20H2	2,68	1,4 ± 0,4	0,028	FI103971	0	0	b
Lin21D2	2,10	1,1 ± 0,2	0,011	FI103972	0	0	b
Lin23G3	2,01	1,0 ± 0,2	0,018	FI103973	0	0	b
Lin25G8	3,80	1,9 ± 0,3	0,010	FI103974	1e-140	1e-140	b
Lin26F8	2,95	1,6 ± 0,3	0,013	FI103975	7e-25	1e-51	a
Lin33H5	2,60	1,4 ± 0,5	0,042	FI103976	5e-120	0	b
Lin60E8	2,53	1,3 ± 0,4	0,033	FI103978	0	0	b
Lin64D9	3,63	1,9 ± 0,2	0,003	FI103980	0	0	b
Lin66B5	3,12	1,6 ± 0,3	0,012	FI103981	2e-59	0	b
Lin70E10	6,50	2,7 ± 0,8	0,025	FI103982	4e-42	6e-121	b
Lin74B4	2,25	1,2 ± 0,4	0,036	FI103984	0	0	a
Lin76F2	2,09	1,1 ± 0,2	0,011	FI103985	3e-141	0	b
Lin81E11	2,54	1,3 ± 0,3	0,013	FI103986	3e-55	0	b
Lin94H9	2,19	1,1 ± 0,2	0,015	FI103990	1e-88	0	a
Lin96B8	2,30	1,2 ± 0,3	0,015	FI103991	0	0	b
Lin96H9	2,23	1,2 ± 0,2	0,010	FI103992	0	0	b
Lin106F7	2,39	1,3 ± 0,2	0,011	FI103993	0	0	b
Lin107B11	2,43	1,3 ± 0,1	0,004	FI103994	9e-151	9e-151	b
Lin108A2	2,16	1,1 ± 0,4	0,046	FI103995	0	2e-170	b
Lin117B4	2,20	1,1 ± 0,0	0,000	FI103998	7e-50	1e-51	a
Lin120H2	2,19	1,1 ± 0,4	0,035	FI103999	0	0	b
Lin145C3	3,23	1,7 ± 0,5	0,029	FI104004	0	0	b
Lin161C1	2,03	1,0 ± 0,4	0,040	FI104005	0	0	a
Lin187A8	2,30	1,2 ± 0,3	0,026	FI104008	0	0	b
Lin187B5	2,07	1,0 ± 0,2	0,016	FI104009	0	0	b
Lin189A11	2,68	1,4 ± 0,3	0,018	FI104011	0	0	b
Lin192B4	2,61	1,4 ± 0,2	0,009	FI104012	0	0	b
Lin203D8	2,64	1,4 ± 0,2	0,006	FI104015	2e-71	3e-73	b
Lin205H10	2,85	1,5 ± 0,3	0,012	FI104016	0	0	a
Lin206B1	3,49	1,8 ± 0,5	0,024	FI104017	0	0	b
Lin206D9	3,70	1,9 ± 0,4	0,013	FI104018	1e-128	7e-127	b
Lin220C2	3,22	1,7 ± 0,4	0,020	FI104020	5e-171	0	b
Lin226B9	2,25	1,2 ± 0,1	0,001	FI104021	1e-149	0	b
Lin229H8	2,47	1,3 ± 0,5	0,039	FI104022	0	7e-124	b
Lin231E9	2,55	1,3 ± 0,1	0,003	FI104023	0	0	b
Lin233G9	2,83	1,5 ± 0,4	0,018	FI104024	2e-154	4e-125	b
Lin236D10	2,18	1,1 ± 0,2	0,014	FI104025	2e-84	0	b
Lin237B10	2,04	1,0 ± 0,1	0,002	FI104026	9e-157	0	b
Lin238G7	2,20	1,1 ± 0,3	0,027	FI104027	0	0	a
Lin252C12	2,34	1,2 ± 0,4	0,041	FI104032	4e-165	1e-100	b
Lin260E9	2,09	1,1 ± 0,3	0,018	FI104033	1e-180	3e-178	b
Lin260H1	4,46	2,2 ± 0,3	0,006	FI104034	1e-171	0	b
Lin267C4	2,03	1,0 ± 0,3	0,029	FI104036	8e-145	8e-145	a
Lin268D9	2,10	1,1 ± 0,1	0,004	FI104037	0	0	b
Lin276E1	3,07	1,6 ± 0,3	0,015	FI104038	4e-23	0	b
Lin295B9	2,01	1,0 ± 0,2	0,009	FI104041	0	0	b
Lin304E6	2,21	1,1 ± 0,4	0,045	FI104043	5e-29	8e-142	b
Lin312D10	2,53	1,3 ± 0,2	0,005	FI104046	0	0	b
Lin312F3	5,54	2,5 ± 0,5	0,015	FI104047	1e-137	0	b

Tabla A13. Clones que contienen probablemente genes ARNg diferencialmente expresados en promastigotes PNA^{±/-}.

Clon	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Contenido
Lin123A10	1,3 ± 0,5	0,040	FI104098	Contig 903. Posible secuencia de minicírculos.
Lin194D3	1,0 ± 0,4	0,046	FI104099	Contig 903. Posible secuencia de minicírculos.
Lin220G1	1,5 ± 0,6	0,040	FI104100	Contig 903. Posible secuencia de minicírculos.
Lin180E1	1,5 ± 0,5	0,040	FI104101	Contig 873. Posible secuencia de minicírculos.
Lin189H9	1,8 ± 0,6	0,032	FI104102	Contig 873. Posible secuencia de minicírculos.
Lin52F3	1,0 ± 0,4	0,040	FI104103	Contig 917. Posible secuencia de minicírculos.
Lin53B11	1,4 ± 0,2	0,007	FI104104	Contig 917. Posible secuencia de minicírculos.
Lin253D9	1,8 ± 0,7	0,044	FI104105	Contig 917. Posible secuencia de minicírculos.
Lin135H7	1,1 ± 0,1	0,002	FI104106	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin148A12	1,0 ± 0,4	0,044	FI104107	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin273H7	2,4 ± 0,9	0,049	FI104108	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.

Tabla A14. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e	Def.	Anotación	Función génica anotada	qRT-PCR	
					Fw	Rv			+/- F ± S	
Lin21E6	2,91	1,5 ± 0,0	0,000	GS599047	0	0	b	LinJ20_V3.1060	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin44H5	1,71	0,8 ± 0,2	0,023	GS599048	0	0	b	LinJ31_V3.0090	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ31_V3.0100	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin45D9	1,83	0,9 ± 0,2	0,020	GS599049	0	0	b	LinJ20_V3.0430	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin56E9	2,74	1,5 ± 0,1	0,001	GS599050	3e-52	2e-120	b	LinJ06_V3.0830	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin59C10	1,80	0,8 ± 0,20	0,018	GS599051	0	1e-180	b	LinJ36_V3.2950	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ36_V3.2960	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin66F8	1,92	0,9 ± 0,2	0,017	GS598865	0	3e-132	a	LinJ33_V3.2470	Succinil-CoA:3-cetoácido CoA transferasa	- 1,4 ± 0,2
								LinJ33_V3.2480	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin71E8	1,82	0,9 ± 0,3	0,032	GS599052	0	0	b	LinJ26_V3.1780	Proteína hipotética	N.D.
Lin76G6	1,97	1,0 ± 0,1	0,005	GS599053	0	0	b	LinJ31_V3.2730	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin77G12	1,82	0,9 ± 0,3	0,042	GS599054	0	0	b	LinJ32_V3.1720	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin99C10	1,99	1,0 ± 0,3	0,023	GS599055	0	0	b	LinJ02_V3.0470	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin103F2	3,30	1,7 ± 0,2	0,004	GS599056	0	0	b	LinJ32_V3.2450	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin106B1	1,77	0,8 ± 0,2	0,015	GS599057	0	0	b	LinJ36_V3.5150	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin134A3	2,40	1,3 ± 0,3	0,013	GS599059	0	0	b	LinJ04_V3.0630	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ04_V3.0640	Proteína hipotética	N.D.
Lin135E9	1,77	0,8 ± 0,3	0,042	GS599060	0	0	b	LinJ34_V3.0060	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ34_V3.0070	Peroxidasa dependiente de ascorbato, putativa	- -1,2 ± 0,3
Lin151D9	1,76	0,8 ± 0,2	0,011	GS599061	0	1e-102	b	LinJ30_V3.3210	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.3220	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.3230	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin154G1	1,80	0,9 ± 0,2	0,013	GS599062	0	3e-120	b	LinJ30_V3.3210	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.3220	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.3230	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin156B2	1,82	0,9 ± 0,2	0,025	GS598883	0	0	b	LinJ33_V3.2960	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin181E2	1,99	1,0 ± 0,3	0,035	GS599063	0	0	c	LinJ22_V3.1460	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin183A3	1,75	0,8 ± 0,1	0,010	GS598886	0	0	b	LinJ24_V3.2250	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin200D12	1,80	0,8 ± 0,2	0,021	GS599064	0	0	b	LinJ25_V3.0650	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ25_V3.0660	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin220H6	1,85	0,9 ± 0,1	0,007	GS599065	0	0	a	LinJ31_V3.2340	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin223F2	1,73	0,8 ± 0,3	0,044	GS598894	0	0	b	LinJ13_V3.0330	Desconocidos	N.D.
Lin232F6	1,83	0,9 ± 0,1	0,006	GS599066	0	0	b	LinJ17_V3.0020	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ17_V3.0030	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ17_V3.0040	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin254B10	2,24	1,2 ± 0,5	0,045	GS599067	0	0	b	LinJ19_V3.1200	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ19_V3.1210	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin6A1	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,015	GS599068	0	2e-130	b	LinJ18_V3.0810	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin3H4	-1,98	-1,0 ± 0,0	0,001	GS599069	5e-72	1e-125	b	LinJ23_V3.0420	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin11F2	-2,07	-1,1 ± 0,2	0,013	GS599070	0	0	b	LinJ25_V3.2090	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin13F5	-1,77	-0,8 ± 0,3	0,031	GS599071	0	0	b	LinJ09_V3.1540	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ09_V3.1550	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ09_V3.1560	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin15G8	-1,92	-0,9 ± 0,3	0,024	GS599072	4e-76	3e-86	b	LinJ23_V3.0420	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin16F5	-1,84	-0,9 ± 0,2	0,011	GS599073	1e-180	0	b	LinJ24_V3.0590	Proteína hipotética con múltiples dominios transmembrana	N.D.
Lin31E6	-1,72	-0,8 ± 0,3	0,035	GS599074	0	3e-120	b	LinJ25_V3.0790	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin58A11	-2,00	-1,0 ± 0,4	0,043	GS599075	8e-176	0	b	LinJ35_V3.3190	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin60E5	-1,80	-0,8 ± 0,3	0,035	GS598921	0	0	b	LinJ26_V3.0970	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin61D3	-1,92	-0,9 ± 0,1	0,005	GS599076	0	0	b	LinJ31_V3.0330	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin70D3	-2,07	-1,0 ± 0,4	0,042	GS599077	0	0	a	LinJ31_V3.1210	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin74F6	-1,88	-0,9 ± 0,1	0,005	GS599078	0	0	a	LinJ29_V3.1820	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ29_V3.1830	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin78F3	-3,15	-1,7 ± 0,1	0,002	GS599079	0	0	b	LinJ26_V3.0970	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ26_V3.0980	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin97F6	-1,80	-0,8 ± 0,3	0,029	GS598932	0	0	b	LinJ26_V3.0460	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin105B4	-2,39	-1,3 ± 0,2	0,009	GS599080	0	0	b	LinJ14_V3.1110	Desconocidos	N.D.
								LinJ14_V3.1120	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin105B8	-5,59	-2,5 ± 0,4	0,010	GS599081	0	0	b	LinJ14_V3.1110	Desconocidos	N.D.
								LinJ14_V3.1120	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin112D11	-1,94	-1,0 ± 0,2	0,021	GS599082	1e-54	0	b	LinJ31_V3.2430	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin122H8	-1,74	-0,8 ± 0,3	0,036	GS599083	0	0	b	LinJ32_V3.1600	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ32_V3.1610	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ32_V3.1620	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin124H4	-2,89	-1,5 ± 0,5	0,001	GS599084	0	0	b	LinJ23_V3.0700	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin128A3	-1,71	-0,8 ± 0,2	0,013	GS599085	0	0	b	LinJ08_V3.0430	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin148G1	-1,70	-0,8 ± 0,1	0,002	GS599086	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin155G12	-2,81	-1,5 ± 0,2	0,004	GS599087	7e-133	2e-19	a	LinJ35_V3.3770	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ35_V3.3780	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin158A10	-2,40	-1,3 ± 0,2	0,008	GS598950	0	0	b	LinJ23_V3.0870	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin167B9	-2,70	-1,4 ± 0,5	0,040	GS599088	1e-60	1e-14	a	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin169B8	-2,79	-1,5 ± 0,2	0,009	GS599089	0	0	b	LinJ24_V3.2320	Proteína hipotética con múltiples dominios transmembrana	N.D.
								LinJ24_V3.2330	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin186A8	-2,63	-1,4 ± 0,1	0,003	GS599090	0	0	b	LinJ25_V3.2090	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin193H8	-2,71	-1,4 ± 0,4	0,024	GS599091	0	0	b	LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin194B7	-1,80	-0,8 ± 0,2	0,016	GS599092	0	0	b	LinJ23_V3.1830	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin202H7	-2,10	-1,1 ± 0,2	0,013	GS599093	1e-97	5e-106	a	LinJ32_V3.2130	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin209B12	-2,07	-1,1 ± 0,2	0,013	GS599094	0	0	a	LinJ35_V3.4170	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ35_V3.4180	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ35_V3.4190	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin230F8	-3,72	-1,9 ± 0,7	0,038	GS599095	0	0	b	LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin243B8	-1,80	-0,8 ± 0,1	0,010	GS599096	0	0	b	LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.
Lin244F12	-2,16	-1,1 ± 0,3	0,021	GS599097	0	0	b	LinJ17_V3.0970	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin273D8	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,013	GS599098	0	0	b	LinJ33_V3.1070	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ33_V3.1080	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin280B2	-1,81	-0,9 ± 0,2	0,018	GS599099	0	0	b	LinJ32_V3.0360	Proteína hipotética conservada	N.D.
								LinJ32_V3.0370	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin294B2	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,024	GS599058	0	0	b	LinJ29_V3.2200	Proteína hipotética conservada	N.D.

Tabla A15. Clones que contienen genes diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$ no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin8C12	2,30	1,2 ± 0,4	0,044	GS599100	0	-	c		
Lin10E6	1,76	0,8 ± 0,2	0,018	GS599101	3e-101	-	c		
Lin13C3	1,78	0,8 ± 0,0	0,000	GS599102	0	-	c	LinJ18_V3.1050	5-oxoprolinasa, putativa
Lin19B1	2,56	1,4 ± 0,4	0,026	GS599103	0	0	c	LinJ02_V3.0580	Proteína hipotética conservada
Lin49H10	1,71	0,8 ± 0,1	0,008	GS599104	0	-	c	LinJ28_V3.1590	t-SNARE, putativa
Lin77H11	1,71	0,8 ± 0,3	0,050	GS599105	0	0	c		
Lin82G7	2,40	1,3 ± 0,4	0,035	GS599106	0	0	b	LinJ24_V3.0410	Proteína hipotética conservada
								LinJ24_V3.0420	Cisteína peptidasa, Clan CA, familia C12, putativa
								LinJ24_V3.0430	Proteína hipotética conservada
Lin102C9	2,09	1,1 ± 0,2	0,013	GS599107	0	0	b	LinJ35_V3.0580	Proteína de tipo SNF-7, conserved
								LinJ35_V3.0590	Proteína hipotética conservada
Lin128A4	1,96	1,0 ± 0,4	0,042	GS599108	0	0	b	LinJ12_V3.0840	Proteína hipotética conservada
								LinJ12_V3.0850	Proteína de tipo arginina N-metiltransferasa
Lin137D1 2	1,73	0,8 ± 0,1	0,009	GS599109	-	0	c	LinJ14_V3.0380	Proteína hipotética conservada
Lin139F3	1,75	0,8 ± 0,3	0,031	GS599110	-	0	c	LinJ29_V3.2450	Proteína hipotética conservada
Lin201H8	2,83	1,5 ± 0,1	0,001	GS599111	0	-	c	LinJ36_V3.3410	Proteína hipotética conservada
Lin212H6	2,18	1,1 ± 0,2	0,016	GS599112	0	0	b	LinJ28_V3.1290	Proteína hipotética conservada
								LinJ28_V3.1300	Proteína de tipo copina I
Lin228C8	1,94	1,0 ± 0,1	0,006	GS599113	0	-	c	LinJ33_V3.0850	Proteína hipotética conservada
Lin279H1 2	2,07	1,0 ± 0,2	0,012	GS599114	0	-	c		
Lin20E9	-2,33	-1,2 ± 0,1	0,004	GS599115	0	0	c		
Lin26A9	-1,84	-0,9 ± 0,1	0,005	GS599116	9e-65	3e-163	a	LinJ26_V3.2290	Nitrilasa, putativa
								LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin46H3	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,014	GS599117	5e-137	0	c	LinJ27_V3.1950	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados, putativa
								LinJ27_V3.1960	Proteína hipotética conservada
								LinJ35_V3.3620	Proteína hipotética conservada
Lin66G1	-2,05	-1,0 ± 0,3	0,025	GS599118	0	-	c	LinJ34_V3.0820	Serina/treonina proteína fosfatasa PP1, putativa
Lin87D5	-1,88	-0,9 ± 0,0	0,000		3e-52	7e-93	a	LinJ33_V3.3350	Transportador de cationes, putativa
								LinJ33_V3.3360	Proteína β-COP, putativa
Lin97D2	-2,53	-1,3 ± 0,2	0,010	GS599119	0	1e-153	c	LinJ31_V3.1560	Proteína quinasa, putativa
Lin102E2	-2,05	-1,0 ± 0,2	0,014	GS599120	3e-166	0	c	LinJ18_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin113B1 2	-1,81	-0,9 ± 0,1	0,005	GS599121	0	0	b	LinJ27_V3.0560	Proteína hipotética conservada
								LinJ27_V3.0570	Proteína hipotética conservada
								LinJ27_V3.0580	Reductasa, putativa
Lin122B2	-2,78	-1,5 ± 0,3	0,018	GS599122	0	0	b	LinJ19_V3.1490	Proteína de tipo oxidoreductasa
								LinJ19_V3.1500	Proteína hipotética conservada
Lin126F1	-1,71	-0,8 ± 0,3	0,042	GS599123	0	0	b	LinJ35_V3.2030	Proteína con repetición anquirina, putativa
								LinJ35_V3.2040	Proteína ribosómica 60S L32
Lin288D2	-2,06	-1,0 ± 0,1	0,001	GS599124	0	0	c	LinJ24_V3.1470	Quinesina, putativa
								LinJ31_V3.3250	Proteína de tipo fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa

Tabla A16. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas diferencialmente expresados con ΔT .

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada	qRT-PCR	
					Fw	Rv				+/-	F ± S
Lin21C1	1,87	0,9 ± 0,1	0,009	GS599125	0	0	b	LinJ23_V3.0100	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ23_V3.0110	Proteína hipotética, función desconocida	N.D.	
Lin38F6	1,94	1,0 ± 0,3	0,031	GS599126	0	0	a	LinJ20_V3.0850	Factor de ensamblaje de la citocromo c oxidasa	-	1,2 ± 0,3
Lin44H5	2,18	1,1 ± 0,1	0,005	GS599127	0	0	b	LinJ20_V3.0860	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ31_V3.0090	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ31_V3.0100	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin49G11	1,84	0,9 ± 0,1	0,002	GS599128	0	0	b	LinJ18_V3.0030	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ18_V3.0040	Transportador de la superfamilia MFS, putativa	-	-1,3 ± 0,1
								LinJ18_V3.0050	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin59F12	1,81	0,9 ± 0,3	0,045	GS599129	0	0	a	LinJ12_V3.0500	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin70H11	1,70	0,8 ± 0,3	0,048	GS599130	7e-16	7e-24	a	LinJ31_V3.1110	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin77G12	1,87	0,9 ± 0,0	0,001	GS599131	0	0	b	LinJ32_V3.1720	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin78F3	-3,15	-1,7 ± 0,1	0,002	GS599078	0	0	b	LinJ26_V3.0970	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ26_V3.0980	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin89A11	2,00	1,0 ± 0,3	0,022	GS599132	0	0	a	LinJ15_V3.0340	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin93A7	2,36	1,2 ± 0,5	0,043	GS599133	3e-67	3e-104	b	LinJ21_V3.0790	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin95A3	2,24	1,2 ± 0,4	0,038	GS599134	3e-64	2e-74	b	LinJ21_V3.0790	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin111C6	1,74	0,8 ± 0,3	0,034	GS599135	0	0	b	LinJ08_V3.1010	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin112B12	2,98	1,6 ± 0,2	0,004	GS599136	0	0	b	LinJ29_V3.0530	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ29_V3.0540	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin135E7	1,77	0,8 ± 0,1	0,010		0	0	a	LinJ13_V3.0250	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ13_V3.0260	Subunidad ARD1 de la N-acetiltransferasa, putativa	-	-1,4 ± 0,1
Lin135E9	1,81	0,9 ± 0,2	0,026	GS599137	0	0	a	LinJ34_V3.0060	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ34_V3.0070	Peroxidasa dependiente de ascorbato, putativa	-	1,0 ± 0,3
Lin152D8	2,29	1,2 ± 0,4	0,027	GS599138	0	0	b	LinJ33_V3.1660	Ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa, putativa	-	1,1 ± 0,0
								LinJ33_V3.1670	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin225C2	1,91	0,9 ± 0,2	0,018	GS599139	0	0	a	LinJ28_V3.1610	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ28_V3.1620	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin273G6	1,92	0,9 ± 0,2	0,011	GS599140	0	0	a	LinJ35_V3.4530	Proteína del complejo Smf-snRNP, putativa	-	1,4 ± 0,3
Lin284F10	2,00	1,0 ± 0,2	0,013	GS599141	0	0	b	LinJ35_V3.4540	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin312C2	1,71	0,8 ± 0,2	0,028	GS599142	0	0	b	LinJ15_V3.1570	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ27_V3.0120	Proteína hipotética conservada	N.D.	
								LinJ27_V3.0130	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin16H8	-1,82	-0,9 ± 0,3	0,048	GS599143	0	0	a	LinJ34_V3.1740	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin43F3	-2,66	-1,4 ± 0,3	0,015	GS599144	2e-105	2e-105	a	LinJ32_V3.0500	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin58A11	-1,78	-0,8 ± 0,2	0,017	GS599145	8e-176	5e-165	b	LinJ35_V3.3190	Proteína hipotética conservada	N.D.	
Lin74F6	-1,75	-0,8 ± 0,2	0,027	GS599146	0	1e-134	a	LinJ29_V3.1820	Proteína hipotética, conserved	N.D.	
								LinJ29_V3.1830	Proteína hipotética conservada	N.D.	

Continuación Tabla A16

Lin155G12	-2,20	-1,1 ± 0,2	0,012	GS599087	2e-154	3e-12	b	LinJ35_V3.3770	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin169B8	-2,69	-1,4 ± 0,2	0,008	GS599147	0	2e-145	b	LinJ35_V3.3780 LinJ24_V3.2320	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética con múltiples dominios transmembrana	N.D. N.D.
Lin170G5	-1,76	-0,8 ± 0,3	0,050	GS599148	8e-139	1e-100	b	LinJ24_V3.2330 LinJ36_V3.0380	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada	N.D. N.D.
Lin163F5	-1,99	-1,0 ± 0,3	0,022	GS599166	0	0	b	LinJ36_V3.0390 LinJ30_V3.2380	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada	N.D. N.D.
Lin193H8	-2,17	-1,1 ± 0,1	0,001	GS599149	0	0	a	LinJ30_V3.2390 LinJ06_V3.1350	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida	N.D. N.D.
Lin198G3	-2,58	-1,4 ± 0,1	0,003	GS599150	0	0	a	LinJ18_V3.1640	Proteína hipotética conservada	N.D.
Lin209B12	-2,07	-1,1 ± 0,2	0,013	GS599151	0	0	a	LinJ35_V3.4170 LinJ35_V3.4180	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada	N.D. N.D.
Lin212A4	-1,74	-0,8 ± 0,0	0,000	GS599152	0	0	a	LinJ35_V3.4190 LinJ30_V3.2770	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada	N.D. N.D.
Lin296C4	-1,72	-0,8 ± 0,2	0,022	GS599153	0	0	b	LinJ29_V3.0630	Proteína hipotética conservada	N.D.

