



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Análisis *in silico* y proteómico de la metil transferasa
Fibrilarina de *Leishmania major***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

Presenta:

Aguirre González Sagrario



Director de tesis: Dr. Tomás Nepomuceno Mejía.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México. 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser el medio en el que adquirí gran parte de mi conocimiento en el ámbito académico y personal.

Al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía, por aceptar ser mi asesor en la realización de este proyecto, por la disposición que tuvo a la hora de compartirme su conocimiento, por sus consejos, aportes y sobre todo por su infinita paciencia.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por aceptarme como miembro de su grupo de trabajo en el laboratorio de tripanosomátidos, por los conocimientos transmitidos y el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

Al biólogo Luis Enrique Florencio Martínez, su apoyo y conocimiento transmitido en la parte experimental de esta tesis resultó de suma importancia para obtener resultados de calidad.

A mis compañeros del Laboratorio 1 de la UBIMED: Isabel, Aldo, Andrés, Fabiola, Luis Alberto, Roberto, el apoyo, la paciencia y el conocimiento que adquirí de cada uno de ustedes durante la realización de mi proyecto la considero valiosa.

A mi comité de asesores: el Dr. Santiago Martínez, la Dra. Martha Salcedo, el biólogo Luis Enrique Florencio, el Dr. Raúl Bobes y el Dr. Tomás Nepomuceno; por la retroalimentación recibida y los conocimientos que compartieron conmigo para poder culminar satisfactoriamente esta tesis.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su extenso apoyo técnico para la captura de las imágenes de fluorescencia.

Este trabajo de investigación fue realizado con el apoyo del donativo 256561 de CONACyT y por IA204019 de PAPIIT (DGAPA, UNAM) otorgados al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía.

Agradecimientos personales

A mi papá, Juan quien durante su estancia en este planeta me guió, me otorgó los valores humanos, las armas, los medios y los elementos para hacer frente al largo e irremediable camino que tendré que seguir recorriendo: la vida.

A mi mamá, Luz María por su apoyo en todos los ámbitos de mi vida, por ser un modelo a seguir de mujer exitosa e inteligente. Admiro tu historia de vida y cada una de las cosas que has hecho para ayudarme a seguir adelante, te amo.

A mi hija, Samara porque resultaste ser un motivo por el cual debo ser mejor persona, me siento orgullosa de saber hasta dónde hemos llegado, aprendiendo una de la otra y de juntas representar el amor incondicional.

A Lina, Beto y Paul, fueron y son una red de apoyo importante en mi papel maternal y profesional, estaré agradecida con ustedes toda mi vida.

A Isabel, por ser más que una amiga durante mi estadía en la universidad, por ser mi cómplice en las buenas y en las malas, por acompañarme en las risas y llantos, agradezco que nuestras vidas hayan coincidido, te quiero. A Armando, Alondra, Aldair, Camila, Nancy y Lupita, el equipo ganador, aprendí de cada uno de ustedes, gracias por las pláticas amenas y los recuerdos agradables. A Kevin, tu apoyo en todos los sentidos, tus palabras de aliento y la empatía que recibí estos últimos meses de tu parte, han sido muy importantes para mí, gracias por volver a mi vida.

Dedicatoria

A mi papá, Juan Aguirre.

"In the vastness of space and the immensity of time, it is my joy to have shared a planet and an epoch with you".

-Carl Sagan

Índice

Lista de figuras	V
Lista de Tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Resumen.....	IX
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de tripanosomátidos.....	1
1.2. Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i>	3
1.3. Leishmaniasis.....	6
1.3.1. Leishmaniasis cutánea localizada	6
1.3.2. Leishmaniasis cutánea diseminada.....	6
1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea	7
1.3.4. Leishmaniasis visceral.....	7
1.3.5. Situación epidemiológica en México.....	8
1.4. Ciclo de vida.....	10
1.5. Biología de <i>Leishmania</i>	11
1.6. Nucléolo	14
1.7. Biogénesis ribosomal	16
1.7.1. snoRNPs y el procesamiento del rRNA.....	21
1.7.2. Fibrilarina	23
1.8 Purificación por afinidad en tándem	24
1.9 Antecedentes	25
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo general	28
2.2. Objetivos particulares.....	28
3. Estrategia experimental.....	29
4. Materiales y métodos.....	30
4.1. Análisis <i>in silico</i>	30
4.2. Cultivo y conteo de promastigotes	30
4.3. Obtención del gen LmFib 1 por PCR	31
4.4. Generación del vector pGE-LmFib.....	31
4.5. Transformación de bacterias competentes.	32
4.6. Purificación del inserto LmFib	32
4.7. Generación del vector pLmFib-PTP	32
4.8. Purificación del vector LmFib-PTP	33
4.9. Transfección <i>L. major</i>	33
4.10. Obtención de clones celulares	34

4.11.	Extracción de proteínas	34
4.12.	Ensayo Western blot	35
4.13.	Inmunofluorescencia	35
4.14.	Purificación por cromatografía de afinidad en tándem.....	36
5.	Resultados.....	60
5.1.	Análisis de la secuencia de LmFib	60
5.1.1.	Comparación de la secuencia de LmFib con su ortólogo en levadura	61
5.1.2.	Fibrilarina en tripanosomátidos.....	64
5.2.	Obtención del vector pGEM-T Easy	66
5.3.	Obtención del vector LmFib-PTP	71
5.4.	Obtención de poblaciones estables de LmFib-PTP	75
5.5.	Obtención de clonas celulares LmFib-PTP	76
5.6.	LmFib-PTP se expresa en las clonas celulares	76
5.7.	LmFib-PTP se localiza en el nucléolo	79
5.8.	Purificaciones por afinidad en tándem	81
5.9.	Análisis por espectrometría de masas	82
6.	Discusión	91
7.	Conclusiones y logros.....	101
8.	Referencias bibliográficas	102

Lista de figuras

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de transmisión del kDNA de un epimastigote de <i>T. cruzi</i>	2
Figura 2. Representación esquemática de los principales organelos intracelulares de un tripanosomátido.....	3
Figura 3. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	3
Figura 4. Esquema de clasificación de los subgéneros de <i>Leishmania</i>	5
Figura 5. Presentación clínica de leishmaniasis.....	8
Figura 6. Distribución geográfica de Leishmaniasis en México.....	10
Figura 7. Esquema del ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	11
Figura 8. Transcripción policistrónica, splicing en trans y poliadenilación en tripanosomátidos.....	13
Figura 9. Representación esquemática del nucléolo en humanos (A) y tripanosomátidos (B).....	15
Figura 10. Micrografía electrónica de transmisión de un epimastigote de <i>T. cruzi</i>	16
Figura 11. La RNA Pol I y el complejo de preiniciación.....	17
Figura 12. Genes ribosomales y transcrito ribosomal primario.....	18
Figura 13. Representación esquemática de la biogénesis de ribosomas en eucariontes.....	19
Figura 14. Esquema general del procesamiento del transcrito ribosomal primario en tripanosomátidos.....	20
Figura 15. Tipos de snoRNA que guían la modificación del pre-rRNA.....	21
Figura 16. Estructura general de los snoRNPs caja C/D.....	22
Figura 17. La estructura secundaria y tridimensional de Fibrilarina presenta un alto nivel de conservación desde arqueas hasta humanos.....	24
Figura 18. Conformación de la molécula de Fibrilarina en humanos.....	24
Figura 19. Esquema de la etiqueta PTP.....	25
Figura 20. Análisis <i>in silico</i> de las dos isoformas de Fibrilarina de <i>L. major</i>	60
Figura 21. Comparación de secuencia primaria y estructura secundaria de Fibrilarina en <i>L. major</i> (LmFib) y de <i>S. cerevisiae</i> (ScFib).....	63
Figura 22. Modelo tridimensional de Fibrilarina en <i>S. cerevisiae</i> (ScFib) y <i>L. major</i> (LmFib).....	63
Figura 23. Sobreposición de los modelos tridimensionales de ScFib y LmFib.....	64
Figura 24. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Fibrilarina de diferentes especies de <i>Leishmania</i> y <i>Trypanosoma</i>	65
Figura 25. Obtención del gen Lmfib-1 por PCR.....	67
Figura 26. Clonación de LmFib en el vector pGEM-T Easy.....	68
Figura 27. Análisis de restricción del DNA plasmídico pGE-LmFib.....	69

Figura 28. Alineamiento de la secuencia del gen de Fibrilarina localizado en el cromosoma 36 de <i>L. major</i> (LmFib) con la secuencia de la clona 2 (C2LmFib).....	71
Figura 29. Generación del vector pLmFib-PTP	71
Figura 30. Análisis del vector LmFib-PTP.....	72
Figura 31. Análisis de restricción del plásmido LmFib-PTP con las enzimas <i>Xma</i> I y <i>Xba</i> I.....	72
Figura 32. Alineamiento de la secuencia del gen de Fibrilarina localizado en el cromosoma 36 de <i>L. major</i> (LmFib) con la secuencia de la clona tres, utilizada para la construcción de LmFib-PTP.	74
Figura 33. Análisis de restricción del vector pLmFib-PTP	75
Figura 34. Análisis de Western blot de dos poblaciones transfectadas de LmFib-PTP.....	76
Figura 35. Expresión de LmFib-PTP utilizando el anticuerpo primario anti-Prot C.....	77
Figura 36. Expresión de LmFib-PTP utilizando el anticuerpo primario anti-Prot A.....	78
Figura 37. Expresión de LmFib-PTP utilizando el anticuerpo primario anti-Flag.	78
Figura 38. Localización subcelular de la proteína LmFib-PTP.....	80
Figura 39. Proteínas obtenidas de la purificación por afinidad en tándem de LmFib-PTP.....	81
Figura 40. Proteínas asociadas con LmFib.	82