Tabla A17. Clones que contienen genes diferencialmente expresados con ΔT no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					F _w	R _v			
Lin13C3	1,78	0,8 ± 0,0	0,000	GS599154	0	-	c	LinJ18_V3.1050	5-oxoprolinasa, putativa
Lin32E6	1,76	0,8 ± 0,1	0,008	GS599155	0	0	c	LinJ31_V3.3250 LinJ14_V3.1430	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin93A7	2,36	1,2 ± 0,5	0,043	GS599133	2e-102	3e-104	c		
Lin101D5	1,94	1,0 ± 0,2	0,010	GS599156	0	7e-167	c		
Lin279H12	2,07	1,0 ± 0,2	0,012	GS599157	0	-	c		
Lin298F2	1,74	0,8 ± 0,3	0,032	GS599158	1e-106	-	c	LinJ32_V3.1440	Proteína hipotética conservada
Lin2G12	-1,85	-0,9 ± 0,0	0,001	GS599159	6e-140	-	c	LinJ28_V3.1590 LinJ28_V3.1600 LinJ28_V3.1610	t-SNARE, putativa t-SNARE, putativa Proteína hipotética conservada
Lin10D9	-1,72	-0,8 ± 0,0	0,001	GS599160	0	0	c	LinJ36_V3.0890	Proteína hipotética conservada
Lin17D4	-1,79	-0,8 ± 0,3	0,039	GS599161	2e-117	-	c	LinJ09_V3.0070	Endonucleasa III, putativa
Lin22D12	-1,83	-0,9 ± 0,3	0,037	GS599162	-	0	c		
Lin35A12	-2,10	-1,1 ± 0,4	0,043	GS599163	0	0	a	LinJ30_V3.2370 LinJ30_V3.2380	Proteína conservada con dedos de zinc Factor de ribosilación de ADP
Lin99G11	-2,54	-1,3 ± 0,0	0,000	GS599164	-	0	c	LinJ30_V3.2380	Factor de ribosilación de ADP
Lin102E2	-1,96	-1,0 ± 0,2	0,018	GS599165	0	0	c	LinJ18_V3.0720	Proteína hipotética conservada

Tabla A18. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas diferencialmente expresados con ΔpH.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					F _w	R _v			
Lin56D12	2,97	1,6 ± 0,3	0,003	GS599167	0	0	a	LinJ07_V3.0140	Proteína hipotética conservada
Lin61C12	1,71	0,8 ± 0,0	0,004	GS599168	0	0	b	LinJ35_V3.0190	Proteína hipotética conservada
Lin62D4	2,19	1,1 ± 0,1	0,009	GS599169	0	0	b	LinJ29_V3.1940	Proteína hipotética conservada
Lin83E8	2,04	1,0 ± 0,0	0,001	GS599170	0	0	a	LinJ35_V3.0140 LinJ35_V3.0150 LinJ35_V3.0160	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin84E12	2,29	1,2 ± 0,2	0,019	GS599171	0	0	a	LinJ35_V3.0140 LinJ35_V3.0150	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin87A10	2,28	1,2 ± 0,1	0,003	GS599172	0	0	a	LinJ35_V3.0160 LinJ29_V3.2870	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin92D4	2,20	1,1 ± 0,1	0,006	GS599173	0	0	a	LinJ26_V3.1140 LinJ26_V3.1150	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin96H11	1,89	0,9 ± 0,1	0,001	GS599174	2e-151	1e-137	a	LinJ26_V3.1570	Proteína hipotética, función desconocida
Lin100C10	1,72	0,8 ± 0,0	0,003	GS599175	0	0	b	LinJ10_V3.1350 LinJ10_V3.1360 LinJ10_V3.1370	Proteína hipotética Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin105C1	1,89	0,9 ± 0,1	0,025	GS599176	0	0	a	LinJ22_V3.0610	Proteína hipotética conservada
Lin117G9	1,88	0,9 ± 0,1	0,006	GS599177	0	0	a	LinJ26_V3.1720	Proteína hipotética conservada
Lin155H9	1,88	0,9 ± 0,1	0,008	GS599178	0	1e-72	b	LinJ28_V3.1140	Proteína hipotética conservada
Lin194A1	1,93	0,9 ± 0,0	0,001	GS599179	0	0	b	LinJ35_V3.5110	Proteína hipotética, función desconocida
Lin206E10	1,70	0,8 ± 0,1	0,024	GS599180	0	0	a	LinJ07_V3.0020	Proteína hipotética conservada
Lin240C7	1,90	0,9 ± 0,0	0,001	GS599181	6e-124	2e-130	b	LinJ26_V3.2200	Proteína hipotética conservada
Lin244H6	2,26	1,2 ± 0,0	0,003	GS599182	0	0	b	LinJ22_V3.0620	Proteína hipotética conservada
Lin255B11	1,91	0,9 ± 0,1	0,002	GS599183	4e-97	7e-93	a	LinJ31_V3.2830	Proteína hipotética conservada
Lin267H4	1,73	0,8 ± 0,1	0,003	GS599184	0	0	b	LinJ17_V3.0280 LinJ17_V3.0290	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin268E7	1,91	0,9 ± 0,1	0,004	GS599185	0	0	b	LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin270A3	2,19	1,1 ± 0,1	0,036	GS599186	0	0	b	LinJ09_V3.0020 LinJ09_V3.0030	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin276F12	2,45	1,3 ± 0,1	0,004	GS599187	0	0	b	LinJ34_V3.0730 LinJ34_V3.0740	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin284D12	2,48	1,3 ± 0,1	0,001	GS599188	0	0	b	LinJ27_V3.0130 LinJ27_V3.0140	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin88A1	-3,51	1,8 ± 0,1	0,004	GS599189	0	2e-176	b	LinJ27_V3.2470	Proteína hipotética conservada
Lin95D8	-5,40	2,4 ± 0,2	0,010	GS599190	4e-165	2e-105	b	LinJ27_V3.2470	Proteína hipotética conservada
Lin181H11	-3,18	1,7 ± 0,1	0,001	GS599191	0	0	b	LinJ18_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin201C8	-2,14	1,1 ± 0,1	0,006	GS599192	0	0	a	LinJ30_V3.1540	Proteína hipotética conservada

Tabla A19. Clones que contienen genes diferencialmente expresados con ΔpH no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					F _w	R _v			
Lin10A7	1,70	0,8 ± 0,0	0,002	GS599193	0	0	b	LinJ28_V3.0050 LinJ28_V3.0060	Proteína fosfatasa de especificidad dual, putativa Proteína de tipo calmodulina
Lin13G4	1,92	0,9 ± 0,1	0,009	GS599194	0	0	c	LinJ28_V3.0070 LinJ36_V3.0350	ARN polimerasa B, subunidad RPB8, putativa Proteína hipotética conservada
Lin16E1	1,77	0,8 ± 0,1	0,050	GS599195	-	0	c	LinJ29_V3.0990 LinJ35_V3.0180	Peptidasa aspártica, Clan AD, familia A22B, putativa Proteína hipotética conservada
Lin21D12	1,96	0,9 ± 0,1	0,001	GS599196	0	0	b	LinJ35_V3.0190 LinJ29_V3.2450	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin24H3	1,84	0,9 ± 0,1	0,024	GS599197	0	-	c	LinJ29_V3.2310	Metalopeptidasa, Clan-MH, familia M20
Lin33C4	2,54	1,3 ± 0,1	0,002	GS599198	0	0	c	LinJ22_V3.0340	Proteína de unión a GTP, putativa
Lin34D12	1,84	0,9 ± 0,1	0,003	GS599199	0	0	a	LinJ22_V3.0340 LinJ33_V3.0940	Proteína ribosómica 40S S15, putativa Proteína de tipo chaperona DnaJ
Lin37A10	4,84	2,3 ± 0,1	0,004	GS599200	0	-	c	LinJ33_V3.0950 LinJ33_V3.0960	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 40S S3, putativa
Lin45E7	2,28	1,2 ± 0,2	0,006	GS599201	0	0	b	LinJ32_V3.3560 LinJ30_V3.3380	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin48E3	1,93	0,9 ± 0,1	0,008	GS599202	0	0	a	LinJ30_V3.3390 LinJ28_V3.1030	Proteína ribosómica 60S L9, putativa Proteína de tipo oxidoreductasa
Lin50E2	2,34	1,2 ± 0,2	0,002	GS599203	5e-20	0	b	LinJ28_V3.1040 LinJ28_V3.1050	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 40S S14
Lin53D8	1,94	0,9 ± 0,1	0,005	GS599204	0	0	b	LinJ07_V3.0540 LinJ07_V3.0550	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L7a, putativa
Lin54C2	2,07	1,0 ± 0,0	0,001	GS599205	0	0	a	LinJ30_V3.3710 LinJ24_V3.2410	Proteína hipotética conservada Proteína quinasa activada por mitógeno
Lin61F2	1,74	0,8 ± 0,0	0,003	GS599206	0	0	b	LinJ24_V3.2420 LinJ24_V3.2430	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin93D4	2,00	1,0 ± 0,1	0,008	GS599207	4e-165	0	b	LinJ15_V3.0220 LinJ15_V3.0230	Proteína ribosómica 60S L13a Proteína hipotética conservada
Lin96H7	1,91	0,9 ± 0,0	0,001	GS599208	0	0	b	LinJ15_V3.0240 LinJ29_V3.0950	Proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, putativa Factor 3 de ribosilación de ADP
Lin100E4	1,70	0,8 ± 0,1	0,005	GS599209	0	0	a	LinJ29_V3.0960 LinJ31_V3.3310	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin117A9	3,54	1,8 ± 0,4	0,042	GS599210	0	-	c	LinJ31_V3.3320	Histona H4
Lin135B3	1,92	0,9 ± 0,1	0,004	GS599211	0	0	b	LinJ28_V3.2280 LinJ28_V3.2290	Cadena ligera de la dineína lc6, brazo flagelar externo, putativa Adenina glicosilasa específica de dinucleótidos A/G, putativa
Lin178D3	2,28	1,2 ± 0,2	0,006	GS599212	0	0	c	LinJ30_V3.0750 LinJ30_V3.0760	Proteína hipotética conservada Co-chaperona GrpE, putativa
Lin181G9	1,89	0,9 ± 0,0	0,001	GS599213	0	0	c	LinJ30_V3.0770 LinJ06_V3.1240	Desconocida Proteína hipotética conservada
Lin231C8	1,82	0,9 ± 0,1	0,004	GS599214	0	0	a	LinJ29_V3.2470 LinJ06_V3.1240	Metalopeptidasa aspártica, Clan MH, familia M20 Proteína hipotética conservada
Lin238F10	2,43	1,3 ± 0,0	0,003	GS599215	0	0	b	LinJ29_V3.2450 LinJ29_V3.2460	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin239C6	2,33	1,2 ± 0,3	0,046	GS599216	1e-128	0	b	LinJ36_V3.3920 LinJ36_V3.3930	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L34, putativa
Lin248E6	1,98	1,0 ± 0,1	0,001	GS599217	0	0	c	LinJ33_V3.1410 LinJ33_V3.1420	Proteína de tipo aminotransferasa, β-liasa de conjugados de cisteína Proteína de tipo sintaxina
Lin265C7	1,85	0,9 ± 0,1	0,008	GS599218	0	0	a	LinJ33_V3.1430 LinJ35_V3.1540	Proteína hipotética conservada Reiske iron-sulfur protein precursor, putativa
Lin276E12	1,76	0,8 ± 0,0	0,001	GS599219	6e-161	0	a	LinJ35_V3.1550 LinJ02_V3.0270	Proteína hipotética conservada Transportador ABC1, putativa
Lin284F11	1,77	0,8 ± 0,1	0,009	GS599220	1e-165	0	b	LinJ09_V3.1400 LinJ35_V3.3840	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin288C8	1,94	0,9 ± 0,1	0,007	GS599221	0	1e-122	b	LinJ35_V3.3850 LinJ35_V3.3860	Proteína ribosómica 60S L23, putativa Proteína hipotética conservada
Lin298H9	2,59	1,4 ± 0,1	0,013	GS599222	0	0	a	LinJ36_V3.0550 LinJ36_V3.0560	Proteína hipotética conservada Proteína de tipo proteína fosfatasa 2C
Lin303D2	2,62	1,4 ± 0,1	0,006	GS599223	0	0	b	LinJ36_V3.0570 LinJ35_V3.1540	Ribonucleoproteína pequeña nuclear Precursora de la proteína de hierro-azufre de Rieske, putativa
Lin308A8	2,64	1,4 ± 0,2	0,036	GS599224	0	0	b	LinJ35_V3.1550 LinJ27_V3.1120	Proteína hipotética conservada Histona H1, putativa
Lin102G3	-3,15	1,7 ± 0,1	0,001	GS599225	0	0	b	LinJ27_V3.1130 LinJ35_V3.3960	Carboxipeptidasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin198B2	-1,92	0,9 ± 0,1	0,008	GS599226	-	5e-171	c	LinJ07_V3.0420 LinJ07_V3.0430	Proteína de tipo homoserina deshidrogenasa Proteína de tipo acetónitrilo deacetilasa
Lin228F6	-3,47	1,8 ± 0,2	0,036	GS599227	0	0	a	LinJ30_V3.0700 LinJ30_V3.0710	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 40S S30, putativa
Lin228H3	-1,84	0,9 ± 0,2	0,024	GS599228	3e-163	0	a	LinJ30_V3.0710 LinJ30_V3.0720	Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína de tipo NUDC
Lin290B4	-2,40	1,3 ± 0,1	0,002	GS599229	0	6e-124	c	LinJ30_V3.0730 LinJ30_V3.0740	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin228H3	-1,84	0,9 ± 0,2	0,024	GS599228	3e-163	0	a	LinJ31_V3.3250 LinJ31_V3.3260	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa Subunidad biotinilada de la metilcrotonil-CoA carboxilasa
Lin290B4	-2,40	1,3 ± 0,1	0,002	GS599229	0	6e-124	c	LinJ27_V3.2470	Proteína hipotética conservada

Tabla A20. Clones que contienen probablemente genes ARNg diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Contenido
Lin13F11	1,87	0,9 ± 0,3	0,044	GS599230	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin100B6	1,80	0,8 ± 0,2	0,024	GS599231	Contig 692. Posible secuencia de minicírculos.
Lin133H11	1,79	0,8 ± 0,3	0,048	GS599232	Contig 200. Posible secuencia de minicírculos.
Lin129G10	1,75	0,8 ± 0,3	0,031	GS599233	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin199G2	1,95	1,0 ± 0,2	0,016	GS599234	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin228A8	1,77	0,8 ± 0,2	0,026	GS599235	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin233A12	1,77	0,8 ± 0,2	0,045	GS599236	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin243H9	1,79	0,8 ± 0,4	0,048	GS599237	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin245A6	1,99	1,0 ± 0,0	0,000	GS599238	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin245C8	1,73	0,8 ± 0,2	0,028	GS599239	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin248E7	1,82	0,9 ± 0,3	0,048	GS599240	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin251A4	1,71	0,8 ± 0,2	0,026	GS599241	Contig 878. Posible secuencia de minicírculos.
Lin266B7	1,71	0,8 ± 0,3	0,040	GS599242	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin269A8	2,31	1,2 ± 0,1	0,003	GS599243	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin276A11	1,73	0,8 ± 0,2	0,019	GS599244	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin276B2	1,78	0,8 ± 0,2	0,014	GS599245	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin276C2	1,75	0,8 ± 0,3	0,047	GS599246	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin278E6	2,10	1,1 ± 0,3	0,022	GS599247	Contig 878. Posible secuencia de minicírculos.
Lin310H6	1,95	1,0 ± 0,4	0,049	GS599248	Contig 692. Posible secuencia de minicírculos.

Tabla A21. Clones que contienen probablemente genes ARNg diferencialmente expresados con ΔpH .

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Contenido
Lin24H3	6,28	2,7 ± 0,4	0,021	GS599197	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin91D8	2,18	1,1 ± 0,0	0,000	GS599249	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin137H1	2,70	1,4 ± 0,1	0,002	GS599250	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin166C12	3,24	1,7 ± 0,1	0,001	GS599251	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin210F10	12,41	3,6 ± 0,3	0,002	GS599252	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin233A12	7,58	2,9 ± 0,2	0,001	GS599253	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin239F3	8,92	3,2 ± 0,2	0,005	GS599254	Contig 878. Posible secuencia de minicírculos.
Lin245F3	4,41	2,1 ± 0,1	0,001	GS599255	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin269A8	4,69	2,2 ± 0,1	0,003	GS599256	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin274D10	3,98	2,0 ± 0,3	0,014	GS599257	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin276A11	1,81	0,9 ± 0,1	0,002	GS599258	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin280H3	2,68	1,4 ± 0,2	0,003	GS599259	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin285B2	1,76	0,8 ± 0,0	0,000	GS599260	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin287B7	2,04	1,0 ± 0,1	0,001	GS599261	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin305B6	6,36	2,7 ± 0,2	0,004	GS599262	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin310D6	3,85	1,8 ± 0,0	0,000	GS599263	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.
Lin312F1	3,08	1,5 ± 0,2	0,017	GS599264	Contig 957. Posible secuencia de minicírculos.

Tabla A22. Clones que contienen genes diferencialmente expresados en presencia de acetato de cadmio no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	GenBank GSS	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
					Fw	Rv			
Lin17A6	4,18	2,1 ± 0,4	0,027	GS883016	9e-80	2e-80	b		
Lin17H11	1,90	0,9 ± 0,3	0,039	GS883017	7e-87	3e-18	b		
Lin34G5	4,41	2,1 ± 0,4	0,010	GS883018	0	0	b		
Lin43B1	5,25	2,4 ± 0,6	0,024	GS883019	2e-80	0	b		
Lin49A4	2,55	1,4 ± 0,3	0,021	GS883020	0	0	b		
Lin51F7	3,84	1,9 ± 0,6	0,033	GS883004	1e-112	0	b	LinJ18_V3.0480	Uracil-ADN glicosilasa
Lin53E4	2,01	1,0 ± 0,1	0,023	GS883005	3e-141	2e-12	b	LinJ18_V3.0490 LinJ27_V3.2480 LinJ27_V3.2490	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica acidica 60S Cisteína peptidasa de tipo calpaina
Lin90D12	2,52	1,3 ± 0,3	0,018	GS883006	0	-	c	LinJ23_V3.0130	Proteína hipotética conservada
Lin95A12	16,05	4,0 ± 0,9	0,018	GS883022	0	0	b		
Lin100B12	2,74	1,5 ± 0,3	0,018	GS883007	0	5e-72	a	LinJ16_V3.0880 LinJ16_V3.0890	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética
Lin100F11	6,06	2,6 ± 1,0	0,049	GS883023	0	6e-87	b		
Lin118A11	1,81	0,9 ± 0,3	0,047	GS883008	0	0	c		
Lin123C9	1,98	1,0 ± 0,2	0,020	GS883024	0	0	b		
Lin128C1	2,27	1,2 ± 0,5	0,046	GS883025	0	0	b		
Lin134A3	2,44	1,3 ± 0,3	0,016	GS883009	0	0	b	LinJ04_V3.0630 LinJ04_V3.0640	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin141A4	1,83	0,9 ± 0,3	0,039	GS883026	0	8e-176	b		
Lin141E5	1,90	0,9 ± 0,4	0,048	GS883027	1e-162	4e-147	b		
Lin153A11	2,39	1,3 ± 0,4	0,029	GS883010	-	5e-112	c	LinJ30_V3.3390	Proteína ribosómica 60S L9, putativa
Lin169H9	1,85	0,9 ± 0,2	0,011	GS883028	2e-167	0	b		
Lin177E11	1,70	0,8 ± 0,3	0,038	GS882970	3e-172	-	c	LinJ29_V3.2610	Serina peptidasa, Clan SJ, familia S16
Lin198C1	1,72	0,8 ± 0,3	0,039	GS883029	4e-113	4e-119	b		
Lin204H7	5,74	2,5 ± 0,7	0,023	GS883030	0	0	b		
Lin206B10	1,84	0,9 ± 0,2	0,024	GS883031	2e-127	2e-127	b		
Lin218E11	1,87	0,9 ± 0,2	0,012	GS883032	0	0	b		
Lin225C2	1,93	0,9 ± 0,3	0,042	GS883011	0	0	b	LinJ28_V3.1610 LinJ28_V3.1620	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin227H8	2,16	1,1 ± 0,4	0,035	GS882975	1e-162	4e-157	b		
Lin236D1	1,96	1,0 ± 0,3	0,025	GS883012	0	0	b	LinJ31_V3.2960 LinJ31_V3.2970	Proteína quinasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin246H5	2,13	1,1 ± 0,1	0,002	GS883034	2e-127	2e-127	b		
Lin256A6	4,57	2,2 ± 0,4	0,008	GS883035	4e-94	7e-96	b		
Lin266G4	2,15	1,1 ± 0,4	0,042	GS883015	0	0	b		
Lin267D9	1,71	0,8 ± 0,1	0,005	GS883013				LinJ16_V3.0590 LinJ16_V3.0600	Carbamoi fosfato sintetasa Histona H3, putativa
Lin276C7	1,75	0,8 ± 0,1	0,005	GS883036	4e-162	0	b		
Lin277B5	1,79	0,8 ± 0,3	0,031	GS883014	0	1e-146	b	LinJ23_V3.3740 LinJ23_V3.3750	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin279A11	1,95	1,0 ± 0,3	0,041	GS883037	0	0	b		
Lin280F10	2,19	1,1 ± 0,3	0,030	GS883015	4e-20	3e-129	a	LinJ35_V3.0800 LinJ35_V3.0810	Proteína hipotética, función desconocida Proteína de tipo actina
Lin280G11	1,75	0,8 ± 0,1	0,005	GS883036	0	1e-146	b		
Lin280H3	1,76	0,8 ± 0,3	0,038	GS883039	3e-36	7e-59	b		
Lin8H9	-1,89	-0,9 ± 0,1	0,009	GS883040	0	0	b	LinJ31_V3.0500 LinJ31_V3.0510	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin10A5	-1,72	-0,8 ± 0,1	0,022	GS883053	5e-72	7e-124	b		
Lin21H3	-1,94	-1,0 ± 0,2	0,020	GS883054	7e-173	7e-173	b		
Lin35A12	-1,74	-0,8 ± 0,2	0,028	GS883041	0	0	b	LinJ30_V3.2370 LinJ30_V3.2380 LinJ30_V3.2390	Proteína con dedos de zinc Factor de ribosilación de ADP Proteína hipotética conservada
Lin41E3	-1,90	-0,9 ± 0,2	0,012	GS883055	9e-114	1e-119	b		
Lin46E9	-1,79	-0,8 ± 0,2	0,011	GS883056	7e-173	7e-173	b		
Lin46H3	-1,79	-0,8 ± 0,2	0,011	GS883042	1e-134	0	c	LinJ27_V3.1950 LinJ35_V3.3620	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados Proteína hipotética conservada
Lin61A5	-1,73	-0,8 ± 0,3	0,039	GS883043	0	1e-72	b	LinJ27_V3.2210 LinJ27_V3.2220	Proteína hipotética conservada Factor de regulación de la elongación traduccional, putativo
Lin74B8	-1,72	-0,8 ± 0,2	0,025	GS883044	0	1e-134	b	LinJ17_V3.0990 LinJ17_V3.1000	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin80B4	-1,73	-0,8 ± 0,2	0,027	GS883045	0	0	b	LinJ09_V3.1470 LinJ09_V3.1480 LinJ09_V3.1490	Proteína hipotética, función desconocida Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin121E9	-1,73	-0,8 ± 0,3	0,045	GS883057	0	0	a	LinJ36_V3.4430 LinJ36_V3.4440	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin153C3	-1,70	-0,8 ± 0,2	0,024	GS883047	2e-142	4e-45	b	LinJ31_V3.0920 LinJ31_V3.0930	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin162D7	-1,78	-0,8 ± 0,2	0,026	GS883058	0	0	b		
Lin163F5								LinJ30_V3.2380 LinJ30_V3.2390	Factor de ribosilación de ADP Proteína hipotética conservada
Lin173A1	-3,01	-1,6 ± 0,1	0,000	GS883049	-	0	c	LinJ24_V3.1120 LinJ24_V3.1130	Factor de splicing, putativo Formina, putativa
Lin178F11	-1,91	-0,9 ± 0,1	0,008	GS883059	3e-30	0	a		
Lin203H3	-2,73	-1,5 ± 0,1	0,001	GS883060	0	0	a		
Lin209B12	-1,71	-0,8 ± 0,3	0,031	GS883051	0	0	b	LinJ05_V3.0040 LinJ05_V3.0050	Proteína del vástago paraflagelar 4 Proteína hipotética conservada
Lin227B5	-1,76	-0,8 ± 0,1	0,007	GS883000	0	0	c	LinJ20_V3.0310 LinJ33_V3.1000	Fosfoproteína regulada en el desarrollo Proteína hipotética conservada
Lin237G6	-2,57	-1,4 ± 0,6	0,031	GS883061	0	4e-76	b		
Lin255B2	-1,77	-0,8 ± 0,1	0,003	GS883062	0	0	b		
Lin264C4	-1,82	-0,9 ± 0,3	0,038	GS883063	0	0	a		
Lin265E2	-2,04	-1,0 ± 0,3	0,031	GS883052	-	1e-109	c	LinJ36_V3.6760	Proteína quinasa activada por mitógeno
Lin266A10	-1,94	-1,0 ± 0,2	0,012	GS883064	5e-134	3e-95	b		
Lin271C3	-2,10	-1,1 ± 0,3	0,031	GS883065	2e-173	7e-16	b		

Tabla A23. Clones que contienen genes diferencialmente expresados en ausencia de HIFBS no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ±S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin7C3	1,80	0,9 ± 0,1	0,023	0	0	c	LinJ06_V3.0460	Proteína hipotética conservada
Lin8D4	1,98	1,0 ± 0,1	0,009	-	0	c		
Lin19B1	1,87	0,9 ± 0,1	0,021	0	0	c	LinJ02_V3.0580	Proteína hipotética conservada
Lin24C4	1,86	0,9 ± 0,3	0,026	0	0	a		
Lin32A12	1,70	0,8 ± 0,2	0,013	0	0	b	LinJ30_V3.1640 LinJ30_V3.1650 LinJ30_V3.1660	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin33C5	1,75	0,8 ± 0,0	0,012	0	-	c		
Lin54G3	1,72	0,8 ± 0,1	0,029	0	0	b	LinJ24_V3.1230	Proteína hipotética conservada
Lin68A9	1,91	0,9 ± 0,2	0,035	0	4e-85	b	LinJ24_V3.1240 LinJ23_V3.0140	Factor traduccional SUI1, putativo Ciclofilina
Lin243E3	1,82	0,9 ± 0,0	0,003	0	2e-13	b	LinJ23_V3.0150 LinJ28_V3.0090 LinJ28_V3.0100 LinJ28_V3.0110	Pirofosfatasa de protones de tipo vacuolar Proteína de tipo adenilato ciclasa Proteína hipotética conservada Subunidad β3 del proteasoma, putativa
Lin250C3	1,74	0,8 ± 0,1	0,018	0	0	a		
Lin252F9	2,01	1,0 ± 0,2	0,003	0	0	b		
Lin268C9	2,24	1,2 ± 0,6	0,045	0	0	b		
Lin290E1								
Lin297H12	3,67	1,9 ± 0,1	0,031	0	0	b		
Lin299F5	1,72	0,8 ± 0,1	0,027	0	2e-16	a	LinJ23_V3.0570 LinJ23_V3.0580	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin307A8	1,70	0,8 ± 0,1	0,022	-	0	c	LinJ09_V3.0220	Proteína hipotética conservada
Lin309D1	1,89	0,9 ± 0,2	0,015	0	0	a	LinJ05_V3.0060 LinJ05_V3.0070	Proteína mayoritaria de las cúpulas celulares (MVP) Cadena ligera de la dineína, putativa
Lin29B3	-2,17	-1,1 ± 0,3	0,026	4e-48	1e-51	b		
Lin30B4	-2,01	-1,0 ± 0,3	0,030	1e-60	4e-57	b		
Lin43B1	-3,04	-1,6 ± 0,2	0,005	6e-78	7e-158	b		
Lin71E8	-1,71	-0,8 ± 0,4	0,042	2e-148	2e-148	a		
Lin95A10	-2,59	-1,4 ± 0,3	0,027	1e-152	2e-148	a		
Lin95A12	-5,53	-2,5 ± 0,3	0,012	0	0	b		
Lin100F11	-3,17	-1,7 ± 0,2	0,028	0	0	b		
Lin106A4	-1,81	-0,9 ± 0,2	0,039	6e-84	1e-66	b		
Lin126A11	-1,90	-0,9 ± 0,2	0,034	7e-59	7e-59	b		
Lin130G10	-1,89	-0,9 ± 0,3	0,019	1e-23	1e-23	b		
Lin138C1	-1,76	-0,8 ± 0,1	0,028	0	0	b	LinJ24_V3.1360 LinJ24_V3.1370 LinJ24_V3.1380	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Factor traduccional de iniciación IF2, putativo
Lin150A5	-3,10	-1,6 ± 0,4	0,033	9e-177	0	b	LinJ30_V3.2310 LinJ30_V3.2320 LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin175E2	-2,08	-1,1 ± 0,2	0,017	3e-36	7e-59	b		
Lin185G7	-1,89	-0,9 ± 0,1	0,002	3e-36	5e-38	b		
Lin193B6	-1,83	-0,9 ± 0,3	0,033	9e-36	9e-46	b		
Lin204H7	-3,22	-1,7 ± 0,7	0,025	0	0	b		
Lin242E6	-3,66	-1,9 ± 0,3	0,012	5e-97	3e-120	a		
Lin242H5	-3,48	-1,8 ± 0,4	0,024	3e-147	3e-147	a		
Lin255D11	-1,72	-0,8 ± 0,3	0,020	3e-36	6e-41	b		
Lin256A6	-3,63	-1,9 ± 0,3	0,015	7e-96	7e-96	b		
Lin280F10	-3,37	-1,8 ± 0,3	0,008	0	0	b		
Lin303D3	-1,83	-0,9 ± 0,3	0,028	3e-36	7e-59	b		