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación del patrón de desarrollo del género <i>Leishmania</i> en el intestino de la mosca de la arena.....	4
Tabla 2. Distribución geográfica y formas clínicas de la enfermedad de las especies de <i>Leishmania</i> registradas en México.....	9
Tabla 3. Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la Fibrilarina de distintas especies de tripanosomátidos.....	66
Tabla 4. Proteínas identificadas en la espectrometría de masas.....	90

Abreviaturas

Amp r	Gen de resistencia a ampicilina
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CG	Componente Granular
DFC	Componente Fibrilar Denso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EIp3	Proteína elongadora 3
FC	Centro Fibrilar
G418	Neomicina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
mRNA	RNA mensajero
Neo r	Gen de resistencia a Neomicina
NORs	Regiones Organizadoras Nucleolares
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Prot A	Dominio de proteína A
Prot C	Dominio de proteína C
PTP	Péptido de extracción de dominios Prot A-TEV-Prot C
rDNA	DNA ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNA Pol I	RNA Polimerasa I
iRNA	RNA de interferencia
RNP	Ribonucleoproteína
RP	Proteína Ribosomal
rRNA	RNA ribosomal
SAM	S-adenosilmetionina
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecyl sulfato sódico

SL RNA	<i>Spliced Leader</i> RNA
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
snoRNP	Partícula Ribonucleoproteica Pequeña Nucleolar
snRNA	RNA pequeño nuclear
TBP	Proteína de Unión a Caja TATA
UBF	Upstream Binding Factor
UCE	Elemento de secuencia anterior
UFC	Unidad(es) Formadora(s) de Colonia
UTR	Región no traducida
WHO	Organización Mundial de la Salud

Resumen

Leishmania major es un protozoo flagelado que pertenece a la familia de los tripanosomátidos y se caracteriza por ser el agente etiológico de la enfermedad denominada leishmaniasis. Una de las líneas de investigación del laboratorio al que pertenezco se enfoca en la identificación de factores proteicos asociados a la maduración del RNA ribosomal (rRNA). Por ello, el estudio dirigido hacia Fibrilarina resulta trascendental para tener un mejor entendimiento del proceso de la biogénesis ribosomal de este parásito, que especulamos es complejo debido a la polifragmentación del gen del rRNA 28S. Fibrilarina tiene un papel importante en las modificaciones post-transcripcionales ya que forma parte de los snoRNA caja C/D que se involucran en la metilación del pre-rRNA, en donde Fibrilarina es la enzima metil transferasa. Este trabajo se inició para caracterizar molecularmente a Fibrilarina de *L. major*, de manera que se amplificó y clonó el gen de Fibrilarina en el plásmido pGEM-T Easy. También, se subclonó en el vector pB6-PTP para obtener la construcción LmFib-PTP con la que fueron transfectados promastigotes de *Leishmania major* cepa Friedlin. Se obtuvieron clonas celulares y se verificó la expresión de la proteína recombinante en estos parásitos transgénicos por Western blot. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta, que demostraron la localización de Fibrilarina en el nucléolo celular. En la última fase del proyecto, se realizó la purificación de complejos asociados con Fibrilarina por cromatografía de afinidad en tándem. La identidad de las proteínas que copurificaron con LmFib fue descrita por espectrometría de masas y análisis bioinformáticos. Se encontró que LmFib interacciona con un gran número de proteínas, incluidas aquellas que forman parte del core de los snoRNPs de caja C/D y caja H/ACA; asimismo, se identificó un número considerable de helicasas, ATPasas, GTPasas, una diversidad de factores de ensamblaje de las subunidades ribosomales, histonas, proteínas de choque térmico asociadas a la biogénesis ribosomal y algunos polipéptidos hipotéticos, cuyos ortólogos de *Trypanosoma brucei* se concentran en el nucléolo y que resultan moléculas nuevas interesantes de estudio.

1. Introducción

1.1. Generalidades de tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son organismos unicelulares flagelados pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Dentro de este grupo de eucariontes se conocen dos géneros capaces de parasitar a humanos: *Trypanosoma* y *Leishmania*, con varias especies extensamente distribuidas en humanos y animales (Gutierrez, 2000). Las enfermedades más comunes causadas por estos parásitos incluyen las tripanosomiasis africana humana o enfermedad del sueño, que es causada por la infección de *Trypanosoma brucei*; la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*; y varias formas de leishmaniasis, producidas por diferentes especies de *Leishmania* (Stuart et al., 2008).