Tabla A24. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresados en Pper/E.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin3A8	3,86	1,9 ± 0,3	0,009	5e-29	5e-174	a	LinJ31_V3.2230	Proteína hipotética conservada
Lin21H4	3,37	1,7 ± 0,3	0,009	0	0	b	LinJ31_V3.1370	Proteína hipotética, función desconocida
Lin26A1	4,43	2,1 ± 0,4	0,010	0	0	b	LinJ25_V3.0090	Proteína hipotética conservada
							LinJ25_V3.0100	Proteína hipotética conservada
Lin27H9	3,08	1,6 ± 0,3	0,012	0	0	a	LinJ17_V3.0010	Proteína hipotética conservada
Lin28F4	4,27	2,1 ± 0,3	0,007	0	0	a	LinJ33_V3.0660	Proteína hipotética conservada
Lin35B6	3,96	2,0 ± 0,1	0,002	0	0	b	LinJ28_V3.0740	Proteína hipotética conservada
Lin43A9	4,04	2,0 ± 0,5	0,020	0	0	a	LinJ33_V3.0660	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0680	Proteína hipotética conservada
Lin43F3	8,84	3,1 ± 0,4	0,006	3e-98	5e-103	a	LinJ32_V3.0500	Proteína hipotética conservada
Lin53D8				0	0	b	LinJ36_V3.4830	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.4840	Proteína hipotética conservada
Lin76B11				0	0	b	LinJ33_V3.1670	Proteína hipotética conservada
Lin100C10	3,60	1,8 ± 0,4	0,016	0	0	a	LinJ10_V3.1350	Proteína hipotética conservada
							LinJ10_V3.1360	Proteína hipotética conservada
							LinJ10_V3.1370	Proteína hipotética conservada
Lin100H5	4,00	2,0 ± 0,1	0,001	0	0	b	LinJ27_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin105H10	7,40	2,9 ± 0,6	0,013	0	0	b	LinJ18_V3.0570	Proteína hipotética conservada
Lin106F1	4,94	2,3 ± 0,8	0,036	0	0	b	LinJ35_V3.3970	Proteína hipotética conservada
Lin107G9	11,65	3,5 ± 1,0	0,024	0	0	b	LinJ13_V3.1430	Proteína hipotética conservada
							LinJ13_V3.1440	Proteína hipotética conservada
Lin128C11	4,38	2,1 ± 0,0	0,008	3e-166	7e-164	b	LinJ26_V3.2000	Proteína hipotética conservada
Lin129E3	4,45	2,1 ± 0,4	0,012	0	0	a	LinJ36_V3.6610	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.6620	Proteína hipotética conservada
Lin129E6	3,98	2,0 ± 0,4	0,011	0	0	a	LinJ22_V3.1460	Proteína hipotética conservada
							LinJ22_V3.1470	Proteína hipotética conservada
Lin131F11	4,82	2,3 ± 0,4	0,008	0	0	a	LinJ34_V3.0040	Proteína hipotética conservada
							LinJ34_V3.0050	Proteína hipotética conservada
Lin134F9	3,69	1,9 ± 0,2	0,003	0	5e-26	b	LinJ32_V3.3150	Proteína hipotética, función desconocida
Lin135A8	3,12	1,6 ± 0,3	0,014	0	0	a	LinJ35_V3.4270	Proteína hipotética conservada
Lin136C5	3,10	1,6 ± 0,4	0,024	0	0	b	LinJ35_V3.5030	Proteína hipotética conservada
Lin136D8	3,06	1,6 ± 0,6	0,041	0	0	a	LinJ06_V3.0650	Proteína hipotética conservada
							LinJ06_V3.0660	Proteína hipotética conservada
							LinJ06_V3.0670	Proteína hipotética conservada
Lin138A8	5,09	2,3 ± 0,4	0,012	0	0	a	LinJ29_V3.0980	Proteína hipotética conservada
Lin138H11	3,11	1,6 ± 0,5	0,034	0	0	b	LinJ35_V3.1380	Proteína hipotética, función desconocida
Lin139E9	4,14	2,0 ± 0,2	0,003	0	0	a	LinJ27_V3.1190	Proteína hipotética conservada
							LinJ27_V3.1200	Proteína hipotética conservada
Lin149D5	3,03	2,0 ± 0,1	0,00	0	0	b	LinJ32_V3.2530	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.2540	Proteína hipotética conservada
Lin150C1	3,86	1,9 ± 0,6	0,032	0	0	b	LinJ33_V3.1900	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.1910	Proteína hipotética conservada
Lin155C10	11,61	3,5 ± 0,9	0,021	0	0	a	LinJ22_V3.1330	Proteína hipotética conservada
Lin155D4	3,93	2,0 ± 0,5	0,023	1e-23	0	a	LinJ32_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin159D10	3,42	1,8 ± 0,2	0,003	0	0	b	LinJ35_V3.2920	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.2930	Proteína hipotética conservada
Lin161G4	4,40	2,1 ± 0,4	0,014	0	9e-151	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin162H6	4,56	2,2 ± 0,5	0,017	0	0	a	LinJ31_V3.1330	Proteína hipotética conservada
Lin177A2	3,70	1,9 ± 0,5	0,026	0	0	a	LinJ35_V3.4680	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.4690	Proteína hipotética conservada
Lin179B8	4,42	2,1 ± 0,6	0,025	0	0	b	LinJ32_V3.0880	Proteína hipotética, función desconocida
Lin183B6	3,98	2,0 ± 0,0	0,000	0	0	a	LinJ23_V3.0100	Proteína hipotética conservada
							LinJ23_V3.0110	Proteína hipotética conservada
Lin203B5	11,39	3,5 ± 0,4	0,004	0	0	b	LinJ32_V3.0880	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ32_V3.0890	Proteína hipotética conservada
Lin204D8	3,95	2,0 ± 0,7	0,039	0	0	a	LinJ33_V3.0650	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0660	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada
Lin228B9	7,22	2,8 ± 0,1	0,001	0	0	b	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin231E4	4,07	2,0 ± 0,7	0,034	0	0	a	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin262A6	6,19	2,6 ± 1,0	0,048	0	0	b	LinJ36_V3.4810	Proteína hipotética conservada
Lin267D1	7,55	2,9 ± 0,7	0,021	0	0	a	LinJ19_V3.1500	Proteína hipotética conservada
Lin268E7	6,59	2,7 ± 0,5	0,010	0	0	b	LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin292E2	4,85	2,3 ± 0,3	0,006	0	0	a	LinJ36_V3.6610	Proteína hipotética conservada
Lin299E11	3,63	1,9 ± 0,7	0,041	0	0	a	LinJ36_V3.4870	Proteína hipotética conservada

Tabla A25. Clones que contienen genes sobre-expresados en Pper/E no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin12D2	3,32	1,7 ± 0,4	0,016	0	0	b	LinJ24_V3.1890 LinJ24_V3.1900	Deshidrogenasa-reductasa de cadena corta, putativa Proteína hipotética conservada
Lin13G4	3,12	1,6 ± 0,1	0,002	0	0	c	LinJ29_V3.0990	Peptidasa señal aspártica, Clan AD, familia A22B, putativa
Lin16B12	5,71	2,5 ± 0,1	0,000	0	0	b	LinJ25_V3.1850 LinJ25_V3.1860	3-oxo-5-α-esteroide 4-deshidrogenasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin16C12	14,35	3,8 ± 0,6	0,009	0	0	b	LinJ35_V3.3930 LinJ35_V3.3940	Proteína de tipo calmodulina Proteína hipotética conservada
Lin22B1	3,76	1,9 ± 0,2	0,005	0	0	a	LinJ23_V3.1390 LinJ23_V3.1400	Proteína hipotética conservada Coronina, putativa
Lin22H5	4,82	2,3 ± 0,1	0,000	0	0	b	LinJ19_V3.0180 LinJ19_V3.0190	Proteína hipotética conservada Proteína transportadora de ATP/ADP 1, precursor mitocondrial, putativo
Lin23C8	3,25	1,7 ± 0,4	0,017	0	0	b	LinJ08_V3.0300 LinJ08_V3.0040 LinJ08_V3.0050	Proteína transportadora de protones de tipo vacuolar Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida
Lin26A9	6,18	2,6 ± 0,5	0,011	0	0	a	LinJ26_V3.2290 LinJ26_V3.2300 LinJ26_V3.2310	Nitrilasa, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin28B4	2,18	1,1 ± 0,1	0,002	8e-142	0	b	LinJ26_V3.1620 LinJ26_V3.1630 LinJ26_V3.1640	40S Proteína ribosómica S33, putativa 40S Proteína ribosómica S33, putativa Proteína hipotética conservada
Lin29B8	4,20	2,1 ± 0,2	0,002	0	0	b		
Lin31A12	7,96	3,00 ± 0,5	0,010	0	0	b	LinJ19_V3.1490 LinJ19_V3.1500	Proteína de tipo oxidoreductasa Proteína hipotética conservada
Lin38A2	6,44	2,7 ± 0,5	0,011	0	0	a		
Lin40F12	5,15	2,4 ± 0,3	0,004	0	0	a	LinJ35_V3.1730 LinJ35_V3.1740	Ubiquitina hidrolasa, cisteína peptidasa, Clan CA, familia C19, putativa Proteína de tipo <i>roadblock</i> asociada a dineína
Lin41D1	3,55	1,8 ± 0,1	0,001	0	0	c	LinJ23_V3.0060	Ciclofilina, putativa
Lin43F7	3,99	2,0 ± 0,5	0,022	0	0	b		
Lin49B2	4,33	2,1 ± 0,1	0,002	0	0	b	LinJ01_V3.0290 LinJ01_V3.0300 LinJ01_V3.0310	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Exopolifosfatasa del acantósoma, putativa
Lin50A12	2,04	1,0 ± 0,3	0,031	5e-171	0	a	LinJ32_V3.1820 LinJ32_V3.1830	Proteína con dedos de zinc 2, putativa Proteína hipotética conservada
Lin56B3	4,08	2,0 ± 0,2	0,002	0	0	c	LinJ10_V3.0930 LinJ36_V3.7280	Proteína hipotética conservada Proteína disulfuro isomerasa
Lin56H12	8,41	3,1 ± 0,5	0,010	0	0	b		
Lin59H2	3,10	1,6 ± 0,1	0,001	6e-115	2e-87	b	LinJ23_V3.0040 LinJ23_V3.0050 LinJ23_V3.0060	Proteína todo β toroidal, putativa Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa Ciclofilina, putativa
Lin60C1	2,17	1,1 ± 0,1	0,002	0	0	a	LinJ18_V3.0150 LinJ18_V3.0160	Serina/treonina proteína fosfatasa de tipo 5, putativa Proteína hipotética conservada
Lin60H10	2,79	1,5 ± 0,3	0,013	0	0	a	LinJ23_V3.0630 LinJ23_V3.0640	Proteína de tipo oxidoreductasa Proteína hipotética conservada
Lin67B10	5,92	2,6 ± 0,2	0,002	0	0	b		
Lin70D9	4,84	2,3 ± 0,1	0,001	3e-36	3e-27	a		
Lin71A12	7,96	3,0 ± 0,5	0,010	5e-57	2e-56	a		
Lin72D7	3,10	1,6 ± 0,0	0,000	0	0	a		
Lin75B1	6,17	2,6 ± 1,0	0,044	0	0	b		
Lin76F12	2,76	1,5 ± 0,2	0,006	0	0	c	LinJ10_V3.0430	Proteína de tipo dihidroxiacetona quinasa 1
Lin76G12	7,22	2,8 ± 0,8	0,026	0	0	a		
Lin79E10	2,00	1,0 ± 0,2	0,011	0	0	c	LinJ04_V3.0740 LinJ36_V3.3860	Proteína hipotética conservada Calmodulina, putativa
Lin82D10	4,51	2,2 ± 0,4	0,010	0	0	a	LinJ23_V3.0040 LinJ23_V3.0050 LinJ23_V3.0060	Proteína todo β toroidal, putativa Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa Ciclofilina, putativa
Lin93D6	5,23	2,4 ± 0,8	0,037	0	0	b		
Lin93D7	9,67	3,3 ± 0,2	0,001	0	0	a		
Lin96H11	4,95	2,3 ± 0,7	0,028	0	0	b		
Lin100F4	2,48	1,3 ± 0,5	0,049	0	0	a	LinJ28_V3.2280 LinJ28_V3.2890 LinJ30_V3.3040 LinJ30_V3.3050	Cadena ligera de dineína I66, brazo externo flagelar, putativa Adenina glicosilasa específica de dinucleótidos A/G, putativa Lsm5p, putativa Proteína hipotética conservada
Lin100F12	2,48	1,3 ± 0,5	0,049	0	0	a	LinJ30_V3.3030	Proteína hipotética conservada
Lin102G11	2,60	1,4 ± 0,5	0,045	0	0	b	LinJ13_V3.1020 LinJ13_V3.1030 LinJ13_V3.1040	ARN polimerasa II, polipéptido de 85 KDa, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin103B4	2,47	1,3 ± 0,1	0,005	0	0	a	LinJ30_V3.2620 LinJ30_V3.2630	Subunidad c de factor de replicación, putativa Proteína hipotética conservada
Lin104C1	3,48	1,8 ± 0,4	0,015	0	0	a	LinJ33_V3.2920 LinJ33_V3.2930	Proteína hipotética conservada Factor de elongación dependiente de GTP, familia Tu, putativo
Lin106C5	2,65	1,4 ± 0,2	0,007	0	0	b	LinJ23_V3.0030 LinJ23_V3.0040	Proteína hipotética conservada Proteína todo β toroidal, putativa
Lin106C12	2,42	1,3 ± 0,3	0,023	0	0	b	LinJ23_V3.0050 LinJ08_V3.0010 LinJ08_V3.0020	Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa Proteína 3 de mantenimiento estructural de los ribosomas Proteína hipotética conservada
Lin107H10	2,29	1,2 ± 0,2	0,010	8e-102	7e-133	a	LinJ08_V3.0030 LinJ24_V3.1380 LinJ24_V3.1390	Proteína de membrana asociada a vesículas, putativa Factor de iniciación de la traducción IF2, putativa Proteína hipotética conservada
Lin107F7	4,53	2,2 ± 0,2	0,002	0	0	b		
Lin113B9	2,20	1,1 ± 0,1	0,006	0	0	b	LinJ36_V3.0550 LinJ36_V3.0560 LinJ36_V3.0570	Proteína hipotética conservada Proteína de tipo proteína fosfatasa 2C Ribonucleoproteína pequeña nuclear, putativa
Lin113E12	3,72	1,9 ± 0,3	0,009	0	0	a	LinJ05_V3.1050 LinJ05_V3.1060 LinJ05_V3.1070	Proteína hipotética, función desconocida ATPasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin125C8	2,35	1,2 ± 0,2	0,011	0	0	b	LinJ36_V3.6770 LinJ36_V3.6780	Fosfatasa ácida de histidina de secreción, putativa Proteína de fusión ubiquitina para degradación, putativa
Lin128D12	2,82	1,5 ± 0,0	0,003	0	0	c	LinJ05_V3.0400 LinJ36_V3.2820 LinJ36_V3.2830	Proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin128F5	3,24	1,7 ± 0,0	0,000	2e-170	2e-167	b		
Lin129C7	5,56	2,5 ± 0,8	0,035	1e-17	3e-18	b		
Lin129D7	6,29	2,6 ± 0,1	0,001	0	0	a	LinJ36_V3.4870 LinJ36_V3.4880 LinJ36_V3.4890	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica acidica 60S, putativa Proteína hipotética conservada

Anexo IV

Continuación Tabla A25

Lin133H10	2,32	1,2 ± 0,4	0,036	0	0	b	LinJ36_V3.1420	ATPasa del retículo endoplásmico transicional, putativa/valosina
Lin135F1	2,18	1,1 ± 0,2	0,010	0	0	b	LinJ36_V3.1430 LinJ23_V3.0020 LinJ23_V3.0030 LinJ23_V3.0040 LinJ23_V3.0050	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína todo β toroidal, putativa Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa
Lin135B3	3,99	2,0 ± 0,4	0,013	0	0	a	LinJ30_V3.0750	Proteína hipotética conservada
Lin138C1	4,07	2,0 ± 0,2	0,005	0	0	a	LinJ30_V3.0760 LinJ24_V3.1360 LinJ24_V3.1370 LinJ24_V3.1380	Co-chaperona GrpE, putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Factor traduccional de iniciación IF2, putativo
Lin139A5	5,83	2,5 ± 0,6	0,017	0	0	b	LinJ11_V3.0570 LinJ11_V3.0580	Proteína hipotética conservada Proteína con dominio de repetición del tetratricopéptido, putativa
Lin147B7	3,39	1,8 ± 0,4	0,015	0	0	b		
Lin155A2	2,82	1,5 ± 0,2	0,007	0	0	b	LinJ28_V3.2280 LinJ28_V3.2890	Cadena ligera de la dineína lc6, brazo externo del flagelo, putativa Adenina glicosilasa específica de A/G, putativa
Lin155F3	3,16	1,7 ± 0,4	0,019	0	0	a		
Lin158A8	4,26	2,1 ± 0,2	0,005	7e-90	0	b	LinJ29_V3.3010 LinJ29_V3.3020	Amastina, putativa Proteína de tipo tuzina, putativa
Lin165D12	2,23	1,1 ± 0,3	0,019	0	0	a	LinJ22_V3.0470 LinJ22_V3.0480	Proteína hipotética conservada Enzima de tipo conjugante de ubiquitina
Lin168B2	4,96	2,3 ± 0,3	0,005	0	0	b		
Lin168C4	3,78	1,9 ± 0,4	0,017	0	0	a	LinJ36_V3.3180 LinJ36_V3.3190 LinJ36_V3.3200	Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina Proteína p14 del sitio de ramificación del pre-ARNm, putativa Proteína hipotética conservada
Lin169B8	3,13	1,6 ± 0,1	0,001	0	3e-21	b	LinJ24_V3.2320 LinJ24_V3.2330	Proteína hipotética con múltiples dominios transmembrana Proteína hipotética conservada
Lin170A2	4,00	2,0 ± 0,4	0,011	0	0	b		
Lin170A5	8,18	3,0 ± 0,6	0,014	0	0	b		
Lin170C11	2,84	1,5 ± 0,2	0,008	0	0	a	LinJ30_V3.0810 LinJ30_V3.0820 LinJ30_V3.0830	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína mitocondrial de unión a oligo (U) TBRGG1, putativa
Lin172D9	2,52	1,3 ± 0,2	0,006	0	6e-143	b	LinJ22_V3.0600 LinJ22_V3.0610	Citocromo b5 reductasa dependiente de NADH, putativa Proteína hipotética conservada
Lin172B9	4,16	2,1 ± 0,7	0,035	4e-88	6e-41	b	LinJ26_V3.1680 LinJ26_V3.1690 LinJ30_V3.2350	Esfingolípido δ-4 desaturasa Citocromo b5 reductasa Proteína con dedos de zinc, putativa
Lin173B9	2,21	1,1 ± 0,3	0,028	0	-	c		
Lin172E11	12,83	3,7 ± 0,5	0,007	1e-29	3e-58	b		
Lin173G4	3,62	1,9 ± 0,2	0,005	0	0	b		
Lin175B5	5,03	2,3 ± 0,6	0,024	0	0	b	LinJ03_V3.0010 LinJ03_V3.0020 LinJ03_V3.0030	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína de tipo D3-fosfoglicerato deshidrogenasa, putativa
Lin183H5	2,39	1,2 ± 0,4	0,032	0	0	b	LinJ34_V3.1630 LinJ34_V3.1640	Proteína hipotética conservada Quinesina, putativa
Lin184C3	5,68	2,5 ± 0,1	0,000	0	0	b		
Lin185F4	4,03	2,0 ± 0,4	0,015	0	0	a		
Lin187C7	5,90	2,6 ± 0,4	0,007	0	0	b	LinJ26_V3.1680 LinJ26_V3.1690 LinJ26_V3.1700	Esfingolípido δ-4 desaturasa Citocromo c oxidasa, subunidad V, coxV, putativa Proteína hipotética conservada
Lin188A5	8,30	3,0 ± 0,6	0,013	0	0	b		
Lin193F5	4,31	2,1 ± 0,2	0,004	0	0	b	LinJ36_V3.2070 LinJ36_V3.2080 LinJ36_V3.2090	Fosfomanomutasa, putativa Proteína hipotética conservada Proteína fosfatasa 2, subunidad catalítica A2, putativa
Lin197D2	4,98	2,3 ± 0,5	0,015	0	0	b	LinJ07_V3.0150 LinJ07_V3.0160 LinJ07_V3.0170	Acil-CoA deshidrogenasa, precursor mitocondrial, putativo Proteína hipotética conservada Proteína de tipo deshidratasa Maoc, putativa
Lin199B5	3,81	1,9 ± 0,3	0,008	0	0	b		
Lin200D7	2,28	1,2 ± 0,4	0,037	0	3e-58	b	LinJ35_V3.1580 LinJ35_V3.1590	Metacaspase, putativa Proteína hipotética conservada
Lin205D11	6,79	2,8 ± 0,3	0,005	0	0	a	LinJ29_V3.2420 LinJ29_V3.2430	Enoil-CoA hidratasa isomerasa, putativa Proteína quinasa activada por mitógeno, putativa
Lin205F11	2,40	1,3 ± 0,1	0,002	0	0	a	LinJ12_V3.0480 LinJ12_V3.0490	Subunidad de la ATP sintasa vacuolar, putativa Glucosa 6-fosfato isomerasa
Lin209E3	7,93	3,0 ± 0,5	0,011	2e-130	5e-137	a		
Lin212C11	3,96	2,0 ± 0,6	0,033	8e-136	2e-142	a		
Lin227B7	5,21	2,4 ± 0,8	0,036	0	0	b		
Lin228D4	3,28	1,7 ± 0,1	0,002	0	0	a	LinJ19_V3.0080 LinJ19_V3.0090	Proteína hipotética conservada Fibrilarina, putativa
Lin239C5	3,04	1,6 ± 0,2	0,002	0	0	a	LinJ28_V3.2210 LinJ28_V3.2220	Proteína hipotética conservada Proteína mitocondrial DEAD, putativa
Lin249D10	3,89	2,0 ± 0,4	0,015	0	0	b		
Lin267B9	3,08	1,6 ± 0,2	0,006	0	0	b	LinJ36_V3.0580 LinJ36_V3.0590 LinJ36_V3.0600	Proteína hipotética conservada Proteína de tipo ubiquitina, putativa Proteína relacionada con la proteína quinasa cdc2, putativa
Lin271B3	2,62	1,4 ± 0,2	0,009	0	0	a	LinJ31_V3.0580 LinJ31_V3.0590	Mevalonato quinasa, putativa Amino acid transporter aATP11, putativa
Lin276A4	2,36	1,2 ± 0,4	0,030	0	0	a	LinJ30_V3.-0640 LinJ30_V3.0650 LinJ36_V3.0550 LinJ36_V3.0560 LinJ36_V3.0570 LinJ36_V3.0580	Proteína reguladora de la síntesis de los ribosomas (RRS1), putativa Histidil-ARNt sintetasa, putativa Proteína hipotética conservada Proteína de tipo proteína fosfatasa 2C Ribonucleoproteína pequeña nuclear, putativa Proteína hipotética conservada
Lin280D9	5,05	2,3 ± 0,9	0,043	0	0	a	LinJ36_V3.3840 LinJ36_V3.3850 LinJ36_V3.3610 LinJ36_V3.3620	Hidrolasa de tipo <i>nudix</i> , putativa Proteína hipotética conservada Glicosil transferasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin285F5	5,26	2,4 ± 0,9	0,041	0	0	a	LinJ25_V3.2260 LinJ25_V3.2270 LinJ25_V3.2280	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína de clasificación vacuolar, putativa
Lin289F11	4,89	2,3 ± 0,2	0,002	0	0	b	LinJ36_V3.7300 LinJ36_V3.7310 LinJ33_V3.1410 LinJ33_V3.1420	Proteína hipotética conservada/elks δ-like protein Proteína hipotética conservada Proteína de tipo aminotransferasa β-liasa de conjugados de cisteína, putativa Proteína de membrana asociada a vesículas de tipo sintaxina
Lin291A7	2,14	1,1 ± 0,4	0,039	0	0	b		
Lin298B12	3,06	1,6 ± 0,2	0,006	0	0	a		
Lin309G12	3,65	1,9 ± 0,1	0,001	0	5e-26	b		

Tabla A26. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sub-expresados en Pper/E.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin3C7	-2,18	-1,1 ± 0,1	0,006	0	0	b	LinJ29_V3.0310	Proteína hipotética conservada
Lin4F1	-4,52	-2,2 ± 0,2	0,003	0	0	b	LinJ18_V3.0660	Proteína hipotética conservada
Lin9H9	-2,22	-1,1 ± 0,0	0,001	0	0	b	LinJ25_V3.1440	Proteína hipotética conservada
Lin20G7	-2,60	-1,4 ± 0,2	0,005	0	0	a	LinJ29_V3.2870	Proteína hipotética conservada
Lin21A12	-2,31	-1,2 ± 0,3	0,025	0	0	b	LinJ30_V3.2660	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2670	Proteína hipotética conservada
Lin22A11	-2,51	-1,3 ± 0,3	0,016	0	3-172	b	LinJ33_V3.0400	Proteína hipotética conservada
Lin22D3	-2,37	-1,2 ± 0,1	0,001	0	0	b	LinJ06_V3.1250	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ06_V3.1260	Proteína hipotética, función desconocida
Lin26G6	-2,89	-1,5 ± 0,2	0,004	7e-93	1e-97	a	LinJ19_V3.0880	Proteína hipotética conservada
Lin30C11	-4,2	-2,1 ± 0,3	0,006	0	0	a	LinJ30_V3.2400	Proteína hipotética conservada
Lin31A8	-2,04	-1,0 ± 0,2	0,014	0	0	b	LinJ19_V3.1170	Proteína hipotética conservada
							LinJ19_V3.1180	Proteína hipotética conservada
Lin31F6	-2,11	-1,1 ± 0,2	0,014	3e-126	0	b	LinJ35_V3.0180	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.0190	Proteína hipotética conservada
Lin32H7	-3,37	-1,7 ± 0,1	0,001	2e-151	6e-112	a	LinJ31_V3.1380	Proteína hipotética conservada
Lin34F12	-2,57	-1,4 ± 0,2	0,007	0	0	a	LinJ03_V3.0290	Proteína hipotética conservada
Lin37B5	-2,75	-1,5 ± 0,1	0,002	0	0	a	LinJ33_V3.0570	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0580	Proteína hipotética conservada
Lin42H2	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,007	0	0	a	LinJ35_V3.3600	Proteína hipotética conservada
Lin46B3	-3,16	-1,7 ± 0,4	0,017	0	0	a	LinJ32_V3.3750	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.3760	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.3770	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.3780	Proteína hipotética conservada
Lin62E10	-2,80	-1,5 ± 0,5	0,003	0	0	b	LinJ35_V3.3440	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.3450	Proteína hipotética conservada
Lin68A12	-2,08	-1,0 ± 0,4	0,038	0	0	a	LinJ09_V3.0320	Proteína hipotética conservada
Lin69C11	-2,41	-1,3 ± 0,4	0,038	0	0	b	LinJ15_V3.0210	Proteína hipotética conservada
Lin74B8	-2,41	-1,3 ± 0,1	0,001	0	5e-134	b	LinJ17_V3.0990	Proteína hipotética conservada
							LinJ17_V3.1000	Proteína hipotética conservada
Lin74G10	-2,84	-1,5 ± 0,4	0,025	0	0	b	LinJ14_V3.1410	Proteína hipotética conservada
Lin79B10	-3,08	-1,6 ± 0,3	0,014	0	0	b	LinJ35_V3.2580	Proteína hipotética, función desconocida
Lin78C9	-2,51	-1,3 ± 0,3	0,016	0	0	b	LinJ32_V3.0340	Proteína hipotética, función desconocida
Lin90H3	-2,58	-1,4 ± 0,1	0,002	0	0	a	LinJ19_V3.1540	Proteína hipotética conservada
Lin92C5	-2,49	-1,3 ± 0,4	0,024	0	0	b	LinJ23_V3.0910	Proteína hipotética conservada
Lin95E6	-2,79	-1,5 ± 0,2	0,008	0	2e-179	b	LinJ16_V3.1080	Proteína hipotética conservada
Lin99A12	-2,03	-1,0 ± 0,1	0,002	0	0	b	LinJ33_V3.0160	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0170	Proteína hipotética, función desconocida
Lin99F11	-2,35	-1,2 ± 0,4	0,032	0	0	a	LinJ30_V3.3250	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.3260	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.3270	Proteína hipotética conservada
Lin104C12	-2,30	-1,2 ± 0,0	0,017	0	0	b	LinJ18_V3.0390	Proteína hipotética conservada
Lin104D12	-2,32	-1,2 ± 0,6	0,044	0	0	a	LinJ32_V3.1840	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.1850	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.1860	Proteína hipotética conservada
Lin105G12	-2,44	-1,3 ± 0,5	0,040	1e-20	1e-29	b	LinJ29_V3.1510	Proteína hipotética conservada
Lin106B12	-3,61	-1,8 ± 0,5	0,021	0	0	b	LinJ29_V3.2330	Proteína hipotética, función desconocida
Lin109B11	-2,66	-1,4 ± 0,2	0,005	0	0	b	LinJ22_V3.1070	Proteína hipotética conservada
Lin111D1	-2,32	-1,2 ± 0,3	0,016	0	0	a	LinJ31_V3.2630	Proteína hipotética conservada
Lin111G5	-2,27	-1,2 ± 0,1	0,006	0	0	b	LinJ31_V3.2630	Proteína hipotética conservada
Lin120D4	-2,10	-1,1 ± 0,3	0,019	0	0	b	LinJ36_V3.2960	Proteína hipotética conservada
Lin120G5	-2,69	-1,4 ± 0,3	0,014	0	0	a	LinJ31_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin121B2	-3,58	-1,8 ± 0,1	0,001	0	4e-153	b	LinJ30_V3.1770	Proteína hipotética conservada
Lin123G2	-2,41	-1,3 ± 0,3	0,002	0	0	b	LinJ24_V3.1940	Proteína hipotética conservada
Lin124D2	-2,73	-1,4 ± 0,3	0,014	0	0	a	LinJ09_V3.105	Proteína hipotética conservada
Lin125A5	-2,77	-1,5 ± 0,5	0,032	0	0	b	LinJ32_V3.2410	Proteína hipotética conservada
Lin126F11	-2,96	-1,6 ± 0,2	0,006	0	0	a	LinJ09_V3.1260	Proteína hipotética conservada
							LinJ09_V3.1270	Proteína hipotética, función desconocida
Lin130H3	-2,02	-1,0 ± 0,3	0,021	0	0	a	LinJ27_V3.1550	Proteína hipotética conservada
Lin131G3	-2,32	-1,2 ± 0,1	0,005	8e-179	0	b	LinJ35_V3.3770	Proteína hipotética conservada
Lin131H9	-2,00	-1,0 ± 0,2	0,018	0	0	b	LinJ04_V3.0740	Proteína hipotética conservada
Lin133B9	-2,11	-1,1 ± 0,1	0,004	0	4e-57	b	LinJ31_V3.1670	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.1680	Proteína hipotética conservada
Lin137A6	-2,49	-1,3 ± 0,2	0,005	0	0	a	LinJ12_V3.0360	Proteína hipotética
							LinJ12_V3.0370	Proteína hipotética conservada
Lin142A8	-2,02	-1,0 ± 0,2	0,014	5e-177	0	b	LinJ21_V3.0850	Proteína hipotética conservada
Lin143A11	-2,63	-1,0 ± 0,4	0,022	0	0	b	LinJ13_V3.0200	Proteína hipotética conservada
Lin150A5	-5,35	-2,4 ± 0,5	0,014	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin155F1	-2,5	-1,3 ± 0,2	0,010	0	0	b	LinJ31_V3.1100	Proteína hipotética conservada
Lin157A11	-2,03	-1,0 ± 0,1	0,002	0	0	b	LinJ35_V3.3250	Proteína hipotética conservada
Lin158D6	-3,12	-1,6 ± 0,1	0,003	0	0	b	LinJ15_V3.0060	Proteína hipotética conservada
Lin159B5	-3,35	-1,7 ± 0,2	0,004	0	0	b	LinJ34_V3.1990	Proteína hipotética conservada
Lin161G12	-3,06	-1,6 ± 0,5	0,031	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
Lin165B10	-2,82	-1,5 ± 0,4	0,019	0	0	b	LinJ30_V3.1620	Proteína hipotética conservada
Lin166F9	-2,52	-1,3 ± 0,3	0,016	4e-116	3e-70	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin169B11	-2,93	-1,5 ± 0,4	0,025	0	4e-162	b	LinJ06_V3.1130	Proteína hipotética conservada
							LinJ06_V3.1140	Proteína hipotética conservada
Lin173B8	-2,13	-1,1 ± 0,2	0,016	0	0	b	LinJ16_V3.1080	Proteína hipotética conservada
Lin174B9	-3,92	-2,0 ± 0,2	0,003	9e-179	2e-31	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin174H9	-3,07	-1,6 ± 0,3	0,011	0	0	a	LinJ32_V3.1580	Proteína hipotética
Lin181G3	-2,68	-1,4 ± 0,2	0,005	0	0	b	LinJ13_V3.0600	Proteína hipotética conservada
Lin181H11	-6,70	-2,7 ± 0,6	0,015	0	0	a	LinJ18_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin185D3	-2,23	-1,2 ± 0,1	0,004	0	0	b	LinJ22_V3.1070	Proteína hipotética conservada
Lin188A7	-2,15	-1,1 ± 0,2	0,010	0	0	b	LinJ23_V3.1360	Proteína hipotética conservada

Continuación Tabla A26

Lin188C7	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,013	0	0	a	LinJ33_V3.0430	Proteína hipotética conservada
Lin206E8	-3,16	-1,7 ± 0,7	0,048	0	0	b	LinJ36_V3.0900	Proteína hipotética conservada
Lin207B7	-2,65	-1,4 ± 0,4	0,026	0	0	b	LinJ23_V3.0650	Proteína hipotética conservada
							LinJ23_V3.0660	Proteína hipotética conservada
Lin209A6	-2,68	-1,4 ± 0,2	0,005	0	0	b	LinJ22_V3.1070	Proteína hipotética conservada
Lin209F9	-2,08	-1,0 ± 0,3	0,035	0	2e-90	b	LinJ36_V3.4970	Proteína hipotética conservada
Lin210F2	-4,19	-2,1 ± 0,4	0,017	0	0	b	LinJ32_V3.1100	Proteína hipotética conservada
Lin226F8	-2,26	-1,2 ± 0,15	0,005	2e-142	0	b	LinJ26_V3.0710	Proteína hipotética conservada
Lin251B6	-2,77	-1,5 ± 0,2	0,009	0	0	b	LinJ31_V3.1470	Proteína hipotética, función desconocida

Tabla A27. Clones que contienen genes sub-expresados en Pper/E no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin4H3	-2,01	-1,0 ± 0,1	0,002	0	0	b		
Lin11G12	-2,20	-1,1 ± 0,4	0,046	5e-35	1e-38	a		
Lin16A10	-2,25	-1,2 ± 0,1	0,011	0	0	b	LinJ32_V3.0460	Proteína ribosómica 40S S2, putativa
							LinJ32_V3.0470	Prostaglandina F sintasa, putativa
Lin16H12	-3,89	-2,0 ± 0,1	0,002	0	0	b		
Lin34G5	-5,32	-2,4 ± 0,9	0,043	0	0	b	LinJ06_V3.0340	Proteína de tipo serina oligopeptidasa B, Clan SC, familia S9A
							LinJ06_V3.0350	Proteína de tipo esteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(P)
Lin37B5	-2,75	-1,5 ± 0,1	0,002	0	0	c	LinJ05_V3.0750	Proteína hipotética conservada
Lin38F1	-4,0	-1,8 ± 0,5	0,027	4e-144	4e-153	b		
Lin41E1	-2,30	-1,2 ± 0,2	0,009	0	0	b		
Lin43B1	-5,88	-2,5 ± 0,2	0,002	4e-79	0	b		
Lin46E9	-2,96	-1,6 ± 0,1	0,001	3e-110	8e-108	a		
Lin50E2	-3,56	-1,8 ± 0,4	0,013	8e-22	0	b	LinJ07_V3.0540	Proteína hipotética conservada
							LinJ07_V3.0550	Proteína ribosómica 60S L7, putativa
Lin50H6	-8,73	-3,1 ± 0,1	0,001	0	0	b	LinJ18_V3.0480	Uracil ADN glicosilasa, putativa
							LinJ18_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin53D8	-5,56	-2,5 ± 0,2	0,002	0	0	b	LinJ30_V3.3700	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.3710	Proteína ribosómica L15, putativa
Lin55G12	-2,52	-1,3 ± 0,4	0,032	0	0	b		
Lin56A3	-2,58	-1,4 ± 0,1	0,002	0	0	c	LinJ35_V3.0690	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.1190	Proteína hipotética conservada
Lin57H2	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,014	8e-102	2e-117	a		
Lin58A12	-2,04	-1,0 ± 0,2	0,012	0	0	b		
Lin59D2	-2,38	-1,2 ± 0,2	0,010	0	0	b		
Lin59H10	-3,13	-1,6 ± 0,2	0,004	0	0	b		
Lin60G2	-2,14	-1,1 ± 0,2	0,014	0	0	b		
Lin63A6	-3,62	-1,8 ± 0,3	0,012	0	0	b		
Lin63A10	-2,10	-1,1 ± 0,1	0,005	0	0	b		
Lin70D12	-2,64	-1,4 ± 0,4	0,021	3e-55	1e-54	a		
Lin71E11	-2,46	-1,3 ± 0,3	0,015	0	0	b		
Lin73B8	-2,39	-1,3 ± 0,2	0,010	0	0	c	LinJ36_V3.4440	Proteína hipotética conservada
Lin74E9	-2,15	-1,1 ± 0,1	0,001	0	0	a		
Lin76B10	-2,43	-1,3 ± 0,3	0,002	0	0	b		
Lin80D7	-5,59	-2,5 ± 0,2	0,003	0	0	a		
Lin81D10	-2,61	-1,4 ± 0,4	0,021	-	8e-133	c		
Lin86H7	-2,48	-1,3 ± 0,2	0,009	-	3e-101	c		
Lin88A1	-2,30	-1,2 ± 0,2	0,009	0	0	c		
Lin90E10	-2,87	-1,5 ± 0,3	0,012	0	0	c		
Lin90E12	-2,57	-1,4 ± 0,3	0,017	0	0	c	LinJ21_V3.1350	Proteína hipotética conservada
Lin94D11	-2,33	-1,2 ± 0,2	0,007	0	0	b		
Lin94E7	-2,31	-1,2 ± 0,4	0,033	0	0	b		
Lin91E11	-2,34	-1,2 ± 0,1	0,002	2e-102	5e-63	b		
Lin91F10	-2,89	-1,5 ± 0,1	0,001	2e-173	0	b		
Lin91F9	-2,26	-1,2 ± 0,4	0,038	0	0	c	LinJ31_V3.1630	Proteína hipotética, función desconocida
Lin95D8	-7,16	-2,8 ± 0,3	0,004	0	2e-43	b		
Lin96H8	-2,62	-1,4 ± 0,1	0,003	0	0	b		
Lin101F3	-2,09	-1,1 ± 0,2	0,013	0	0	c	LinJ30_V3.1870	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.1880	Proteína hipotética conservada
Lin103C9	-2,74	-1,5 ± 0,3	0,014	0	0	c	LinJ23_V3.1900	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2070	Proteína hipotética conservada
Lin104E4	-2,95	-1,6 ± 0,4	0,024	0	0	b		
Lin109D1	-2,77	-1,5 ± 0,3	0,013	0	0	b		
Lin109E10	-9,09	-3,2 ± 0,2	0,002	0	-	c	LinJ12_V3.0330	Proteína hipotética, función desconocida
Lin109G9	-2,08	-1,0 ± 0,2	0,015	0	0	b		
Lin112F4	-2,38	-1,2 ± 0,2	0,013	1e-125	0	b		
Lin117C12	-2,08	-1,1 ± 0,1	0,004	0	0	b		
Lin117G9	-2,58	-1,4 ± 0,2	0,005	0	0	b		
Lin118B11	-12,1	-3,6 ± 1,0	0,027	3e-123	-	c	LinJ32_V3.0910	Proteína hipotética conservada
Lin119B9	-2,85	-1,5 ± 0,5	0,030	0	0	a		
Lin122A10	-2,64	-1,4 ± 0,4	0,002	0	0	b		
Lin125A7	-2,27	-1,2 ± 0,1	0,002	0	0	c	LinJ31_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin127C6	-2,56	-1,3 ± 0,4	0,027	0	0	b		
Lin132E1	-2,20	-1,1 ± 0,1	0,005	0	0	c	LinJ16_V3.0450	Fucosa quinasa, putativa
Lin133F3	-2,71	-1,4 ± 0,6	0,048	0	-	c		
Lin141D11	-2,39	-1,3 ± 0,1	0,001	8e-170	4e-168	b		
Lin145G6	-2,04	-1,0 ± 0,3	0,034	0	0	b		
Lin146E6	-2,23	-1,2 ± 0,3	0,019	0	0	b		
Lin147A9	-2,28	-1,2 ± 0,3	0,009	7e-167	0	c	LinJ14_V3.1590	Sinaptojanina (dominio N-terminal)/inositol 5'-fosfatasa, putativa
Lin153A11	-2,17	-1,1 ± 0,4	0,044	-	9e-114	c	LinJ30_V3.3390	Proteína ribosómica 60S L9
Lin155F6	-2,16	-1,1 ± 0,2	0,007	0	0	c	LinJ36_V3.4530	
Lin165B11	-2,42	-1,3 ± 0,2	0,007	1e-177	0	b		
Lin166C10	-2,26	-1,2 ± 0,5	0,047	0	0	b		
Lin166E11	-2,03	-1,0 ± 0,2	0,013	0	0	b		
Lin174G2	-2,26	-1,2 ± 0,1	0,001	0	0	b		
Lin175A9	-2,12	-1,1 ± 0,0	0,017	1e-115	5e-60	b		
Lin185E4	-2,15	-1,1 ± 0,2	0,010	1e-23	7e-19	b		

Continuación Tabla A27

Lin198C8	-2,39	-1,3 ± 0,3	0,022	3e-172	0	b		
Lin201D1	-7,55	-2,9 ± 0,8	0,025	2e-158	-	c	LinJ36_V3.2970	Helicasa DEAD/H dependiente de ATP
Lin202D10	-5,42	-2,4 ± 0,8	0,034	0	-	c	LinJ31_V3.2330	Aminopeptidasa metalo-peptidasa, Clan MA(E), familia M1
Lin208D6	-4,33	-2,1 ± 0,3	0,005	0	0	c	LinJ29_V3.1150	Proteína hipotética conservada
Lin202A6	-2,51	-1,3 ± 0,3	0,023	0	0	c		
Lin204H7	-2,91	-1,5 ± 0,2	0,005	0	0	b		
Lin205B4	-2,08	-1,1 ± 0,1	0,005	0	0	b		
Lin209B6	-2,34	-1,2 ± 0,1	0,005	0	0	b		
Lin211C7	-2,21	-1,1 ± 0,2	0,015	0	8e-133	a		
Lin212A11	-2,26	-1,2 ± 0,3	0,027	0	0	b		
Lin249F3	-2,40	-1,3 ± 0,4	0,036	0	0	a		
Lin251G12	-2,32	-1,2 ± 0,3	0,027	7e-121	4e-165	a		
Lin264E1	-2,83	-1,5 ± 0,4	0,028	0	0	b		
Lin267H2	-2,34	-1,2 ± 0,2	0,011	0	0	b		
Lin271B5	-2,28	-1,2 ± 0,4	0,032	7e-161	7e-161	b		
Lin282D2	-2,04	-1,0 ± 0,1	0,004	5e-177	1e-54	b		
Lin283G8	-2,49	-1,3 ± 0,3	0,023	0	0	b		

Tabla A28. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresados en Pper/PNA.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin99E6	8,00	3,0 ± 0,4	0,048	0	0	b	LinJ26_V3.0710	Proteína hipotética conservada
Lin100B4	2,90	1,5 ± 0,6	0,006	0	0	b	LinJ06_V3.0050	Proteína hipotética conservada
Lin100E10	2,00	1,0 ± 0,3	0,009	6 e-38	2 e-47	a	LinJ30_V3.1690	Proteína hipotética conservada
Lin110G10	2,11	1,1 ± 0,2	0,034	1e-119	1e-112	a	LinJ30_V3.1550	Proteína hipotética conservada
Lin111C2	5,63	2,5 ± 0,9	0,023	3 e-38	1 e-29	a	LinJ30_V3.1690	Proteína hipotética conservada
Lin139D10	5,02	2,3 ± 0,5	0,020	0	0	b	LinJ30_V3.1370	Proteína hipotética, función desconocida
Lin139E9	4,0	2,0 ± 0,6	0,007	0	0	b	LinJ30_V3.1370	Proteína hipotética conservada
Lin140C10	3,30	1,7 ± 0,4	0,022	0	0	b	LinJ30_V3.1370	Proteína hipotética, función desconocida
Lin142C8	3,28	1,7 ± 0,4	0,025	0	0	b	LinJ33_V3.1900	Proteína hipotética conservada
Lin147B10	2,06	1,0 ± 0,4	0,032	0	0	b	LinJ31_V3.1420	Proteína hipotética conservada
Lin147C7	2,29	1,2 ± 0,4	0,042	0	0	b	LinJ08_V3.0430	Proteína hipotética conservada
Lin148B12	2,20	1,1 ± 0,2	0,007	0	0	b	LinJ09_V3.1060	Proteína hipotética conservada
Lin149E5	2,10	1,1 ± 0,5	0,008	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin153C3	2,49	1,3 ± 0,5	0,015	0	0	b	LinJ31_V3.0920	Proteína hipotética conservada
Lin155C10	2,71	1,4 ± 0,2	0,041	0	0	a	LinJ22_V3.1330	Proteína hipotética conservada
Lin155H9	2,08	1,1 ± 0,7	0,008	0	0	b	LinJ28_V3.1140	Proteína hipotética conservada
Lin158A9	2,51	1,3 ± 0,4	0,039	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin159A12	2,02	1,0 ± 0,4	0,040	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin159D9	2,21	1,1 ± 0,6	0,035	0	0	b	LinJ35_V3.2920	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.2930	Proteína hipotética conservada
Lin159D10	2,76	1,5 ± 0,4	0,000	0	0	b	LinJ35_V3.2920	Proteína hipotética conservada
Lin170F11	2,00	1,0 ± 0,8	0,009	0	0	b	LinJ35_V3.0940	Proteína hipotética conservada
Lin172B12				0	0	b	LinJ31_V3.1680	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.1690	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.1700	Proteína hipotética conservada
Lin181A10	4,00	2,0 ± 0,2	0,026	0	0	b	LinJ22_V3.0610	Proteína hipotética conservada
Lin181G1	2,20	1,1 ± 0,1	0,041	0	0	b	LinJ22_V3.0050	Proteína hipotética conservada
Lin182G11	4,92	2,3 ± 0,6	0,029	0	0	b	LinJ07_V3.0020	Proteína hipotética conservada
							LinJ07_V3.0030	Proteína hipotética conservada
Lin183B10	2,23	1,2 ± 0,5	0,019	0	0	a	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin186B9	2,31	1,2 ± 0,4	0,002	0	0	b	LinJ30_V3.2880	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2890	Proteína hipotética conservada
Lin194G11	2,60	1,4 ± 0,4	0,024	0	0	a	LinJ32_V3.0010	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.0020	Proteína hipotética conservada
Lin198E3	4,82	2,3 ± 0,4	0,006	0	9 e-179	b	LinJ06_V3.1360	Proteína hipotética conservada
Lin200B5	2,42	1,3 ± 0,4	0,017	0	0		LinJ32_V3.3190	Proteína hipotética conservada
Lin200D7	2,55	1,4 ± 0,8	0,025	0	0	b	LinJ36_V3.0520	Proteína hipotética conservada
Lin202E12	2,71	1,4 ± 0,1	0,009	0	0	a	LinJ07_V3.0040	Proteína hipotética conservada
Lin210D4	6,24	2,6 ± 0,2	0,020	0	7e-167	b	LinJ22_V3.0620	Proteína hipotética conservada
Lin211E4	2,83	1,5 ± 0,1	0,006	0	0	b	LinJ31_V3.0960	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.0970	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.0980	Proteína hipotética conservada
Lin219A3	2,14	1,1 ± 0,1	0,012	0	0	b	LinJ31_V3.2340	Proteína hipotética conservada
Lin221A4	2,16	1,1 ± 0,2	0,016	0	0	b	LinJ36_V3.1500	Proteína hipotética conservada
Lin227B12	3,69	1,9 ± 0,1	0,007	2e-173	5e-74	a	LinJ31_V3.1000	Proteína hipotética conservada
Lin228C4	2,54	1,3 ± 0,2	0,041	0	0	b	LinJ31_V3.2310	Proteína hipotética, función desconocida
Lin233E10	2,25	1,2 ± 0,4	0,039	0	0	c	LinJ34_V3.2170	Proteína hipotética conservada
							LinJ15_V3.1300	Proteína hipotética conservada
Lin238F5	6,81	2,8 ± 0,2	0,045	0	0	a	LinJ03_V3.0020	Proteína hipotética conservada
Lin240G12	2,33	1,2 ± 0,1	0,018	0	0	b	LinJ22_V3.0620	Proteína hipotética conservada
Lin241D5	2,21	1,1 ± 0,3	0,021	0	0	a	LinJ17_V3.0020	Proteína hipotética conservada
							LinJ17_V3.0030	Proteína hipotética conservada
Lin250G5	2,87	1,5 ± 0,3	0,035	0	0	b	LinJ09_V3.1610	Proteína hipotética conservada
Lin252G1	2,09	1,1 ± 0,1	0,006	0	0	a	LinJ34_V3.4040	Proteína hipotética conservada
Lin280H4	2,71	1,4 ± 0,5	0,019	0	0	b	LinJ34_V3.0780	Proteína hipotética conservada
							LinJ34_V3.0790	Proteína hipotética conservada
Lin299D9	2,43	1,3 ± 0,3	0,030	0	0	b	LinJ17_V3.0970	Proteína hipotética conservada
Lin311E4	2,15	1,1 ± 0,2	0,034	0	2e-121	a	LinJ31_V3.0760	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.0770	Proteína hipotética conservada

Tabla A29. Clones que contienen genes sobre-expresados en Pper/PNA⁻ no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin100B12	4,88	2,3 ± 0,4	0,021	0	0	b	LinJ06_V3.0340 LinJ06_V3.0350	Oligopeptidasa B/Serina peptidasa, Clan SC, familia S19A Proteína de tipo esteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(P)
Lin103B5	4,36	2,1 ± 0,4	0,037	0	0	a	LinJ06_V3.0360 LinJ30_V3.0810 LinJ30_V3.0820 LinJ30_V3.0830	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína mitocondrial de unión a oligo (U) TBRGG1, putativa
Lin106A5	6,19	2,6 ± 0,6	0,038	3 e-55	2 e-56	b		
Lin107E1	2,31	1,2 ± 0,4	0,024	0	0	b		
Lin107G9	4,97	2,31 ± 0,1	0,003	5e-106	2e-118	a		
Lin116G12	7,08	2,8 ± 0,7	0,043	0	0	b	LinJ01_V3.0310 LinJ01_V3.0320 LinJ01_V3.0330 LinJ01_V3.0340 LinJ01_V3.0350	Exopolifosfatasa del acantosoma, putativa Proteína hipotética conservada Proteína de exportación de poli (A), putativa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin122D5	2,39	1,3 ± 0,4	0,036	0	0	c		
Lin123A10	2,72	1,4 ± 0,3	0,006	0	0	c		
Lin128B11	2,25	1,2 ± 0,3	0,027	0	0	c		
Lin139A5	2,31	1,2 ± 0,2	0,002	4 e-56	1 e-143	b		
Lin135B8	2,36	1,2 ± 0,5	0,011	6 e-38	2 e-47	a		
Lin142C8	3,28	1,7 ± 0,4	0,025	0	0	a	LinJ21_V3.0790 LinJ21_V3.0800 LinJ21_V3.0810 LinJ21_V3.0820	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L36, putativa Proteína hipotética conservada Subunidad 9 de la ATPasa, putativa
Lin143C12	2,24	1,2 ± 0,7	0,004	0	0	b	LinJ22_V3.1360 LinJ22_V3.1370	Proteína hipotética, función desconocida Proteína ribosómica 40S L14, putativa
Lin145A1	3,55	1,8 ± 0,3	0,009	0	0	b	LinJ30_V3.0690 LinJ30_V3.0700 LinJ30_V3.0710 LinJ30_V3.0720	Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína de movimiento nuclear NUDC
Lin146A12	3,07	1,6 ± 0,3	0,003	0	0	b	LinJ30_V3.0690 LinJ30_V3.0700 LinJ30_V3.0710 LinJ30_V3.0720	Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína ribosómica 40S S30, putativa Proteína de movimiento nuclear NUDC
Lin149C10	5,34	2,4 ± 0,4	0,012	5 E-171	2 e-170	a		
Lin159G10	2,15	1,1 ± 0,1	0,034	0	0	c		
Lin151C7	2,01	1,0 ± 0,3	0,026	0	0	b	LinJ27_V3.1170	Ubiquitina hidrolasa/cisteína peptidasa, Clan CA, familia C19, putativa
Lin159D8	2,76	1,5 ± 0,8	0,016	0	0	b	LinJ27_V3.1180 LinJ36_V3.4370 LinJ36_V3.4380	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Oxidoreductasa, putativa
Lin163E10	5,86	2,5 ± 0,4	0,018	7 e-59	/e-59	b		
Lin166C12	4,06	2,0 ± 0,5	0,043	7 e-59	7 e-59	b		
Lin166F4	8,39	3,1 ± 0,8	0,022	7 e-59	7 e-59	b		
Lin169A11	3,89	2,0 ± 0,2	0,014	0	0	a	LinJ23_V3.0630 LinJ23_V3.0640	Proteína de tipo oxidoreductasa Proteína hipotética conservada
Lin169G11	2,35	1,2 ± 0,1	0,039	0	0	b	LinJ26_V3.0050 LinJ26_V3.0060	Proteína quinasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin171E5	2,67	1,4 ± 0,4	0,000	0	0	a	LinJ08_V3.0040 LinJ08_V3.0050 LinJ08_V3.0060 LinJ08_V3.0070	Proteína hipotética conservada Proteína hipotética, función desconocida Fosfoglicerato mutasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin172B12	2,58	1,4 ± 0,4	0,013	0	0	a		
Lin173H9	2,43	1,3 ± 0,2	0,024	0	0	b		
Lin175B5	3,92	2,0 ± 0,3	0,010	0	0	b	LinJ03_V3.0010 LinJ03_V3.0020 LinJ03_V3.0030	Proteína hipotética Proteína hipotética conservada Proteína de tipo D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa
Lin175B9	3,55	1,8 ± 0,4	0,036	7 e-59	7 e-59	b		
Lin179E10	3,58	1,8 ± 0,3	0,042	0	0	b	LinJ31_V3.2350 LinJ31_V3.2360	Factor de ribosilación de ADP Proteína de tipo fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
Lin179H9	2,45	1,3 ± 0,4	0,041	0	0	b	LinJ36_V3.0580 LinJ36_V3.0590	Proteína hipotética conservada Proteína de tipo ubiquitina
Lin181A10	4,00	2,0 ± 0,2	0,026	0	0	a		
Lin181G11	6,32	2,7 ± 0,8	0,026	7 e-59	7 e-59	b		
Lin181H2	3,53	1,8 ± 0,1	0,026	0	0	a	LinJ30_V3.0830 LinJ30_V3.0840	Proteína mitocondrial de unión a oligo (U) TBRGG1, putativa Proteína hipotética conservada
Lin185G7	5,56	2,4 ± 0,4	0,008	2 e-28	1 e-11	a		
Lin185H9	3,02	1,6 ± 0,5	0,002	7 e-59	7 e-59	b		
Lin187A11	2,30	1,2 ± 0,3	0,039	0	2 e-114	b		
Lin187B5	3,44	1,8 ± 0,2	0,015	0	0	b		
Lin187C5	3,99	2,0 ± 0,3	0,028	0	0	b	LinJ11_V3.0040 LinJ11_V3.0050	Transportador ABC, putativa ADN helicasa relacionada con SNF2/RAD54, putativa
Lin187C7	2,54	1,3 ± 0,3	0,040	0	0	b	LinJ26_V3.1680 LinJ26_V3.1690 LinJ26_V3.1700	Esfingolípido 64-desaturasa, putativa Citocromo c oxidasa, subunidad V, putativa Proteína hipotética conservada
Lin187G5	2,74	1,5 ± 0,6	0,016	7 e-59	7 e-59	b		
Lin188B1	2,50	1,3 ± 0,1	0,044	0	0	a	LinJ31_V3.1600 LinJ31_V3.1610	Citocromo c oxidasa, subunidad VIII (COXVIII), putativa Proteína hipotética conservada
Lin189B12	2,24	1,2 ± 0,2	0,029	0	0	a	LinJ24_V3.1370 LinJ24_V3.1380	Proteína hipotética conservada Factor de iniciación de la traducción IF2, putativa
Lin198H3	5,41	2,4 ± 0,4	0,017	4 e-54	1 e-51	b		
Lin198H9	2,39	1,3 ± 0,2	0,003	0	-	c		
Lin200B5	2,42	1,3 ± 0,4	0,017	5e-177	0	c	LinJ31_V3.3190	Proteína hipotética conservada
Lin200H3	6,48	2,7 ± 0,4	0,009	7 e-59	7 e-58	b		
Lin202G12	3,93	2,0 ± 0,6	0,040	7 e-59	2 e-56	b		
Lin203C2	2,32	1,2 ± 0,2	0,045	4 e-48	1 e-45	a		
Lin205B5	5,33	2,4 ± 0,7	0,006	7 e-59	7 e-59	b		
Lin208C2	2,50	1,3 ± 0,5	0,012	-	7 e-121	c		

Expresión génica diferencial en *Leishmania infantum*

Continuación Tabla A29

Lin208D3	5,62	2,5 ± 0,3	0,019	7 e-59	7 e-59	b		
Lin208F3	2,34	1,2 ± 0,2	0,009	1 e-143	9 e-108	b		
Lin210A1	2,38	1,2 ± 0,2	0,033	0	0	b		
Lin210B2	3,83	1,9 ± 0,3	0,024	0	0	b	LinJ31_V3.2340	Proteína hipotética conservada
Lin211A5	3,46	1,8 ± 0,6	0,037	0	0	a	LinJ31_V3.2350	Factor de ribosilación de ADP, putativa
Lin213G9	5,57	2,5 ± 0,5	0,045	5 e-32	1 e-23	a		
Lin215A7	2,68	1,4 ± 0,56	0,006	0	0	a	LinJ32_V3.0710	Quinesina de tipo OSM3, putativa
Lin220G1	3,49	1,8 ± 0,5	0,039	1 e-14	1 e-14	b	LinJ32_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin221G3	2,28	1,2 ± 0,4	0,035	0	0	b	LinJ36_V3.6360	Proteína hipotética conservada
Lin227G9	3,33	1,7 ± 0,4	0,001	2e-28	7e-22	a	LinJ36_V3.6370	Centrina, putativa
Lin228D4	6,45	2,7 ± 0,1	0,038	0	0	a	LinJ19_V3.0080	Proteína hipotética conservada
Lin230E9	2,32	1,2 ± 0,4	0,020	0	0	b	LinJ19_V3.0090	Fibrilarina, putativa
Lin233A7	2,26	1,2 ± 0,4	0,039	0	0	b	LinJ36_V3.6490	Factor de ribosilación de ADP, putativa
Lin233E9	4,72	2,2 ± 0,9	0,037	7e-59	7e-59	b	LinJ36_V3.6500	Proteína hipotética conservada
Lin233G7	13,04	3,7 ± 0,7	0,002	7e-59	7e-59	b		
Lin236A10	7,43	2,9 ± 0,5	0,046	7e-59	7e-59	b		
Lin240D3	3,51	1,8 ± 0,7	0,039	0	0	c	LinJ35_V3.3970	Proteína hipotética conservada
Lin242H7	2,60	1,4 ± 0,6	0,044	0	0	b	LinJ29_V3.0940	Proteína hipotética conservada
Lin243D10	4,47	2,2 ± 0,5	0,035	0	0	a	LinJ29_V3.0950	Factor 3 de ribosilación de ADP, putativa
Lin244G7	2,73	1,4 ± 0,3	0,011	3e-64	1e-63	a		
Lin250G8	2,91	1,5 ± 0,4	0,049	0	0	b	LinJ36_V3.6670	Metilentetrahidrofolato reductasa, putativa
Lin252C12	3,33	1,7 ± 0,2	0,049	1e-174	1e-100	b	LinJ36_V3.6680	Proteína ribosómica 40S S8, putativa
Lin266H7	2,93	1,5 ± 0,4	0,020	0	0	a		
Lin276C7	3,31	1,7 ± 0,3	0,020	0	0	b		
Lin269A8	9,52	3,2 ± 0,7	0,008	7e-59	7e-59	b		
Lin270A1	3,08	1,6 ± 0,5	0,018	0	0	b	LinJ11_V3.0980	Proteína hipotética conservada
Lin270F7	2,62	1,4 ± 0,6	0,007	7e-59	7 e-59	b	LinJ11_V3.0990	Proteína de tipo adaptina
Lin272A3	3,49	1,8 ± 0,2	0,036	0	0	b	LinJ23_V3.0040	Proteína todo β toroidal, putativa
Lin272G8	2,87	1,5 ± 0,3	0,021	0	0	b	LinJ23_V3.0050	Peroxidoxina/triparredoxina peroxidasa, putativa
Lin276B2	10,55	3,4 ± 0,6	0,045	7e-59	7e-59	b	LinJ23_V3.0060	Ciclofilina, putativa
Lin276F6	2,04	1,0 ± 0,3	0,042	0	0	a		
Lin280F11	2,61	1,4 ± 0,4	0,003	0	0	b		
Lin280H3	3,02	1,6 ± 0,4	0,030	7e-59	7e-59	b		
Lin281A7	3,31	1,7 ± 0,5	0,035	2e-56	2e-56	b		
Lin282C8	2,89	1,5 ± 0,7	0,002	1e-125	1e-125	b		
Lin288H7	3,19	1,7 ± 1,1	0,049	0	0	b	LinJ34_V3.2610	Serina/treonina proteína fosfatasa/fofoesterasa de tipo calcineurina
Lin292G5	3,57	1,8 ± 0,8	0,000	0	0	a	LinJ34_V3.2620	Proteína ribosómica S19, putativa
Lin302E4	3,12	1,6 ± 0,4	0,002	0	0	a	LinJ17_V3.1460	Proteína hipotética conservada
Lin308A8	2,62	1,4 ± 0,4	0,038	0	0	b	LinJ17_V3.1470	L-gluconolactona oxidasa, putativa
Lin312F4	5,31	2,4 ± 0,4	0,034	0	1e-82	b	LinJ36_V3.2080	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.2090	Serina/treonina proteína fosfatasa 2b subunidad catalítica A2, putativa
							LinJ30_V3.0700	Proteína ribosómica 40S S30, putativa
							LinJ30_V3.0710	Proteína ribosómica 40S S30, putativa
							LinJ30_V3.0720	Proteína de movimiento nuclear NUDC
							LinJ30_V3.0730	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.0740	CDC16, putativa
							LinJ21_V3.2180	Componente GAA1 de la GPI transamidasa, putativa
							LinJ21_V3.2190	Proteína ribosómica 60S L37a, putativa
							LinJ21_V3.2200	Subunidad α5 20S del proteasoma, putativa

Tabla A30. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sub-expresados en Pper/PNA⁻.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin43D8	-2,11	-1,1 ± 0,4	0,017	0	0	a	LinJ13_V3.0520	Proteína hipotética, función desconocida
Lin100E12	-2,66	-1,4 ± 0,2	0,049	0	0	a	LinJ13_V3.0530	Proteína hipotética conservada
Lin105F3	-2,46	-1,3 ± 0,1	0,019	0	0	a	LinJ23_V3.0730	Proteína hipotética conservada
Lin106H2	-3,17	-1,7 ± 0,2	0,002	6e-161	0	b	LinJ30_V3.2400	Proteína hipotética conservada
Lin107F2	-2,07	-1,0 ± 0,1	0,020	0	0	b	LinJ33_V3.0840	Proteína hipotética conservada
Lin109G10	-2,02	-1,0 ± 0,3	0,042	0	0	a	LinJ09_V3.0430	Proteína hipotética conservada
Lin111H4	-2,05	-1,0 ± 0,4	0,027	1e-66	3e-73	a	LinJ26_V3.2040	Proteína hipotética conservada
Lin121E9	-2,25	-1,2 ± 0,3	0,004	0	0	a	LinJ18_V3.0240	Proteína hipotética conservada
Lin123G10	-2,44	-1,3 ± 0,2	0,040	0	1e-119	b	LinJ36_V3.4430	Proteína hipotética conservada
Lin131H9	-2,03	-1,0 ± 0,3	0,011	0	0	b	LinJ36_V3.4440	Proteína hipotética conservada
Lin135D9	-2,33	-1,2 ± 0,2	0,017	0	0	b	LinJ31_V3.0560	Proteína hipotética conservada
Lin139G2	-4,42	-2,1 ± 0,3	0,028	0	0	b	LinJ31_V3.0570	Proteína hipotética conservada
Lin153H12	-2,78	-1,5 ± 0,1	0,018	2e-43	3e-52	b	LinJ04_V3.0740	Proteína hipotética conservada
Lin162B4	-2,09	-1,1 ± 0,2	0,026	0	0	a	LinJ15_V3.0060	Proteína hipotética conservada
Lin170D5	-2,00	-1,0 ± 0,3	0,005	0	0	a	LinJ15_V3.0070	Proteína hipotética conservada
Lin170F3	-2,03	-1,0 ± 0,5	0,018	0	0	b	LinJ35_V3.1710	Proteína hipotética conservada
Lin170G3	-2,38	-1,2 ± 0,1	0,019	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
Lin172C3	-2,23	-1,1 ± 0,2	0,007	0	1e-173	a	LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
Lin194D5	-2,33	-1,2 ± 0,3	0,013	0	0	a	LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin197E6	-3,88	-2,0 ± 0,0	0,040	0	0	a	LinJ14_V3.0380	Proteína hipotética conservada
Lin198F7	-2,65	-1,4 ± 0,5	0,009	0	0	a	LinJ22_V3.0620	Proteína hipotética conservada
Lin201A3	-2,01	-1,0 ± 0,1	0,016	0	0	a	LinJ31_V3.2220	Proteína hipotética, función desconocida
Lin201A11	-3,74	-1,9 ± 0,2	0,000	0	0	b	LinJ03_V3.0800	Proteína hipotética conservada
Lin202G9	-2,13	-1,1 ± 0,1	0,011	0	0	a	LinJ12_V3.0210	Proteína hipotética conservada
Lin203H5	-2,08	-1,0 ± 0,2	0,011	0	0	a	LinJ30_V3.0810	Proteína hipotética conservada
Lin205D8	-2,26	-1,2 ± 0,1	0,045	0	0	b	LinJ30_V3.2400	Proteína hipotética conservada
Lin208D11	-2,09	-1,1 ± 0,2	0,010	0	0	b	LinJ34_V3.2220	Proteína hipotética conservada
Lin221E10	-2,23	-1,2 ± 0,2	0,010	0	0	a	LinJ09_V3.1050	Proteína hipotética conservada
Lin223F2	-5,10	-2,3 ± 1,3	0,014	0	0	b	LinJ09_V3.0280	Proteína hipotética conservada
Lin230D7	2,34	-1,2 ± 0,4	0,002	0	0	a	LinJ30_V3.1760	Proteína hipotética conservada
							LinJ23_V3.0800	Proteína hipotética conservada
							LinJ09_V3.0810	Proteína hipotética conservada
							LinJ09_V3.0550	Proteína hipotética conservada
							LinJ22_V3.0920	Proteína hipotética conservada
							LinJ13_V3.1460	-
							LinJ06_V3.0200	Proteína hipotética conservada

Tabla A31. Clones que contienen genes sub-expresados en Pper/PNA⁻ no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin43C2	-2,05	-1,0 ± 0,1	0,007	7e-59	7e-59	b		
Lin85D12	-3,72	-1,9 ± 0,4	0,005	0	2e-55	b		
Lin87D8	-2,38	-1,2 ± 0,5	0,002	0	3e-110	b		
Lin98G4	-4,53	-2,2 ± 1,0	0,016	0	6e-118	a		
Lin100F11	-3,06	-1,6 ± 0,0	0,009	0	2e-154	a		
Lin106G6	-2,87	-1,5 ± 1,2	0,021	0	0	a	LinJ32_V3.0460	Proteína ribosómica 40S S2, putativa
Lin122H5	-2,10	-1,1 ± 0,0	0,023	0	0	c	LinJ32_V3.0470	Prostaglandina F sintasa, putativa
Lin130H1	-2,20	-1,1 ± 0,7	0,040	0	0	b	LinJ10_V3.0710	Proteína hipotética, función desconocida
Lin137A12	-2,08	-1,1 ± 0,0	0,043	2e-139	3e-138	b	LinJ32_V3.1080	Proteína quinasa, putativa
Lin138A1	-	-4,1 ± 0,3	0,011	2e-53	1e-57	a		
Lin140C6	-2,02	-1,0 ± 0,3	0,012	-	0	c	LinJ31_V3.1870	Proteína quinasa, putativa
Lin148A8	-2,17	-1,1 ± 0,6	0,042	0	0	b	LinJ21_V3.0720	Proteína de unión a nucleótidos, putativa
Lin150B4	-3,58	-1,8 ± 0,3	0,013	2e-139	1e-137	b	LinJ21_V3.0730	Proteína de la familia metalo-β-lactamasa
Lin150B7	-2,27	-1,2 ± 0,1	0,017	2e-71	2e-65	b		
Lin151G5	-2,2	-1,1 ± 0,2	0,029	2e-139	1e-137	b		
Lin156F9	-3,26	-1,7 ± 0,1	0,046	2e-139	3e-138	b		
Lin164G6	-4,42	-2,1 ± 0,6	0,018	4e-94	2e-93	a		
Lin177H5	-2,30	-1,2 ± 0,0	0,008	0	0	a		
Lin181E2	-2,63	-1,4 ± 0,4	0,009	0	0	c	LinJ22_V3.1480	Proteína hipotética conservada
Lin197E6	-3,88	-2,0 ± 0,0	0,001	0	-	c	LinJ36_V3.6840	Proteína hipotética conservada
Lin199D4	-2,60	-1,4 ± 0,0	0,019	0	-	c		
Lin201E2	-2,32	-1,2 ± 0,2	0,003	0	0	b	LinJ35_V3.0730	Proteína hipotética conservada
Lin202H8	-2,24	-1,2 ± 0,1	0,044	0	0	b	LinJ15_V3.0930	Proteína hipotética conservada
Lin204F3	-2,61	-1,4 ± 0,1	0,008	0	0	b	LinJ15_V3.0940	Mio-inositol 1-fosfatasa, putativa
Lin223B12	-3,49	-1,8 ± 0,6	0,020	0	0	c		
Lin227A5	-2,06	-1,0 ± 0,3	0,011	7e-59	7e-59	b	LinJ15_V3.0380	Proteína hipotética conservada
Lin228H3	-3,09	-1,6 ± 0,3	0,007	0	0	a	LinJ31_V3.3250	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa, putativa
Lin233C3	-2,81	-1,5 ± 0,2	0,034	0	0	b	LinJ31_V3.3260	Subunidad biotinilada de la metilcrotonil-CoA carboxilasa
Lin246E10	-2,38	-1,2 ± 0,3	0,024	-	0	c		
Lin261G3	-2,12	-1,1 ± 0,3	0,028	0	0	a	LinJ15_V3.0490	Proteína hipotética
Lin296F4	-2,14	-1,1 ± 0,2	0,032	0	0	b	LinJ18_V3.0360	Subunidad 8 de la transamidasa del GPI, cisteína peptidasa, Clan CD, familia C13, putativa
							LinJ18_V3.0370	Tubulina tiosina ligasa, putativa
							LinJ20_V3.0790	Proteína hipotética conservada
							LinJ20_V3.0800	Tubulina tiosina ligasa, putativa

Tabla A32. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sobre-expresados en Pper/A.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin9F8	2,60	1,4 ± 0,5	0,040	0	0	b	LinJ33_V3.3100	Proteína hipotética conservada
Lin16A12	2,21	1,1 ± 0,2	0,008	0	0	b	LinJ16_V3.1290	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ16_V3.1300	Proteína hipotética conservada
							LinJ16_V3.1310	Proteína hipotética conservada
Lin26A1	4,01	2,0 ± 0,4	0,012	0	0	b	LinJ25_V3.0090	Proteína hipotética conservada
							LinJ25_V3.0100	Proteína hipotética conservada
Lin28F4	2,95	1,6 ± 0,3	0,011	0	0	a	LinJ35_V3.3520	Proteína hipotética conservada
Lin35B6	2,34	1,2 ± 0,3	0,026	0	0	b	LinJ28_V3.0740	Proteína hipotética conservada
Lin43A9	5,93	2,5 ± 0,7	0,023	0	0	b	LinJ33_V3.0660	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0680	Proteína hipotética conservada
Lin43F10	2,31	1,2 ± 0,3	0,015	0	0	b	LinJ35_V3.4700	Proteína hipotética conservada
Lin57F10	3,16	1,7 ± 0,2	0,006	8e-28	3e-21	b	LinJ31_V3.2730	Proteína hipotética, función desconocida
Lin64A7	2,19	1,1 ± 0,4	0,035	0	0	b	LinJ09_V3.0590	Proteína hipotética, función desconocida
Lin74F12	3,55	1,8 ± 0,1	0,001	0	0	a	LinJ36_V3.0510	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.0520	Proteína hipotética conservada
Lin76F12	2,63	1,4 ± 0,5	0,042	0	7e-25	b	LinJ34_V3.3040	Proteína hipotética conservada
Lin77G12	3,24	1,7 ± 0,6	0,042	0	0	b	LinJ32_V3.1520	Proteína hipotética conservada
Lin80G4	3,43	1,8 ± 0,3	0,012	0	0	a	LinJ12_V3.0500	Proteína hipotética conservada
Lin81H4	5,28	2,4 ± 0,6	0,021	0	0	a	LinJ09_V3.1610	Proteína hipotética conservada
							LinJ09_V3.1620	Proteína hipotética conservada
Lin85E11	2,80	1,5 ± 0,5	0,034	4e-162	0	b	LinJ23_V3.0870	Proteína hipotética conservada
Lin94G2	3,60	1,8 ± 0,7	0,044	0	0	a	LinJ23_V3.0870	Proteína hipotética conservada
Lin96H11	2,77	1,5 ± 0,4	0,020	4e-153	9e-148	a	LinJ26_V3.1570	Proteína hipotética, función desconocida
Lin97E2	7,32	2,9 ± 0,5	0,012	0	0	b	LinJ23_V3.0010	Proteína hipotética conservada
Lin100H5	2,14	1,1 ± 0,3	0,034	0	0	b	LinJ27_V3.0490	Proteína hipotética conservada
Lin106F1	5,78	2,5 ± 0,3	0,006	0	0	b	LinJ35_V3.3970	Proteína hipotética conservada
Lin106G8	5,94	2,6 ± 0,6	0,021	0	0	b	LinJ24_V3.2430	Proteína hipotética conservada
Lin107G9	8,76	3,1 ± 0,6	0,013	0	0	b	LinJ13_V3.1430	Proteína hipotética conservada
							LinJ13_V3.1440	Proteína hipotética, función desconocida
Lin110B6	4,16	2,1 ± 0,4	0,015	0	0	b	LinJ36_V3.5200	Proteína hipotética conservada
Lin112D11	2,32	1,2 ± 0,4	0,043	1e-69	0	b	LinJ31_V3.2430	Proteína hipotética conservada
Lin119D12	2,06	1,0 ± 0,4	0,037	0	0	b	LinJ31_V3.2450	Proteína hipotética conservada
Lin123C11	2,68	1,4 ± 0,5	0,040	0	0	b	LinJ15_V3.0970	Proteína hipotética conservada
Lin128C11	4,47	2,2 ± 0,0	0,013	3e-166	7e-167	b	LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin129E3	3,64	1,9 ± 0,2	0,003	0	0	a	LinJ36_V3.6610	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.6620	Proteína hipotética conservada
Lin131F11	4,00	2,0 ± 0,7	0,042	0	0	a	LinJ34_V3.0040	Proteína hipotética conservada
							LinJ34_V3.0050	Proteína hipotética conservada
Lin133F9	3,00	1,6 ± 0,5	0,036	0	0	b	LinJ35_V3.5310	Proteína hipotética conservada
Lin134A3	2,61	1,4 ± 0,3	0,017	0	0	b	LinJ04_V3.0630	Proteína hipotética conservada
							LinJ04_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin134B10	2,97	1,6 ± 0,5	0,035	0	0	b	LinJ31_V3.2300	Proteína hipotética, función desconocida
Lin134B3	2,28	1,2 ± 0,3	0,027	0	0	a	LinJ10_V3.1340	Proteína hipotética
							LinJ10_V3.1350	Proteína hipotética
Lin135B3	4,74	2,2 ± 0,8	0,038	0	0	a	LinJ09_V3.1630	Proteína hipotética conservada
							LinJ09_V3.1640	Proteína hipotética conservada
Lin142B1	2,33	1,2 ± 0,4	0,033	0	0	b	LinJ25_V3.0100	Proteína hipotética conservada
							LinJ25_V3.0110	Proteína hipotética conservada
Lin148B12	2,38	1,2 ± 0,2	0,009	0	0	b	LinJ09_V3.1060	Proteína hipotética conservada
Lin149D5	2,45	1,3 ± 0,4	0,031	0	0	b	LinJ32_V3.2530	Proteína hipotética conservada
Lin158A9	2,54	1,3 ± 0,2	0,005	0	0	b	LinJ30_V3.2310	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2320	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.2330	Proteína hipotética conservada
Lin168H2	2,64	1,4 ± 0,2	0,008	0	0	b	LinJ06_V3.0050	Proteína hipotética conservada
Lin184C3	4,76	2,2 ± 0,5	0,015	0	0	b	LinJ34_V3.0310	Proteína hipotética conservada
Lin204D8	8,22	3,0 ± 0,9	0,026	0	0	a	LinJ33_V3.0650	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0660	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.0670	Proteína hipotética conservada
Lin208D12	4,10	2,0 ± 0,4	0,011	0	0	a	LinJ35_V3.3960	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.3970	Proteína hipotética conservada
Lin210D4	3,23	1,9 ± 0,1	0,002	0	7e-167	b	LinJ22_V3.0620	Proteína hipotética conservada
Lin229C7	5,00	2,3 ± 0,8	0,038	0	0	b	LinJ29_V3.0760	Proteína hipotética conservada
Lin233F4	3,52	1,8 ± 0,6	0,040	0	0	b	LinJ30_V3.3590	Proteína hipotética conservada
Lin282G9	7,32	2,9 ± 0,8	0,023	6e-44	3e-58	a	LinJ29_V3.1260	Proteína hipotética conservada
Lin284D11	6,90	2,8 ± 0,5	0,010	0	0	b	LinJ27_V3.0130	Proteína hipotética conservada
							LinJ27_V3.0140	Proteína hipotética conservada
Lin280D11	7,73	2,9 ± 0,2	0,002	0	0	a	LinJ23_V3.1370	Proteína hipotética conservada
							LinJ23_V3.1380	Proteína hipotética conservada

Tabla A33. Clones que contienen genes sobre-expresados en Pper/A no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin3A8	2,39	1,3 ± 0,3	0,020	0	0	c		
Lin10F7	3,67	1,9 ± 0,3	0,010	2e-34	4e-113	b		
Lin13G4	2,40	1,3 ± 0,4	0,038	0	0	c	LinJ29_V3.0990	Peptidasa señal aspártica, clan AD, familia A22B, putativa
Lin13H7	2,74	1,4 ± 0,5	0,035	0	0	b		
Lin16B12	5,86	2,5 ± 0,8	0,033	0	0	b	LinJ25_V3.1850	3-oxo-5-α-esteroide 4-deshidrogenasa
Lin16C6	3,13	1,6 ± 0,2	0,007	0	0	a	LinJ25_V3.1860	Proteína hipotética conservada
							LinJ20_V3.0020	Proteína hipotética conservada
							LinJ20_V3.0030	Proteína hipotética conservada
							LinJ20_V3.0040	Fosfatasa permeasa reprimible por fosfato
Lin16C12	24,97	4,6 ± 0,5	0,004	0	0	b	LinJ35_V3.3930	Proteína de tipo calmodulina con manos EF
							LinJ35_V3.3940	Proteína hipotética conservada
Lin21G5	7,61	2,9 ± 0,5	0,009	0	0	b		
Lin21H11	3,21	1,7 ± 0,6	0,035	0	-	c		
Lin29B8	3,14	1,6 ± 0,3	0,015	0	0	b		
Lin31E7	3,60	1,8 ± 0,6	0,037	-	0	c		
Lin34D8	2,35	1,2 ± 0,3	0,023	0	0	b		
Lin38A2	6,10	2,6 ± 0,4	0,008	0	0	a		
							0	0
Lin40H7	2,34	1,2 ± 0,1	0,002	0	0	a	LinJ26_V3.1620	Proteína ribosómica 40S S33, putativa
							LinJ26_V3.1630	Proteína ribosómica 40S S33, putativa
							LinJ26_V3.1640	Proteína hipotética conservada
							LinJ35_V3.1730	Ubiquitina hidrolasa, cisteína peptidasa, Clan CA, familia C19, putativa
							LinJ35_V3.1740	Proteína <i>roadblock</i> asociada a dineína
Lin41C12	2,95	1,6 ± 0,5	0,028	0	0	c	LinJ26_V3.2300	Proteína hipotética conservada
Lin43B11	2,74	1,4 ± 0,3	0,013	1e-11	3e-61	a		
Lin43F7	4,91	2,3 ± 0,7	0,032	0	0	b		
Lin45A3	3,65	1,9 ± 0,4	0,015	0	0	a	LinJ25_V3.0080	Proteína de unión a poli (A), putativa
Lin49A7	2,10	1,1 ± 0,3	0,034	0	0	a	LinJ25_V3.0090	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.6360	Proteína hipotética conservada
Lin49B2	3,609	1,8 ± 0,5	0,020	0	0	b	LinJ36_V3.6370	Centrina, putativa
							LinJ01_V3.0290	Proteína hipotética conservada
Lin49B6	2,14	1,1 ± 0,2	0,007	0	0	a	LinJ01_V3.0300	Proteína hipotética conservada
							LinJ01_V3.0310	Exopolifosfatasa del acantosoma, putativa
							LinJ06_V3.1310	Proteína hipotética conservada
							LinJ06_V3.1320	Transportador de pteridina, putativo
Lin51A1	3,37	1,7 ± 0,7	0,047	9e-111	0	c		
Lin51G7	3,85	1,9 ± 0,2	0,003	0	0	b	LinJ19_V3.1490	Proteína de tipo oxidorreductasa
							LinJ19_V3.1500	Proteína hipotética conservada
Lin54C2	7,13	2,8 ± 0,5	0,010	0	0	a	LinJ24_V3.2410	Proteína quinasa activada por mitógeno
							LinJ24_V3.2420	Proteína hipotética conservada
							LinJ24_V3.2430	Proteína hipotética conservada
							LinJ10_V3.0930	Proteína hipotética conservada
Lin56B3	3,76	1,9 ± 0,7	0,041	0	0	c	LinJ35_V3.7280	Proteína disulfuro isomerasa
							LinJ22_V3.1370	Proteína hipotética, función desconocida
Lin58C1	2,12	1,1 ± 0,2	0,013	2e-90	3e-90	b	LinJ22_V3.1380	Proteína ribosómica 60S L14, putativa
Lin58H2	3,67	1,9 ± 0,4	0,017	0	5e-106	b		
Lin60H10	4,41	2,1 ± 0,2	0,003	0	0	a	LinJ23_V3.0630	Proteína de tipo oxidorreductasa
Lin65E7	2,26	1,2 ± 0,4	0,026	3e-104	-	c		
Lin70D9	3,85	1,9 ± 0,6	0,030	0	0	b		
Lin74D2	3,09	1,6 ± 0,4	0,017	3e-36	1e-35	a		
Lin75B1	7,37	2,9 ± 0,5	0,010	0	0	a		
Lin76A8	7,16	2,8 ± 0,7	0,023	4e-11	0	a		
Lin76G12	9,94	3,3 ± 0,6	0,012	0	0	a		
Lin77D4	9,49	3,2 ± 0,7	0,022	0	0	a		
Lin77F8	3,52	1,8 ± 0,5	0,022	3e-111	-	c		
Lin80C7	5,10	2,3 ± 0,7	0,028	0	0	a		
Lin81H1	3,74	1,9 ± 0,7	0,042	7e-173	0	b		
Lin82D10	4,25	2,1 ± 0,5	0,019	0	0	a	LinJ23_V3.0040	Proteína todo β toroidal (<i>Beta propeller</i>)
							LinJ23_V3.0050	Peroxidoxina/Triparredoxina peroxidasa
							LinJ23_V3.0060	Ciclofilina (peptidil-prolil cis-trans isomerasa)
Lin86D3	12,03	3,6 ± 0,7	0,014	0	0	b		
Lin89D8	2,87	1,5 ± 0,4	0,023	0	0	a	LinJ36_V3.3230	Lipoato proteína ligasa, putativa
Lin89F11	3,05	1,6 ± 0,3	0,010	-	4e-165	c	LinJ36_V3.3240	Proteína hipotética conservada
Lin93D6	5,50	2,4 ± 0,3	0,005	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido δ-4 desaturasa, putativa
							LinJ26_V3.1680	Esfingolípido δ-4 desaturasa, putativa
							LinJ26_V3.1690	Citocromo b5 reductasa, putativa
Lin93D7	8,62	3,1 ± 0,7	0,015	-	0	c		
Lin95A12	3,31	1,7 ± 0,3	0,005	0	0	b		
Lin96B10	3,91	2,0 ± 0,1	0,001	0	0	c		
Lin96B8	4,21	2,1 ± 0,8	0,046	0	0	a	LinJ31_V3.3310	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ31_V3.3320	Histona H4
Lin99G6	4,02	2,0 ± 0,5	0,002	4e-156	9e-80	b	LinJ36_V3.1720	Proteína de unión a la secuencia universal de los minicírculos (UMSBP), putativa
Lin100F12	2,84	1,5 ± 0,4	0,028	0	0	a	LinJ36_V3.1730	Subunidad β 5 del proteasoma, putativa
							LinJ30_V3.3030	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.3040	Lsm5p, putativa
Lin104C3	4,45	2,1 ± 0,4	0,014	4e-57	0	b	LinJ30_V3.3050	Proteína hipotética conservada
							LinJ32_V3.3100	Nucleósido difosfato quinasa b
							LinJ32_V3.3110	Nucleósido difosfato quinasa b
							LinJ32_V3.3120	Subunidad del complejo de mantenimiento de minicírculos (mmc)
Lin105H8	3,92	2,0 ± 0,6	0,026	0	0	b	LinJ36_V3.3750	Cisteína sintasa, putativa
							LinJ36_V3.3760	Proteína hipotética conservada
Lin106H3	2,23	1,2 ± 0,3	0,022	0	0	b	LinJ30_V3.3030	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.3040	Lsm5p, putativa
Lin106H5	2,39	1,3 ± 0,2	0,009	0	0	b		
Lin108H7	4,18	2,1 ± 0,1	0,001	0	0	c		
Lin113B9	2,72	1,4 ± 0,6	0,048	0	0	a	LinJ36_V3.0550	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.0560	Proteína fosfatasa 2C, putativa
							LinJ36_V3.0570	Ribonucleoproteína pequeña nuclear, putativa
Lin120G3	5,04	2,3 ± 0,2	0,002	3e-104	2e-173	b	LinJ26_V3.0020	Proteína con dominio <i>brix</i>
							LinJ26_V3.0030	Metilmalonil-CoA epimerasa

Expresión génica diferencial en *Leishmania infantum*

Continuación Tabla A33

Lin122H12	5,11	2,3 ± 0,5	0,016	0	0	b		
Lin123F5	2,17	1,1 ± 0,1	0,001	0	1e-159	c	LinJ18_V3.1290	Proteína hipotética conservada
Lin123F7	3,78	1,9 ± 0,4	0,018	0	0	b		
Lin127H6	3,10	1,6 ± 0,6	0,043	0	0	b	LinJ05_V3.0450	Proteína hipotética conservada
							LinJ05_V3.0460	GTPasa, putativa
Lin128B11	3,06	1,6 ± 0,6	0,049	0	0	a	LinJ18_V3.1050	5-oxoprolinasa, putativa
							LinJ18_V3.1060	Proteína hipotética conservada
Lin129C7	8,24	3,0 ± 0,6	0,013	3e-18	1e-17	b		
Lin129D7	4,19	2,1 ± 0,6	0,024	0	0	b	LinJ36_V3.4870	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.4880	Proteína ribosómica 60S ácida, putativa
							LinJ36_V3.4890	Proteína hipotética conservada
Lin130B7	3,44	1,8 ± 0,3	0,009	0	0	a	LinJ23_V3.0630	Proteína de tipo oxidorreductasa
							LinJ23_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin130C5	2,52	1,3 ± 0,5	0,040	3e-178	0	b	LinJ36_V3.3170	Exonucleasa del exosoma RRP41, putativa
							LinJ36_V3.3180	Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina
							LinJ36_V3.3190	Proteína p14 del sitio de ramificación del pre-ARNm, putativa
							LinJ36_V3.3200	Proteína hipotética conservada
Lin131B1	8,64	3,1 ± 0,4	0,005	0	4e-159	b		
Lin131B10				5e-106	2e-111	b		
Lin132B12	4,01	2,0 ± 0,5	0,023	0	0	c	LinJ06_V3.0810	Proteína hipotética, función desconocida
Lin134E11	2,55	1,3 ± 0,4	0,033	0	0	a	LinJ23_V3.0060	Ciclofilina (peptidil-prolil cis-trans isomerasa)
							LinJ23_V3.0070	Proteína hipotética conservada
Lin135B3	4,74	2,2 ± 0,8	0,038	0	0	a	LinJ30_V3.0750	Proteína hipotética conservada
							LinJ30_V3.0760	Co-chaperona GrpE, putativa
							LinJ30_V3.0760	-
Lin136G4	2,66	1,4 ± 0,6	0,049	0	0	b	LinJ22_V3.1360	Proteína hipotética conservada
							LinJ22_V3.1370	Proteína ribosómica 60S L14, putativa
Lin138C1	6,11	2,6 ± 0,2	0,001	0	0	a	LinJ24_V3.1370	Proteína hipotética conservada
							LinJ24_V3.1380	Proteína hipotética conservada
							LinJ24_V3.1390	Factor de iniciación traduccional IF-2, putativo
Lin139A5	7,01	2,8 ± 0,8	0,026	0	0	b	LinJ11_V3.0570	Proteína hipotética conservada
							LinJ11_V3.0580	Proteína con dominio de repetición del tetrapéptido
Lin142C8	5,97	2,6 ± 0,2	0,003	0	0	a	LinJ21_V3.0790	Proteína hipotética conservada
							LinJ21_V3.0800	Proteína ribosómica 60S L36, putativa
							LinJ21_V3.0810	Proteína hipotética conservada
							LinJ21_V3.0820	Subunidad 9 de ATPasa, putativa
Lin142D3	3,27	1,7 ± 0,5	0,025	0	0	a	LinJ22_V3.0620	Proteína hipotética conservada
Lin146A12	2,67	1,4 ± 0,4	0,032	0	0	b	LinJ30_V3.0690	Proteína ribosómica 40S S30, putativa
							LinJ30_V3.0700	Proteína ribosómica 40S S30, putativa
							LinJ30_V3.0710	Proteína ribosómica 40S S30, putativa
							LinJ30_V3.0720	Proteína de movimiento nuclear de tipo NUDC
							LinJ30_V3.0730	Proteína hipotética conservada
Lin159G8	3,47	1,8 ± 0,0	0,039	0	2e-136	c	LinJ35_V3.5220	Glicosil transferasa, putativa
Lin157F10	2,83	1,5 ± 0,2	0,009	0	0	b	LinJ31_V3.2350	Factor de ribosilación de ADP, putativo
							LinJ31_V3.2360	Proteína de tipo fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
Lin161G4	5,36	2,4 ± 0,4	0,021	2e-154	-	c		
Lin162D7	6,68	2,3 ± 1,0	0,039	0	0	a		
Lin163E9	2,08	1,0 ± 0,4	0,046	0	1e-171	b	LinJ27_V3.1110	Proteína hipotética conservada
							LinJ27_V3.1120	Histona H1, putativa
Lin166H10	2,08	1,1 ± 0,2	0,014	0	0	b	LinJ26_V3.1670	Esfingolípido δ -4 desaturasa
							LinJ26_V3.1680	Esfingolípido δ -4 desaturasa
							LinJ26_V3.1690	Citocromo b5 reductasa, putativa
Lin168B2	2,78	1,5 ± 0,6	0,045	0	0	b		
Lin168F11	2,71	1,4 ± 0,3	0,018	0	-	c		
Lin169A11	4,37	2,1 ± 0,5	0,020	0	0	a	LinJ23_V3.0630	
							LinJ23_V3.0640	Proteína de tipo oxidorreductasa, putativa
Lin169B2	2,00	1,0 ± 0,2	0,009	7e-59	7e-59	b		Proteína hipotética conservada
Lin170A2	4,52	2,2 ± 0,3	0,007	0	0	b		
Lin170B2	3,72	1,9 ± 0,6	0,029	0	0	a	LinJ31_V3.3270	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.3280	Proteína asociada a la dineína, putativa
							LinJ31_V3.3290	Proteína hipotética conservada
Lin172B9	4,42	2,1 ± 0,4	0,009	0	0	b	LinJ26_V3.1680	Esfingolípido d-4 desaturasa
							LinJ26_V3.1690	Citocromo b5 reductasa, putativa
Lin172B9	4,42	2,1 ± 0,4	0,009	0	1e-11	b	LinJ24_V3.2320	Proteína hipotética con múltiples dominios transmembrana
							LinJ24_V3.2340	Proteína hipotética conservada
Lin172E11	9,39	3,2 ± 0,3	0,002	7e-84	1e-94	a		
Lin173A1	2,23	1,1 ± 0,4	0,031	0	0	b		
Lin173B9	2,15	1,1 ± 0,4	0,038	0	0	c	LinJ15_V3.1410	Proteína relacionada con actina arp3, putativa
							LinJ36_V3.4260	Proteína hipotética conservada
Lin182H3	3,15	1,6 ± 0,3	0,011	0	0	a	LinJ36_V3.3180	Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina
							LinJ36_V3.3190	Proteína p14 del sitio de ramificación del pre-ARNm, putativa
							LinJ36_V3.3200	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.3210	Proteína de tipo culina
Lin188A5	3,52	1,8 ± 0,7	0,045	0	0	b		
Lin193F5	4,73	2,2 ± 0,4	0,010	0	0	b	LinJ36_V3.2070	Fosfomanomutasa, putativa
							LinJ36_V3.2080	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.2090	Serina/treonina proteína fosfatasa 2b, subunidad catalítica A2, putativa
Lin197D10	4,898	2,3 ± 0,3	0,005	0	3e-175	b	LinJ19_V3.0200	ADP/ATP translocasa 1, putativa
							LinJ19_V3.0210	Poliprenil sintasa, putativa
							LinJ36_V3.7080	Adaptina β , putativa
Lin200B11	2,35	1,2 ± 0,4	0,033	-	0	c		
Lin200D7	3,62	1,8 ± 0,4	0,014	-	0	c		
Lin202F9	3,49	1,8 ± 0,4	0,018	0	7e-167	b	LinJ31_V3.0570	Proteína hipotética conservada
							LinJ31_V3.0580	Mevalonato quinasa, putativa
Lin203H3	5,93	2,6 ± 0,7	0,026	0	0	a		
Lin210D4	2,99	1,6 ± 0,1	0,001	0	0	a		
Lin218B2	5,56	2,5 ± 0,1	0,000	3e-15	4e-14	a		
Lin219G10	4,18	2,1 ± 0,5	0,023	0	0	b		
Lin223B1	6,32	2,7 ± 0,4	0,006	1e-116	-	c		
Lin225B11	5,98	2,6 ± 0,3	0,006	0	0	a	LinJ24_V3.1340	Proteína hipotética conservada
							LinJ24_V3.1350	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
							LinJ24_V3.1360	Proteína hipotética conservada
							LinJ24_V3.1370	Proteína hipotética conservada
							LinJ24_V3.1380	Factor de iniciación traduccional IF2, putativo
Lin228D4	4,90	2,3 ± 0,5	0,017	0	0	a	LinJ19_V3.0080	Proteína hipotética conservada
							LinJ19_V3.0090	Fibrilarina, putativa
Lin229B11	2,09	1,1 ± 0,2	0,010	0	0	a	LinJ36_V3.6510	Proteína G pequeña, putativa
							LinJ36_V3.6520	Carboxipeptidasa, Clan MA(E), familia M32, putativa

Continuación Tabla A33

Lin229E11	3,07	1,6 ± 0,6	0,038	0	0	b		
Lin232H7	2,82	1,5 ± 0,3	0,011	0	0	b	LinJ36_V3.4870	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.4880	Proteína ribosómica ácida, putativa
Lin248D1	3,68	1,9 ± 0,7	0,045	6e-152	0	b	LinJ31_V3.2310	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ31_V3.2320	3,2-trans-enoil-CoA isomerasa, precursor mitocondrial putativo
Lin262A6	4,01	2,0 ± 0,4	0,012	0	0	b		
Lin267B9	3,19	1,7 ± 0,4	0,024	0	0	b	LinJ36_V3.0580	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.0590	Proteína de tipo ubiquitina
							LinJ36_V3.0600	Proteína quinasa relacionada con cdc2
Lin271C9	4,00	2,0 ± 0,7	0,041	0	0	c	LinJ24_V3.0010	Piruvato deshidrogenasa (lipoamida) quinasa, putativa
Lin274F11	3,88	1,9 ± 0,7	0,044	0	0	a		
Lin274G12	4,3	2,1 ± 0,8	0,044	0	0	a	LinJ23_V3.0040	Proteína todo β toroidal (<i>Beta propeller</i>)
							LinJ23_V3.0050	Peroxidoxina/Triparredoxina peroxidasa
							LinJ23_V3.0060	Ciclofilina (peptidil-prolil cis-trans isomerasa)
Lin276E12	2,04	1,5 ± 0,4	0,024	0	0	b	LinJ36_V3.0550	Proteína hipotética conservada
							LinJ36_V3.0560	Proteína fosfatasa 2C
							LinJ36_V3.0570	Ribonucleoproteína pequeña nuclear, putativa
							LinJ36_V3.0580	Proteína hipotética conservada
Lin277D10	13,18	3,7 ± 0,2	0,001	0	0	b		
Lin280D11	7,73	2,9 ± 0,2	0,002	0	0	b	LinJ25_V3.2260	Proteína hipotética conservada
								Proteína hipotética conservada
								Proteína de clasificación vacuolar
Lin287A5	2,08	1,1 ± 0,3	0,032	0	0	b	LinJ33_V3.1900	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.1910	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.1920	Proteína hipotética conservada
							LinJ33_V3.1930	Proteína quinasa de especificidad dual, putativa
Lin288H7	2,86	1,5 ± 0,3	0,012	0	0	b	LinJ34_V3.2610	Proteína de tipo calcineurina/serina-treonina proteína fosfatasa
							LinJ34_V3.2620	Proteína ribosómica 40S S19, putativa
Lin290F2	3,52	1,8 ± 0,3	0,012	0	0	b		
Lin292H10	2,15	1,1 ± 0,3	0,025	0	0	a	LinJ08_V3.0040	Proteína hipotética conservada
							LinJ08_V3.0050	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ08_V3.0060	Fosfoglicerato mutasa, putativa
Lin294F5	17,06	4,1 ± 0,7	0,009	0	0	b		
Lin299F5	2,4	1,3 ± 0,5	0,042	0	0	b	LinJ09_V3.0870	Proteína hipotética conservada
							LinJ09_V3.0880	Proteína de tipo helicasa DEAD/DEAH
							LinJ09_V3.0890	Proteína hipotética conservada
Lin309H8	5,10	2,3 ± 0,0	0,002	0	0	b		

Tabla A34. Genes de proteínas hipotéticas y desconocidas sub-expresados en Pper/A.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin31F6	-2,10	-1,1 ± 0,2	0,019	9e-74	3e-141	b	LinJ35_V3.0180	Proteína hipotética conservada
Lin36C2	-2,19	-1,2 ± 0,4	0,029	0	0	b	LinJ33_V3.2470	Proteína hipotética conservada
Lin47A4	-2,03	-1,0 ± 0,3	0,033	0	0	a	LinJ24_V3.1430	Proteína hipotética conservada
Lin79B10	-2,55	-1,3 ± 0,3	0,021	0	0	b	LinJ35_V3.2580	Proteína hipotética, función desconocida
Lin90H3	-2,24	-1,2 ± 0,5	0,049	0	0	a	LinJ19_V3.1540	Proteína hipotética conservada
Lin94E7	-2,18	-1,1 ± 0,3	0,030	0	0	b	LinJ16_V3.1070	Proteína hipotética conservada
Lin99E11	-2,35	-1,2 ± 0,5	0,043	0	0	a	LinJ30_V3.3250	Proteína hipotética conservada
Lin100H12	-2,00	-1,0 ± 0,3	0,029	0	0	a	LinJ23_V3.1880	Proteína hipotética conservada
							LinJ23_V3.1890	Proteína hipotética, función desconocida
Lin104C12	-2,33	-1,2 ± 0,0	0,045	0	0	b	LinJ18_V3.0390	Proteína hipotética conservada
Lin111G5	-2,63	-1,4 ± 0,5	0,036	6e-140	0	b	LinJ12_V3.0090	Proteína hipotética conservada
Lin120D4	-2,26	-1,2 ± 0,2	0,014	0	0	b	LinJ36_V3.2960	Proteína hipotética conservada
Lin121G9	-2,22	-1,1 ± 0,2	0,013	0	0	a	LinJ28_V3.0510	Proteína hipotética, función desconocida
							LinJ28_V3.0520	Proteína hipotética conservada
Lin125A5	-2,17	-1,1 ± 0,3	0,030	0	0	b	LinJ32_V3.2410	Proteína hipotética conservada
Lin142F8	-2,38	-1,2 ± 0,2	0,018	0	0	a	LinJ29_V3.2340	Proteína hipotética conservada
Lin148E3	-2,26	-1,2 ± 0,3	0,003	0	3e-92	a	LinJ11_V3.0920	Proteína hipotética conservada
Lin165B10	-2,94	1,6 ± 0,5	0,034	0	0	a	LinJ30_V3.1620	Proteína hipotética conservada
Lin171B2	-3,72	-1,9 ± 0,7	0,045	2e-176	0	b	LinJ24_V3.0560	Proteína hipotética conservada
Lin181H11	-4,21	-2,1 ± 0,8	0,047	0	0	a	LinJ18_V3.0720	Proteína hipotética conservada
Lin206E8	-2,84	-1,5 ± 0,4	0,024	0	0	b	LinJ36_V3.0900	Proteína hipotética conservada
Lin206H3	-2,53	-1,3 ± 0,1	0,004	0	0	b	LinJ10_V3.1370	Proteína hipotética conservada
Lin209A6	-2,39	-1,2 ± 0,3	0,023	0	0	b	LinJ22_V3.1070	Proteína hipotética conservada
Lin210F2	-2,67	-1,4 ± 0,3	0,021	0	0	b	LinJ32_V3.1100	Proteína hipotética conservada
Lin224H11	-2,22	-1,1 ± 0,4	0,045	0	0	a	LinJ16_V3.1620	Proteína hipotética conservada

Tabla A35. Clones que contienen genes sub-expresados en Pper/A no determinados.

Clon	F	Log ₂ R ± S	p	Valor e		Def.	Anotación	Función génica anotada
				Fw	Rv			
Lin13H10	-2,04	-1,0 ± 0,4	0,020	0	0	b		
Lin16H12	-2,65	-1,4 ± 0,2	0,006	-	0	c	LinJ22_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin32C8	-2,11	-1,1 ± 0,3	0,027	8e-59	7e-59	b		
Lin34G5	-3,72	-1,9 ± 0,1	0,002	0	0	b		
Lin37B11	-2,53	-1,3 ± 0,5	0,044	2e-28	2e-25	b		
Lin38G10	-2,66	-1,4 ± 0,3	0,014	7e-59	7e-59	b		
Lin43B1	-2,95	-1,6 ± 0,3	0,013	5e-60	0	b		
Lin44F5	-3,19	-1,7 ± 0,4	0,016	3e-135	-	c		
Lin47F2	-2,12	-1,1 ± 0,4	0,040	7e-59	7e-59	b		
Lin50H6	-3,88	-1,9 ± 0,4	0,011	0	0	b	LinJ18_V3.0480 LinJ18_V3.0490	Uracil-ADN glicosilasa, putativa Proteína hipotética conservada
Lin51B4	-2,35	-1,2 ± 0,2	0,013	2e-56	2e-56	b		
Lin54B4	-5,22	-2,4 ± 0,8	0,032	5e-177	0	b		
Lin54C8	-2,17	-1,1 ± 0,4	0,045	0	4e-116	b		
Lin55G12	-2,09	-1,1 ± 0,4	0,049	0	0	a		
Lin63A6	-3,10	-1,6 ± 0,5	0,032	0	0	b		
Lin65B12	-2,39	-1,3 ± 0,3	0,021	0	0	b		
Lin74B12	-2,20	-1,1 ± 0,4	0,043	7e-59	7e-59	b		
Lin81C8	-3,78	-1,9 ± 0,8	0,049	7e-59	7e-59	b		
Lin89B4	-2,12	-1,1 ± 0,4	0,039	7e-59	7e-59	b		
Lin90G10	-3,11	-1,6 ± 0,4	0,021	3e-107	1e-159	c		
Lin91D8	-2,38	-1,2 ± 0,4	0,032	7e-59	7e-59	b		
Lin95D8	-3,93	-1,97 ± 0,6	0,028	0	1e-14	b		
Lin96F4	-2,44	-1,3 ± 0,3	0,018	0	0	b	LinJ26_V3.0370 LinJ26_V3.0380	Proteína hipotética conservada Uridilil transferasa 3' terminal/RET2
Lin98G4	-2,96	-1,6 ± 0,6	0,041	0	7e-133	b		
Lin99A11	-3,19	-1,7 ± 0,4	0,020	0	3e-107	c	LinJ20_V3.1610	Proteína de tipo fosfatasa
Lin99E11				0	0	a	LinJ32_V3.2840 LinJ32_V3.2850 LinJ32_V3.2860 LinJ30_V3.1870 LinJ30_V3.1880	Proteína hipotética conservada Proteína ribosómica 60S L17 Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada
Lin101E5	-2,71	-1,4 ± 0,5	0,046	0	0	c	LinJ24_V3.1110	Proteína hipotética con múltiples dominios transmembrana
Lin101F3	-2,05	-1,0 ± 0,3	0,022	2e-148	0	c		
Lin104E4	-3,00	-1,6 ± 0,3	0,015	0	0	b		
Lin107B10	-2,22	-1,1 ± 0,3	0,003	0	0	b	LinJ06_V3.1110 LinJ06_V3.1120	Desoxirribosa fosfato aldolasa, putativa Proteína hipotética, función desconocida
Lin109D10	-3,06	1,6 ± 0,6	0,044	0	0	b		
Lin119B9	-2,81	-1,5 ± 0,3	0,010	0	0	a		
Lin128F5	-8,08	-3,0 ± 0,6	0,012	0	0	b		
Lin129F11	-2,06	-1,0 ± 0,4	0,049	-	0	c	LinJ22_V3.0640	Proteína hipotética conservada
Lin141H4	-2,19	-1,1 ± 0,1	0,006	6e-81	9e-84	a		
Lin156F2	-2,88	-1,5 ± 0,5	0,035	0	0	b		
Lin158B8	-4,20	-2,1 ± 0,4	0,015	0	0	b		
Lin166F4	-2,38	-1,2 ± 0,4	0,036	7e-59	7e-59	b		
Lin166H5	-2,32	-1,2 ± 0,5	0,047	7e-59	7e-59	b		
Lin183B3	-4,15	-2,0 ± 0,8	0,049	7e-22	7e-22	b		
Lin185F7	-2,88	-1,5 ± 0,6	0,044	7e-59	7e-59	b		
Lin189F2	-2,97	-1,6 ± 0,4	0,018	0	0	b		
Lin202H8	-2,92	-1,5 ± 0,6	0,046	5e-140	-	c		
Lin204A5	-2,31	-1,2 ± 0,4	0,006	0	0	b	LinJ31_V3.2340 LinJ31_V3.2350	Proteína hipotética conservada Factor de ribosilación de ADP
Lin206H4	-3,13	-1,6 ± 0,3	0,014	0	0	b		
Lin208E10	-3,10	-1,6 ± 0,1	0,001	0	0	a		
Lin250H8	-2,90	-1,5 ± 0,6	0,043	7 e-59	7 e-59	b		
Lin256A6	-6,31	-2,7 ± 0,4	0,008	2e-87	1e-88	a		
Lin266B7	-2,52	-1,3 ± 0,3	0,015	-	1e-143	c	LinJ35_V3.3120	Proteína hipotética conservada
Lin269C11	-4,47	-2,2 ± 0,3	0,015	3e-129	0	a	LinJ13_V3.1450 LinJ13_V3.1460	Tubulina α -
Lin278B6	-3,28	-1,7 ± 0,4	0,022	7e-22	7e-22	b		

ANEXO V

Frecuencias absolutas y relativas de sobre-expresión y sub-expresión en amastigotes.

La variable aleatoria “expresión diferencial” sigue una distribución binomial con parámetros np y npq . En el caso de que $n \geq 30$, $np \geq 10$ y $nq \geq 10$, se aproxima la distribución binomial a una normal N con parámetros np (media) y $(npq)^2$ (varianza).

Tabla A36. Revisión de las frecuencias relativas de sub-expresión (p) y sobre-expresión (q) en amastigotes.
*Aproximación de la distribución binomial a la normal.

Origen de los datos	n	p	q	np	nq	*Aprox.
(Akopyants y col., 2004)	122	0,426	0,574	52,0	70,0	Sí
(Almeida y col., 2004)	132	0,561	0,439	74,0	58,0	Sí
(Leifso y col., 2007)	155	0,439	0,561	68,0	87,0	Sí
(Holzer y col., 2006)	236	0,881	0,119	207,9	28,1	Sí
	51	0,725	0,275	37,0	14,0	Sí
(Srividya y col., 2007)	25	0,400	0,600	10,0	15,0	No
(Rosenzweig y col., 2008b)	494	0,650	0,350	321,1	173,0	Sí
(McNicoll y col., 2006)	73	0,274	0,826	20,0	60,3	Sí
(Leifso y col., 2007)	55	0,855	0,145	47,0	8,0	No
(Rochette y col., 2009)	477	0,545	0,455	260,0	217,0	Sí
	921	0,519	0,481	478,0	443,0	Sí
Sección 4.5.	180	0,555	0,445	99,9	80,1	Sí
Sección 4.3.	345	0,696	0,304	240,0	105,0	Sí
(Depledge y col., 2009)	55	0,873	0,127	48,0	7,0	No

ANEXO VI

Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en promastigotes logarítmicos y estacionarios de *L. infantum* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

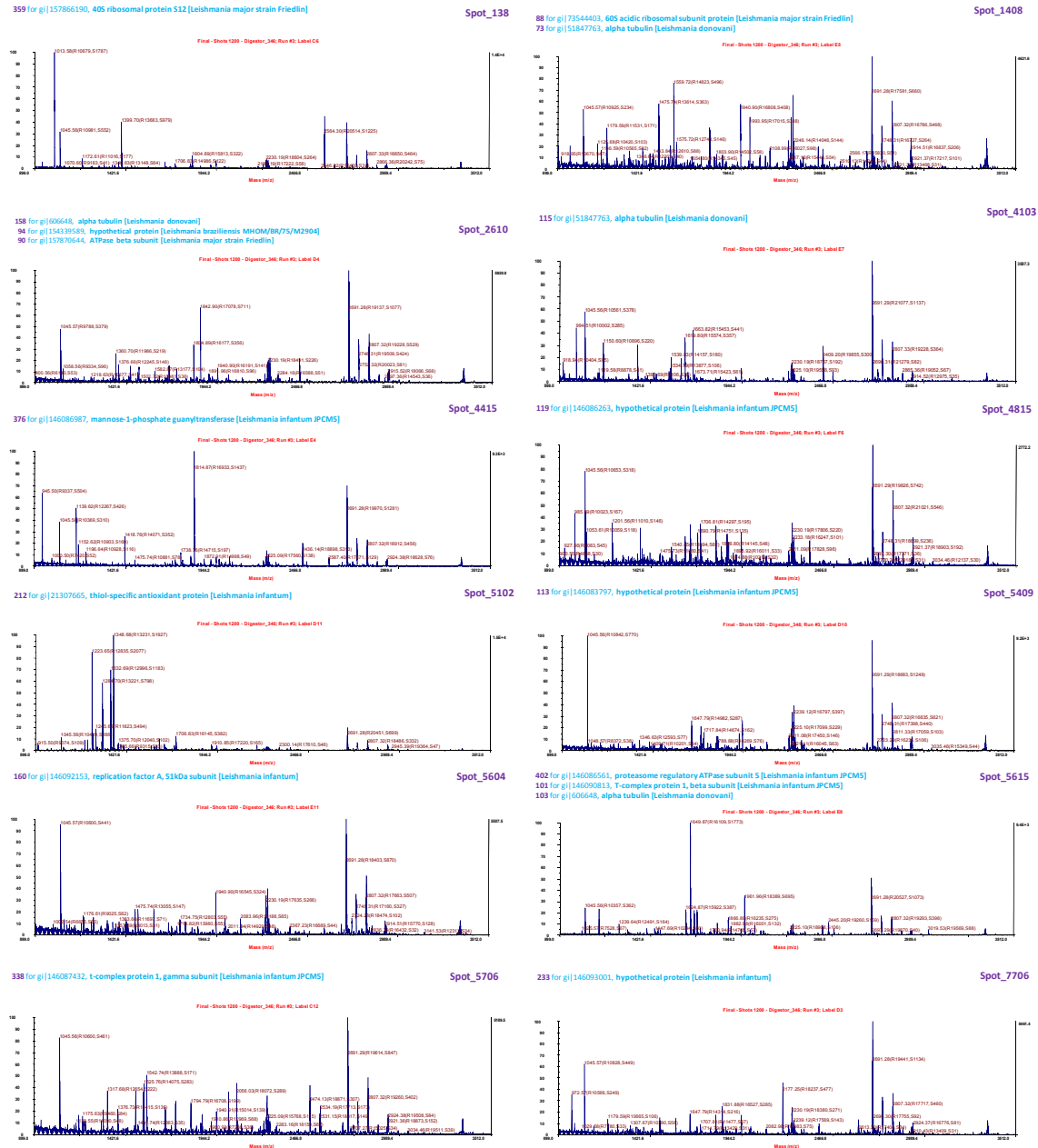


Figura A9. Huella peptídica de las proteínas sobre-expresadas en promastigotes en fase logarítmica.

Anexo VI

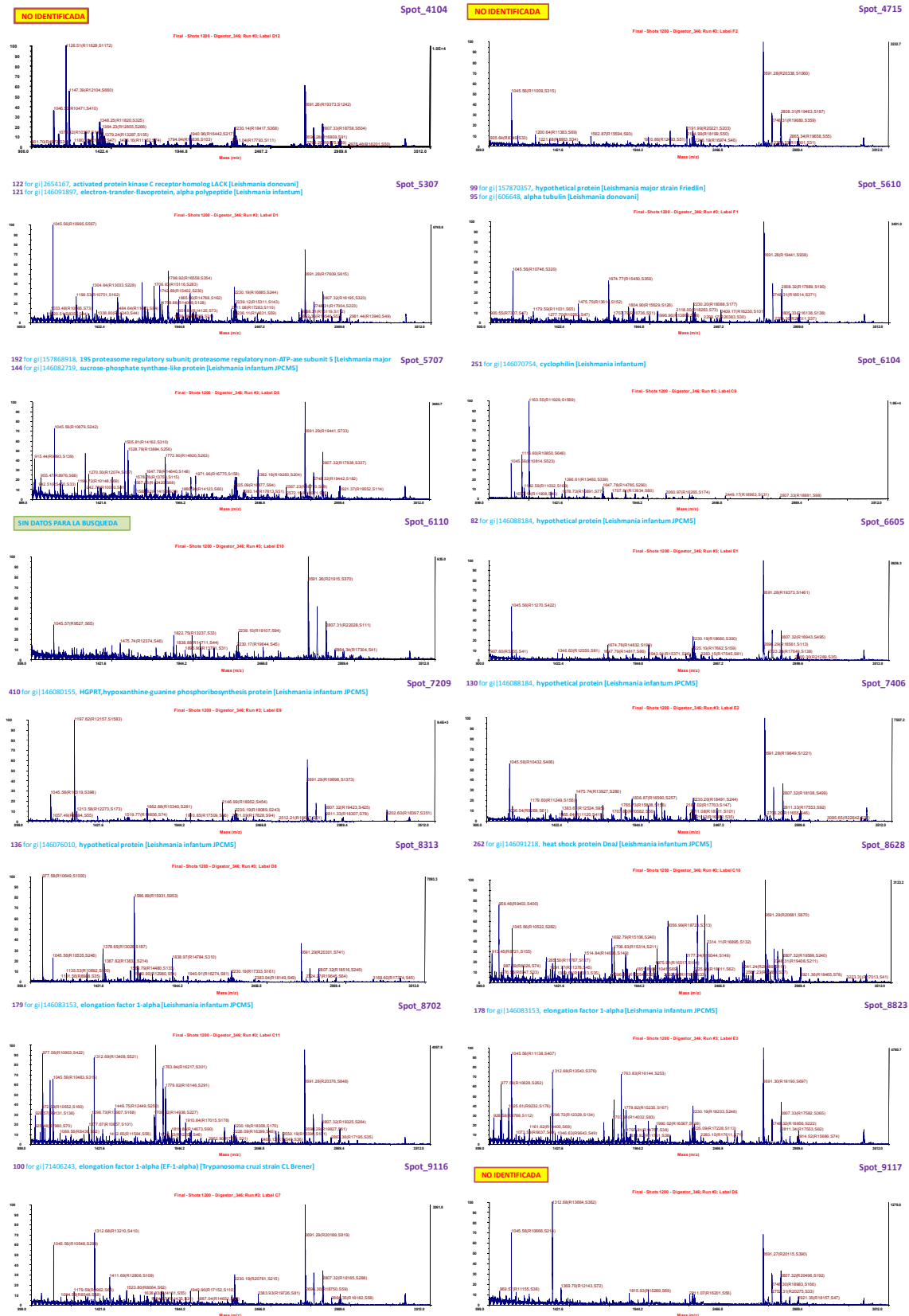


Figura A10. Huella peptídica de las proteínas sobre-expresadas en promastigotes en fase estacionaria.

ANEXO VII

Análisis de las secuencias de los minicírculos.

Según el análisis de expresión génica diferencial de los promastigotes PNA⁺ y PNA⁻ mediante hibridación con *microarrays*, doce clones (Tabla A13) cuyos insertos corresponden a las secuencias completas de algunos minicírculos están sobre-expresados en promastigotes PNA⁻, según los criterios de expresión génica diferencial (F, intensidad mínima de fluorescencia y valor p en el test de la t) detallados en la sección 4.4.1. También se han encontrado sobre-expresadas algunas de estas secuencias en el análisis de la expresión diferencial de los estadios fundamentales del ciclo biológico (Tabla A8) y con el efecto de $\Delta T\Delta pH$ y ΔpH (Tablas A20 y A21). Las secuencias de estos clones no fueron localizadas en la secuencia del genoma de *L. infantum* según los alineamientos realizados con *GBrowse*. Por lo tanto, se utilizó *BLAST* para buscar secuencias idénticas o similares a las de los doce minicírculos clonados y, como resultado, se encontraron cinco secuencias de minicírculos diferentes. Se obtuvieron las secuencias consenso con *CLUSTAL* y se observó que carecían de sitios de corte para *Sau3AI*, exceptuando la posición por la que los minicírculos fueron clonados.

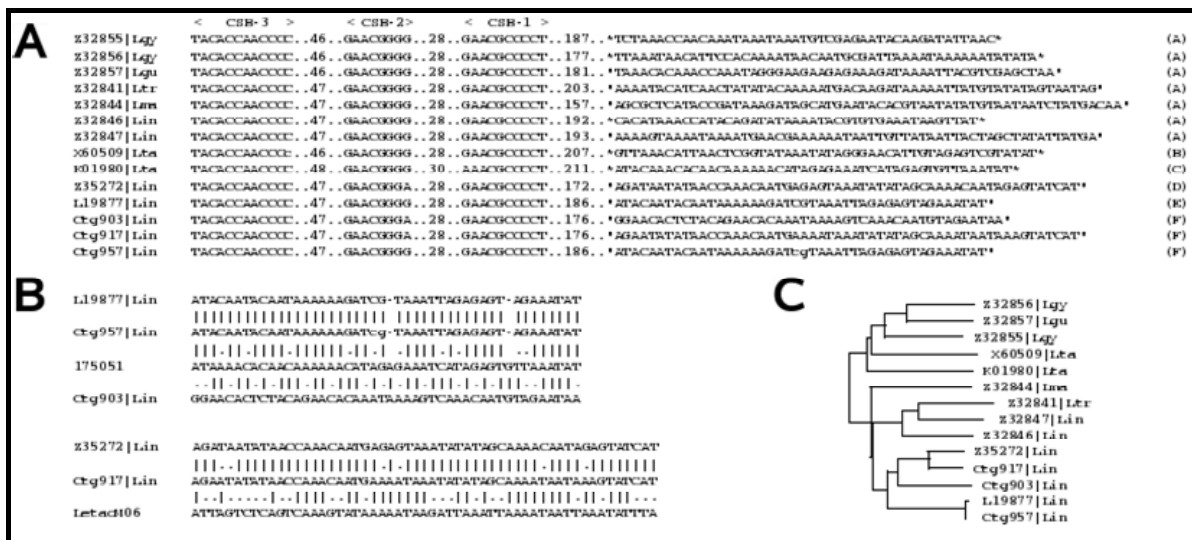


Figura A10. Alineamiento de los contigs 903, 917 y 957 con secuencias conocidas de minicírculos. (A) Se puede apreciar la estructura conservada de los minicírculos entre *L. infantum* (Lin) y *L. major* (Lma) y las especies de sauroleishmanias *L. tarentolae* (Lta), *L. gymnodactili* (Lgy) y *L. guliki* (Lgu), con una perfecta coincidencia dentro de las secuencias CSB-1 (origen de replicación del minicírculo), CSB-2 y CSB-3 y con una distancia similar entre secuencias CSB y entre CSB-1 y el gen ARNg. (B) Alineamiento de la secuencia del minicírculo L19877 (*GenBank*) de *L. infantum* y los contigs 957 y 903; alineamiento de la secuencia del minicírculo z35272 (*GenBank*) de *L. infantum*, el LetacM06 de *L. tarentolae* y el contig 917.

El contig 957 (786 pb) es idéntico en un 99,86% al minicírculo L19877 de *L. infantum*, de 785 pb, que fue clonado previamente como un fragmento lineal *EcoRI* (Tripp y col., 1993). Por lo tanto, esta

Anexo VII

secuencia representa un minicírculo completo. Las secuencias de los contigs 820, 873, 903 y 917 (Figuras A10 y A11) tienen un tamaño comprendido entre 708 y 801 pb. Debido a su tamaño homogéneo y a la homología en las secuencias conservadas, estas secuencias que contienen al menos un gen diferencialmente expresado corresponden probablemente a minicírculos clonados completamente. A continuación, se procedió a alinear las cinco secuencias conservadas de los insertos con una colección de 15 secuencias de minicírculos con el programa informático *Needle* del paquete *EMBOSS*. En algunas de estas secuencias de minicírculos está determinada la posición del gen ARNg. En los doce insertos se identificaron las secuencias conservadas CSB y los alineamientos de los minicírculos previamente caracterizados indicaron que la posición del gen ARNg se encuentra a unos 150 pb *downstream* de los bloques CSB (Figuras A10 A y B); sin embargo, no se encontró un patrón conservado de los elementos reguladores, a diferencia de lo descrito en otras especies de *Leishmania* y en *T. brucei* (Sturm y Simpson, 1991; Fu y Kolesnikov, 1994). Gracias a la composición sesgada de nucleótidos de los genes ARNg y de las secuencias adyacentes (Degraeve y col., 1988; Thomas y col., 2007), se detectaron regiones de alta similitud a dichos genes en los insertos (Figura 11) con bajo contenido en GC, según se determinó con el programa *Isochore* del paquete *EMBOSS*.



Figura A11. Alineamiento de secuencias coincidas de minicírculos. Se realizaron los alineamientos de una secuencia de minicírculo de *L. major* (Lma) y de dos de *L. infantum* (Lin) con secuencias de minicírculos de las sauroleishmanias *L. gymnodactyli* (Lgy), *L. guliki* (Lgu) y *L. tarentolae* (Lta). De este modo, se identificaron las secuencias conservadas, entre las que destacan los bloques CSB.

Los contigs 917 y 957 corresponden a minicírculos ya secuenciados, mientras que las contigs 820, 873 y 903 corresponden a nuevas clases de minicírculos (Figura A10 B y C). Una vez

predichas las secuencias de los genes ARNg en cada *contig*, se utilizó la correspondiente al 957 para el diseño de una sonda para la detección y la cuantificación de los genes mediante Northern blot (sonda 917cm 5' ATGATACTTTATTATTTTGCTATATATTTATTTTCATTGTTTGGTTATATATTCT 3', correspondiente a la hebra complementaria del gen ARNg). La secuencia de la sonda utilizada para la detección del ARNr 18 S es 5' 3'. Para el análisis de expresión del ARNg por Northern blot, se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (urea/TBE) y el procedimiento de transferencia e hibridación según está descrito (Brown y col., 2004). Se realizó la electroforesis del ARNm amplificado de promastigotes PNA⁺ y PNA⁻ a 25 W durante 1 h en un gel de poliacrilamida al 15% con urea/TBE. A continuación, se realizó la transferencia a una membrana de nylon HybondTM-N⁺ (GE) a 300 mA durante 1 h, tras lo cual se realizó el *cross-linking* a 120 mJ durante 160 s con *UV StratalinkerTM* (Cultek). Las sondas fueron marcadas con ³²P en sus extremos 5' mediante la incubación de 50 μmol de cada una con 10U de polinucleótido quinasa de T4 (New England BioLabs) y 10 μCi [γ -³²P]ATP (3000Ci/mmol) en un volumen final de reacción de 40 μl. Las sondas fueron purificadas con columnas de *Sephadex G-30* para minicentrífuga (BioRad). La prehibridación se realizó incubando a 37 °C durante 30 min en rotación en un horno de hibridación la membrana con 1ml/10 cm² membrana de una solución compuesta por 5X SSPE (0.75M NaCl, 25mM NaH₂PO₄·H₂O, 2.5 mM EDTA), solución de Denhardt 5X (0.1% de Ficoll 400, polivinilpirrolidona y BSA), 50% de formamida desionizada, 0.5% de SDS y 72 μg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado. A continuación se añadieron las sondas y la hibridación se realizó durante 16 h, transcurridas las cuales las membranas fueron lavadas con un volumen de 2X SSC durante 5 min y después añadiendo otro volumen de 2X SSC y 0.1% SDS e incubando durante 15 min at 37 °C. Finalmente, se realizó la autorradiografía.

Como resultado, se ha detectado el ARNg del minicírculo correspondiente al *contig* 957 sólo en promastigotes PNA⁻ (Figura A12). Por lo tanto, se confirma que este gen ARNg está sobre-expresado en promastigotes metacíclicos. Esta validación no pudo ser realizada por qRT-PCR debido al pequeño tamaño de los genes ARNg.

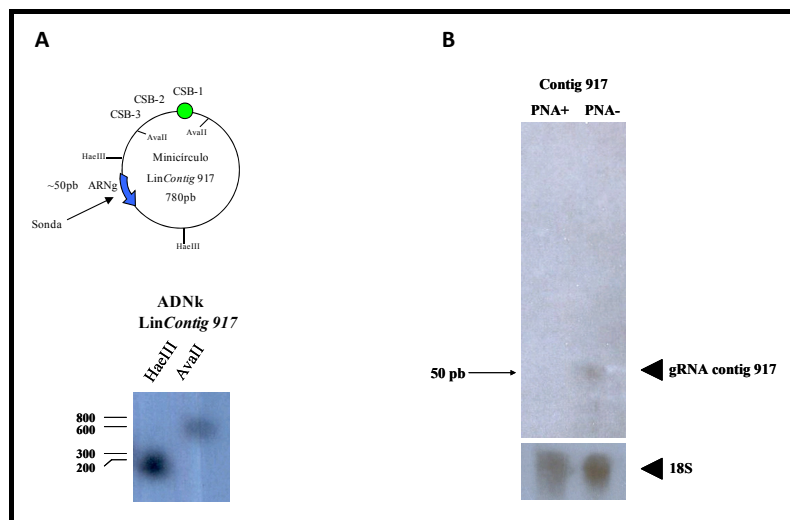


Figura A12. Análisis de la expresión génica del gen ARNg del minicírculo correspondiente al *contig* 917. (A) Análisis por Southern blot de la especificidad de la sonda con ADNk digerido con HaeIII y AvaII. (B) Hibridación de Northern blot para el análisis de la expresión del ARNg.

B

Clones sin diferencias significativas entre grupos experimentales (SAM)

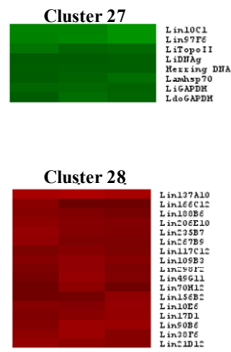


Figura A13. Clusters de genes diferencialmente expresados con $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH independiente y simultáneamente. Se han agrupado los genes diferencialmente expresados en 27 clusters, según el análisis comparativo por *clustering* jerárquico HCL-ST de los perfiles de expresión en las tres condiciones experimentales referidas a las condiciones control (CC). La expresión diferencial de cada uno de los clones indicados está detallada en las Tablas 21-25, A14-A21.

ANEXO IX

 Revisión de los datos de expresión génica diferencial en *Leishmania* spp.

Tabla A37. Revisión de la expresión diferencial de genes en *Leishmania* spp. Abreviaturas: L, promastigotes en fase logarítmica; E, promastigotes en fase estacionaria; A, amastigotes; Emet/pro, promastigotes metacíclicos frente a los procíclicos de la fase estacionaria; TPS, acidificación y aumento de temperatura; TS, aumento de temperatura; PS, acidificación; u, sobre-expresión; d, sub-expresión; (*) Técnicas de proteómica.

<i>Gen</i>	<i>Ortólogos/Parálogos</i>	<i>Especie</i>	<i>Expresión génica diferencial</i>	<i>Referencias</i>
Histonas				
H2A	LmjF29.1730/40	<i>L. major</i> <i>L. mexicana</i>	uE/A, uE/L uL/A	Akopyants y col., 2004 Holzer y col., 2006
H2B	LinJ29_V3.1860/70	<i>L. infantum</i>	uL/A	Sección 4.3.2.
	LmjF19.0040	<i>L. major</i>	uL/A, dE/L	Almeida y col., 2004
	LmjF19.0030	<i>L. major</i>	uL/A	Leifso y col., 2007
	LmjF19.0050	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ19_V3.0040	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uL/A* dE/A* uE/A	Leifso y col., 2007 Rosenzweig y col., 2008 Sección 4.3.2.
Variante de H2B	LinJ28_V3.0210	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	dE/A* uE/A	Rosenzweig y col., 2008 Rochette y col., 2008
H3	LmjF10.0990	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ10_V3.1070	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	dL/A* dE/A* dE/L	Leifso y col., 2007 Rosenzweig y col., 2008 Sección 4.3.2.
	LmjF36.0020	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
H4	LinJ36_V3.0020	<i>L. infantum</i>	uL/A	Sección 4.3.2.
Expresión génica.				
PABP	LinJ35_V3.4200	<i>L. infantum</i>	uL/A* dEmet/pro	Leifso y col., 2007 Sección 4.4.2.
Endorribonucleasa L-PSP (pb5)	LmjF23.0200	<i>L. mexicana</i> <i>L. major</i>	uL/A uL/A	Holzer y col., 2006 Leifso y col., 2007
	LinJ23_V3.0220	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/A* uL/A	Rosenzweig y col., 2008 Sección 4.3.2.
eEF1 α	LmjF17.0080	<i>L. major</i>	uL/A	Leifso y col., 2007
eIF2 α	LinJ17_V3.0180-0200	<i>L. infantum</i>	dTPS, uTS, dEmet/pro	Secciones 4.4.2. y 4.5.5.
	LinJ03_V3.0960	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/A* uE/AL, dE/AL	Rosenzweig y col., 2008 Rochette y col., 2009
eIF3s8	LinJ36_V3.7320	<i>L. donovani</i>	uL/A, uTS, uPS	Secciones 4.3.2. y 4.5.5.
		<i>L. infantum</i>	uE/A* uE/AL	Rosenzweig y col., 2008 Rochette y col., 2009
TFSUII	LinJ24_V3.1240		uL/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. infantum</i>	uE/AL uTPS, uTS, uPS	Rochette y col., 2009 Sección 4.5.5.
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos.				
Ndkb	LmjF32.2950	<i>L. major</i> <i>L. mexicana</i>	uL/A, uE/A uL/A	Almeida y col., 2004 Holzer y col., 2006
	LinJ32_V3.3100/10	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/A* uE/A, dEmet/pro	Rosenzweig y col., 2008 Sección 4.3.2. y 4.4.2.
3'NT/Nasa	LinJ31_V3.2370/80	<i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A uE/A, dTPS	Rochette y col., 2009 Secciones 4.3.2. y 4.4.2.
Proteolisis.				
C2cp	LmjF20.1180	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ20_V3.1210-30	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/A* uE/A, uEmet/pro, dTPS	Rosenzweig y col., 2008 Secciones 4.3.2., 4.4.2 y 4.4.5.
			<i>L. mexicana</i>	uL/A
Catepsina L	LmjF08.1010/20/60	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Leifso y col., 2007
	LmjF08.1040	<i>L. major</i>	uL/A	Sección 4.3.2. y 4.4.2.
	LinJ08_V3.0960	<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/L, uEmet/pro	Sección 4.3.2. y 4.5.5.
Otubaina Proteasoma 20S subunidad α 2	LinJ17_V3.1520	<i>L. infantum</i>	dE/A, uPS	Holzer y col., 2006
	LmjF21.1700	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Rochette y col., 2009
UBC2	LinJ21_V3.2070	<i>L. infantum</i>	uE/AL uL/A	Sección 4.3.2.
	LinJ35_V3.1310	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/A* uE/AL uL/A	Rosenzweig y col., 2008 Rochette y col., 2009 Sección 4.3.2.
Metabolismo de glúcidos y lípido, transporte electrónico y fosforilación oxidativa.				
PGM ^{BPI}	LinJ28_V3.2380	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/A* uE/A, dTPS	Rosenzweig y col., 2008 Sección 4.3.2.&2

Anexo IX

Continuación Tabla A37

Enolasa	LmjF14.1160	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ14_V3.1240	<i>L. infantum</i>	uL/A*	
gPEPCK	LinJ27_V3.2500	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. infantum</i>	dEmet/pro	
Latosterol oxidasa	LinJ23_V3.1560	<i>L. donovani</i>	dE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/L	
MPETS	LmjF30.0750	<i>L. mexicana</i>	uE/A, dTPS	Rochette y col., 2009
	LinJ30_V3.0800	<i>L. donovani</i>	uE/A	
Esteroido DH	LinJ25_V3.1850	<i>L. mexicana</i>	uE/A, dTPS	Sección 4.3.2. y 4.4.5.
		<i>L. donovani</i>	uL/A	
β1,3GalT5	LinJ31_V3.3330	<i>L. infantum</i>	uE/A*	Holzer y col., 2006
		<i>L. infantum</i>	uL/A, dE/L, dEmet/pro	
β-1,3GalT6	LinJ25_V3.2570	<i>L. infantum</i>	uE/AL	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/A	
PGFS	LmjF31.2150	<i>L. infantum</i>	dE/AL	Rochette y col., 2009
	LinJ31_V3.2210	<i>L. major</i>	uTPS	
SCDH	LmjF35.1230	<i>L. mexicana</i>	dE/AL	Sección 4.5.5.
	LinJ35_V3.1230/40	<i>L. donovani</i>	dE/AL	
ECH	LmjF31.2330	<i>L. major</i>	uTPS	Rochette y col., 2009
	LinJ31_V3.2400	<i>L. donovani</i>	dL/A	
		<i>L. infantum</i>	dE/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. infantum</i>	dE/AL	Rosenzweig y col., 2008
			dE/L, uEmet/pro	Rochette y col., 2009
			dE/L, uEmet/pro	Sección 4.3.2. y 4.4.2.
Metabolismo de poliaminas.				
Agmatinasa	LmjF23.0070	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ23_V3.0080	<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A	
Transporte.				
ANCI/ANC2	LmjF19.0200/0210	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ19_V3.0190/0200	<i>L. major</i>	uL/A	
Aap	LmjF31.1800/1820	<i>L. infantum</i>	uL/A	Leifso y col., 2007
	LinJ31_V3.1850	<i>L. major</i>	uE/L	
GT	LmjF36.6280/90	<i>L. mexicana</i>	dE/A, uE/L, uTPS	Saxena y col., 2003
	LmjF36.6290/6300	<i>L. major</i>	uL/A	
MRP (glicoproteína P)	LinJ36_V3.6540/50	<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A, dTPS	Sección 4.3.2. y 4.5.5.
	LmjF23.0250	<i>L. mexicana</i>	uL/A	
PT	LinJ23_V3.0230	<i>L. infantum</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LmjF06.1260	<i>L. mexicana</i>	uL/A	
PT3	LinJ06_V3.1320	<i>L. major</i>	uL/A	Leifso y col., 2007
	LinJ10_V3.0410	<i>L. infantum</i>	dTPS, dTS	
SbGRP	LmjF31.0920	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
	LinJ31_V3.0950/3380	<i>L. mexicana</i>	uTPS	
		<i>L. major</i>	uL/A	Sección 4.5.5.
		<i>L. infantum</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
			uL/A, uE/A, uE/L, dTPS	Leifso y col., 2007
			uL/A, uE/A, uE/L, dTPS	Sección 4.3.2.
Transducción de señales y regulación del ciclo celular.				
MAPK	LinJ24_V3.2410	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
INO1	LmjF14.1360	<i>L. infantum</i>	uL/A, dE/L	Sección 4.3.2.
	LinJ14_V3.1450	<i>L. infantum</i>	dL/A	
		<i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A	McNicoll y col., 2006
			dE/A, uTPS, uTS	Rochette y col., 2009
				Sección 4.5.5.
Citoesqueleto y flagelo.				
Tubulina α	LinJ13_V3.1460	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
	LinJ13_V3.1450	<i>L. infantum</i>	uL/A	
DynHC	LinJ26_V3.1000	<i>L. infantum</i>	uE/AL	Rochette y col., 2009
		<i>L. infantum</i>	uE/A, dTPS	
DynLC2b (citoplásmica)	LmjF18.1010	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ18_V3.1010	<i>L. infantum</i>	uL/A	
DynLCf	LmjF28.2130	<i>L. mexicana</i>	uL/A	Sección 4.3.2.
	Lin28_V3.2280	<i>L. infantum</i>	uL/A, dE/L	
DynLCf	LmjF32.0230	<i>L. major</i>	dL/A	Holzer y col., 2006
		<i>L. major</i>	uL/A	
Mayor paraflagellar rod protein (2C/1D)	LinJ32_V3.0240	<i>L. infantum</i>	uE/A	Rochette y col., 2009
	LmjF29.1750	<i>L. mexicana</i>	uL/A	
PFR	LmjF29.1760	<i>L. major</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
	LinJ29_V3.1880	<i>L. infantum</i>	uL/A	
PFR1D	LinJ09_V3.1390	<i>L. infantum</i>	uL/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. infantum</i>	uL/A	
	LinJ29_V3.1890	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
	LmjF29.1760	<i>L. major</i>	dE/L	
		<i>L. infantum</i>	uL/A	Saxena y col., 2003
			uL/A	Sección 4.3.2.
Moléculas de superficie.				
Amastina (1)	LmjF31.0450	<i>L. donovani</i>	dE/A	Srividya y col., 2007
	LinJ31_V3.0460	<i>L. donovani</i>	dE/A*	
Amastina (2)	LmjF08.0670	<i>L. infantum</i>	dE/A, uTPS, uTS	Rosenzweig y col., 2008
	LinJ08_V3.0680/90/720/1320	<i>L. major</i>	dE/A	
		<i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A	Sección 4.3.2. y 4.5.5.
			dE/A, uE/L, uTPS, uTS	Srividya y col., 2007
				Rochette y col., 2009
				Sección 4.3.2. y 4.5.5.

Expresión génica diferencial en *Leishmania infantum*

Continuación Tabla A37

Amastina (3)	LinJ08_V3.0700/0710/1330	<i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A dE/AL, dE/A	Rochette y col., 2009 Rochette y col., 2009
Amastina	LmjF34.1560/1580/1680/1880/1960	<i>L. mexicana</i>	dE/A, uE/L, uTPS, uTS dL/A	Sección 4.3.2. y 4.5.5. Holzer y col., 2006
Amastina (4)	LinJ34_V3.1150/1680-1710 LinJ34_V3.1720	<i>L. infantum</i> <i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A dE/AL, dE/A uTPS, uTS	Rochette y col., 2009 Rochette y col., 2009 Sección 4.5.5.
Amastina (5)	LinJ34_V3.2660	<i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A uTPS, uTS, uE/L	Rochette y col., 2009 Sección 4.5.5.
Amastina (6)	LinJ34_V3.4370	<i>L. infantum</i>	dE/AL, dE/A uTPS, uTS	Rochette y col., 2009 Sección 4.5.5.
HASPA1	LmjF23.1040	<i>L. major</i>	uE/A, uE/L uE/L	Akopyants y col., 2004 Almeida y col., 2004
HASPA2	LinJ23_V3.1200 LmjF23.1082	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i>	uL/A, uE/A, uE/L uE/A, uE/L	Sección 4.3.2. Akopyants y col., 2004
HASPB	LinJ23_V3.1240 LmjF23.1060/70 LinJ23_V3.1220	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	uE/L uE/A, uE/L dE/A* dE/AL, dE/A	Sección 4.3.2. Akopyants y col., 2004 Rosenzweig y col., 2008 Rochette y col., 2009
Proteína de tipo autoantígeno I/6	LmjF22.1460 LinJ22_V3.1310	<i>L. mexicana</i> <i>L. infantum</i>	dE/A, uE/L, uTPS uL/A uL/A* uE/AL	Sección 4.3.2. y 4.5.5. Holzer y col., 2006 Leifso y col., 2007 Rochette y col., 2009
MBAP	LmjF23.1170/ LmjF36.2570 LinJ23_V3.1430 LinJ36_V3.2700	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	dTPS uE/L	Sección 4.5.5. Saxena y col., 2003
SHERP	LmjF23.1080 LmjF23.1050/80 LinJ23_V3.1210/30	<i>L. major</i> <i>L. major</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	uL/A dTPS uE/A, uE/L uE/A, uE/L uL/A dE/AL, dE/A	Sección 4.3.2. Sección 4.5.5. Akopyants y col., 2004 Almeida y col., 2004 Leifso y col., 2007 Rochette y col., 2009
Tuzina	LinJ29_V3.3020	<i>L. infantum</i>	uE/A, uE/L dE/AL, dE/A uE/L	Sección 4.3.2. Rochette y col., 2009 Sección 4.3.2.

Tabla A38. Revisión de la expresión diferencial de genes de proteínas ribosómicas en *Leishmania* spp. Abreviaturas: L, promastigotes en fase logarítmica; E, promastigotes en fase estacionaria; A, amastigotes; Emet/pro, promastigotes metacíclicos frente a los procíclicos de la fase estacionaria; TPS, acidificación y aumento de temperatura; TS, aumento de temperatura; PS, acidificación; u, sobre-expresión; d, sobre-expresión; (*) Técnicas de proteómica.

<i>Gen</i>	<i>Ortólogos/Parálogos</i>	<i>Especie</i>	<i>Expresión génica diferencial</i>	<i>Referencias</i>
S2	LinJ32_V3.0460	<i>L. infantum</i>	uL/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/L, dEmet/pro	Sección 4.3.2.
S3a	LmjF35.0420 LinJ35_V3.0400/10	<i>L. donovani</i>	dE/A	Srividya y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
S4	LinJ13_V3.1130	<i>L. infantum</i>	uE/A, uE/L	Sección 4.3.2.
		<i>L. infantum</i>	uL/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
S11	LmjF21.1550 LinJ21_V3.1790	<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A, uE/L, dEmet/pro	Sección 4.3.2. y 4.4.2.
		<i>L. major</i>	uL/A, uE/A	Almeida y col., 2004
		<i>L. donovani</i>	uE/A	Rosenzweig y col., 2008
S12	LmjF13.0570 LinJ13_V3.0460	<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. major</i>	uL/A	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
S14	LinJ30_V3.3650	<i>L. infantum</i>	uL/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/A	Sección 4.3.2.
S15	LinJ23_V3.0340	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
S15a	LinJ29_V3.1920	<i>L. infantum</i>	uE/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/A	Sección 4.3.2.
S18	LinJ36_V3.1000 LinJ36_V3.0990	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/L	Sección 4.3.2.
		<i>L. infantum</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
S29	LmjF28.2460 LinJ28_V3.2650 LinJ28_V3.2360	<i>L. mexicanahi</i>	uL/A	Holzer y col., 2006
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/A, uPS	Sección 4.3.2.&2
S33	LmjF26.1630	<i>L. major</i>	dL/A	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
P2	LinJ15_V3.1200	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Sección 4.3.2.
L1a	LinJ29_V3.1180	<i>L. infantum</i>	uE/L	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Sección 4.3.2.
L5	LinJ35_V3.1880 LinJ35_V3.1870	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/L	Sección 4.3.2.
L6	LinJ33_V3.0770	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/AL	Rochette y col., 2009
L7	LinJ26_V3.0150/60	<i>L. donovani</i>	uE/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. infantum</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A, dEmet/pro	Sección 4.3.2.
L10	LinJ04_V3.0950	<i>L. infantum</i>	uL/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
L11	LmjF04.0470 LinJ04_V3.0460	<i>L. major</i>	uL/A, uE/A	Almeida y col., 2004
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uL/A, dEmet/pro	Sección 4.3.2. y 4.4.1.
L13	LmjF29.2460 LinJ29_V3.2580	<i>L. major</i>	uE/A, uE/L	Almeida y col., 2004
		<i>L. infantum</i>	uL/A*	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
L14	LinJ22_V3.1410	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/L	Sección 4.3.2.
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
L18a	LinJ35_V3.0600	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/A	Sección 4.3.2.
L19	LinJ06_V3.0410	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. major</i>	dL/A	Leifso y col., 2007
L23a	LmjF35.3790	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. major</i>	dL/A	Leifso y col., 2007
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
L28	LmjF11.1150 LinJ11_V3.1130	<i>L. major</i>	uL/A, uE/A	Almeida y col., 2004
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
L31	LinJ35_V3.3330/40	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uL/A, uE/A, uPS	Sección 4.3.2.
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
60S L32	LinJ35_V3.2040	<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
		<i>L. infantum</i>	uE/L, dEmet/pro	Sección 4.3.2. y 4.4.2.
		<i>L. donovani</i>	uE/A*	Rosenzweig y col., 2008
60S L38	LinJ26_V3.2230	<i>L. infantum</i>	uE/AL	Rochette y col., 2008
		<i>L. donovani</i>	uL/A	Sección 4.3.2.
		<i>L. infantum</i>	uE/AL	Rochette y col., 2008

ANEXO X

Summary.

Leishmania infantum is the etiologic agent of zoonotic visceral leishmaniasis in the mediterranean basin and is transmitted by the bite of phlebotominae sandflies during bloodmeal intakes. The life cycle of the parasite is dimorphic and digenetic because the extracellular promastigote alternates with the intracellular amastigote stage in the gut of the vector insect and inside mammalian phagocytes respectively. The aim of this PhD Thesis is the comparative transcriptome analysis of the basic differentiation stages of the parasite and several environmental factors affecting growth and differentiation. For this purpose, whole-genome shotgun DNA microarrays were constructed from a complete genome library and gene expression profile analysis were performed by combined hybridization of cDNA samples to be compared and the subsequent normalization and statistical analysis.

In addition to the wide number of data obtained, general information about the differentiation of the parasite could be extracted: the down-regulation rate is higher in the amastigote than in the promastigote stage, *L. infantum* PNA⁻ promastigotes are more infective than PNA⁺ promastigotes, provided the differential expression profile of several genes and the results of the *in vitro* infection assay, temperature increase is more influencing than pH decrease in the differentiation process of promastigotes to amastigotes and a considerable number of differentially regulated genes has been found between promastigotes extracted from the anterior gut of the insect vector and axenically cultured promastigotes in stationary phase.

ANEXO XI

Publicación de los datos del estudio.

Alcolea, P. J., Alonso, A., Sánchez-Gorostiaga, A., Moreno-Paz, M., Gómez, M.J., Ramos, I., Parro, V., Larraga, V. (2009). Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics*, 93, 551-564. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.01.007

Alcolea, P.J., Alonso, A., Gómez, M.J., Sánchez-Gorostiaga, A., Moreno-Paz, M., Toraño, A., Parro, V., Larraga, V. (2010). Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics*, 11:31. doi: 10.1186/1471-2164-11-31

Alcolea, P.J., Alonso, A., Gómez, M.J., Moreno, I., Domínguez, M., Parro, V., Larraga, V. (2010). Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. *Int. J. Parasitol.* 40, 1497-516. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.05.013

Análisis de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de *Leishmania infantum* mediante *microarrays* de ADN

Tesis Doctoral. Pedro José Alcolea Alcolea.

Madrid, 2010

FE DE ERRATAS

- Dedicatorias: donde dice M.P.J.A. debería decir M.P.A.J. (a mi tía María del Pilar Alcolea Jávega, *in memoriam*).
- Índice: en el título de la sección 4.4.2. debería decir "...PNA⁺ y PNA⁻", en lugar de "...PNA⁺ y PNA." Este título está escrito correctamente en el texto.
- Abreviaturas: en el listado de abreviaturas se repiten citb5, DGC y PI. Además, la abreviatura HADH está repetida e incorrectamente escrita la primera vez, concretamente como HAD.
- Página 8, línea 17: donde dice "...respuestas celulares (Th1) y humorales (Th2).", debería decir "...respuestas celulares (Th1, Th2 y citotóxica) y humorales."
- Página 57, línea 1: donde dice "...10 min a 15.000g ..." debería decir "...10 min a 8.000g ...".
- Página 67, línea 41: donde dice "...de esperma de arenque 83,3 µg/µl ..." debería decir "...de esperma de arenque 83,3 ng/µl ...".
- Página 78, tabla 5: "2,0 x 10⁵" y "2,4 x 10⁵" deberían ser sustituidos por "2,0 x 10⁴" y "2,4 x 10⁴".
- Página 84, línea 11: en "α = 0.05", la separación de las cifras decimales se ha de hacer con coma.
- Página 86, tabla 8: los siete primeros datos de las columnas F ± S y p son erróneos. Los datos correctos de la columna F ± S son, por este orden: 1,1 ± 0,4; -1,3 ± 0,8; -1,0 ± 0,2; 1,1 ± 0,1; 1,2 ± 0,6; -1,1 ± 0,0; 1,4 ± 0,3. Los datos correctos de la columna p son, por este orden: 0,214; 0,467; 0,385; 0,112; 0,501; 0,480; 0,272.
- Página 86, tabla 9: los datos que ocupan las posiciones 10 a 13 de las columnas F ± S y p son erróneos. Los datos correctos de la columna F ± S son, por este orden: -1,3 ± 0,4; -1,2 ± 0,3; -1,5 ± 0,5; 1,0 ± 0,2. Los datos correctos de la columna p son, por este orden: 0,213; 0,092; 0,310; 0,163.
- Página 96, línea 4: donde dice "(36_V3.0020),..." debería decir "(LinJ36_V3.0020),...".
- Página 97, línea 41: donde dice "...que es independiente de regulación por catabolito." debería decir "que es dependiente de regulación por catabolito."
- Página 98, línea 28: donde dice "...ABC, Se ha detectado..." debería decir "...ABC, se ha detectado...".
- Página 101, línea 25: donde dice "Para la síntesis de la tripanotión,..." debería decir "Para la síntesis del tripanotión,...".
- Página 101, línea 40: donde dice "...cadena ramificada (valine, leucina e isoleucina)..." debería decir "...cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina)...".
- Página 104, línea 4: donde dice "...está sobre-espresado en E/A." debería decir "...está sobre-expresado en E/A."
- Página 109, línea 9: en "α = 0.05", la separación de las cifras decimales se ha de hacer con coma.
- Página 144, tabla 25, línea 4: donde dice "Proteína hipotética conservada" debería decir "Proteína hipotética conservada".
- Página 144, tabla 25, línea 36: donde dice "...S27a.putativa" debería decir "...S27a, putativa".
- Página 144, tabla 25, línea 44: donde dice "...S23.Putativa" debería decir "...S23, putativa".

- Página 144, tabla 25, línea 62: donde dice “Metacaspasa, putativa” debería decir “Metacaspasa, putativa”.
- Página 145, pie de figura 54, línea 3: donde dice “...separados por la línea discontinua el cuerpo celular...” debería decir “...separados por la línea discontinua. El cuerpo celular...”.
- Página 149, encabezamiento de tabla 28, línea 2: en lugar de “anotación;...” debería aparecer “anotación;...”.
- Página 149, tabla 28: faltan las cuasidesviaciones típicas de los datos de qRT-PCR. Son las siguientes por este orden: $\pm 0,2$; $\pm 0,0$; $\pm 0,1$; $\pm 0,3$; $\pm 2,1$.
- Página 149, tabla 29: faltan las cuasidesviaciones típicas de los datos de qRT-PCR. Son las siguientes por este orden: $\pm 1,6$; $\pm 0,5$.
- Página 161, línea 3: donde dice “Los genes de la a histona...” debería decir “Los genes de la histona...”.
- Página 162, línea 7: donde dice “LinJ31_V3,3390/40” debería decir “LinJ31_V3.3390/400”.
- Página 162, línea 8: donde dice “LinJ31_V3,1850” debería decir “LinJ31_V3.1850”.
- Página 162, línea 9: donde dice “LinJ15_V3,0800” debería decir “LinJ15_V3.0800”.
- Página 162, línea 16: donde dice “LinJ13_V3,0860” debería decir “LinJ13_V3.0860”.
- Página 162, línea 30: “(...NAD(P)⁺);...” debe aparecer en lugar de “(...NAD(P)⁺;...”.
- Página 162, línea 40: donde dice “LinJ06_V3,1320” debería decir “LinJ06_V3.1320”.
- Página 162, línea 42: donde dice “LinJ23_V3,0050” debería decir “LinJ23_V3.0050”.
- Página 164, línea 11: donde dice “LinJ14_V3,1500” debería decir “LinJ14_V3.1500”.
- Página 187, línea 11: “El transportador Ca²⁺-ATPasa...” debe aparecer en lugar de “El transportador Ca²⁺-ATPasa...”.
- Página 187, línea 21: donde dice “Por lo tanto, la esta diferencia...” debería decir “Por lo tanto, esta diferencia...”.
- Página 227, línea 47: donde dice “CaC₁₂” debería decir “CaCl₂”.
- Página 230, línea 2: donde dice “Se prepara otra se añade...” debería decir “Se prepara otra solución de KH₂PO₄ 0,17 M y K₂HPO₄ 0,72M, se esteriliza en el autoclave a 120 °C y 1,05 Kg/cm² durante 20 min y se añade...”.
- Página 231, línea 48: donde dice “...MgC₁₂ 1 mM, ZnC₁₂...” debería decir “...MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂...”.
- Página 232, línea 30: donde dice “Tampón de carga para proteínas (es 5X, ponerlo; a 1X es...)” debería decir “Tampón de carga para proteínas (se prepara a 5X; la composición a 1X es...)”.
- Página 260, tabla A25, línea 59: donde dice “Metacaspase, putativa” debería decir “Metacaspasa, putativa”.
- Página 260, tabla A25, línea 76: donde dice “Mevalonato quinase, putativa” debería decir “Mevalonato quinasa, putativa”.
- Página 277, pie de figura A10, línea 3: donde dice “...con una perfecta coincidencia dentre...” debería decir “...con una perfecta coincidencia entre...”.
- Página 283, línea 60: donde dice “Metabolismo de glúcidos, lípido,...” debería decir “Metabolismo de glúcidos, lípidos,...”.
- Página 287, línea 11: donde dice “...expression profile analysis were...” debería decir “...expression profile analyses were...”.
- Pies de figuras 46, 57, 62 y 65: el paréntesis está incorrectamente cerrado en la ecuación 8, debiendo aparecer como sigue: $A = [(\log_2 R_i + \log_2 V_i)/2]$.
- Tablas 10, 11, 12, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, A5, A14 y A16: en las columnas “qRT-PCR”, todas las cifras decimales deberían estar separadas por comas en lugar de puntos.