Los tripanosomátidos presentan un DNA mitocondrial (kDNA) inusual denominado **cinetoplasto**, que puede representar hasta el 30% del DNA total del parásito y está compuesto de moléculas circulares denominadas maxicírculos y minicírculos (Fig.1) que se relajan y entrelazan para formar una sola red (Lopes et al., 2010). En los maxicírculos se encuentran genes de RNA ribosomal (rRNA) mitocondrial y 18 genes codificantes para proteínas. La mayoría de los RNA mensajeros mitocondriales sintetizados experimentan un proceso denominado edición del RNA que consiste en la inserción y/o la delección específica de residuos de uridina para generar mRNAs traducibles. Salvo una excepción, la especificidad de este mecanismo es proporcionada por RNAs guía (gRNA) que están codificados, principalmente, en los minicírculos (Cavalcanti y de Souza, 2018; Lukeš et al., 2002).

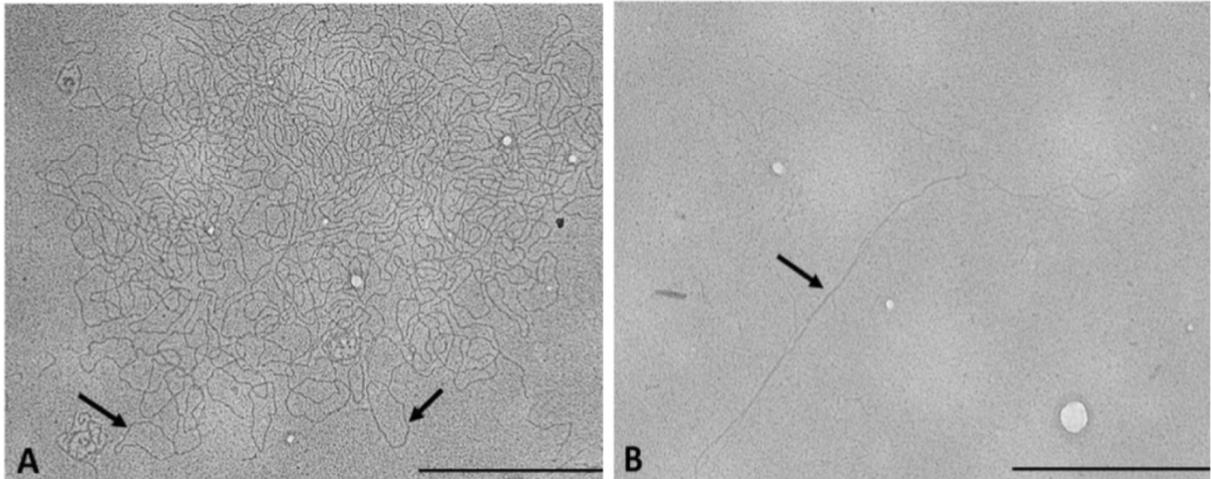


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de transmisión del kDNA de un epimastigote de *T. cruzi*. A) Los minicírculos se aislaron de la red y se indican con las flechas. B) Un maxicírculo es ilustrado (flecha). Retomado de Cavalcanti y de Souza, 2018.

Los **glicosomas** (Fig. 2) se descubrieron inicialmente en *T. brucei* y posteriormente se encontraron en otros miembros cinetoplástidos. Los glicosomas contienen la mayoría de las enzimas involucradas en la vía glucolítica, que permite la conversión de glucosa en piruvato, también tienen otras funciones relacionadas con la biosíntesis de pirimidinas, las vías de recuperación de purinas y la síntesis de lípidos de éter y la oxidación de ácidos grasos (Lopes et al., 2010). Los glicosomas están limitados por una única capa de fosfolípidos, no contienen DNA ni tampoco la enzima catalasa. Se ha demostrado que la biogénesis de los glicosomas se produce a lo largo de rutas similares a la de los peroxisomas, por lo que son considerados miembros atípicos de la familia de estos organelos (Lopes et al., 2010; Michels et al., 2006).

Por otro lado, los tripanosomátidos poseen unas estructuras estables ubicadas debajo de la membrana plasmática, que están compuestas mayoritariamente por heterodímeros de α/β tubulina denominadas **microtúbulos subpeliculares** (Fig. 2). Estas filas tubulares paralelas se encargan de definir la morfología de los diferentes estadios del parásito que aparecen a lo largo de su ciclo de vida (Vidal y de Souza, 2017).

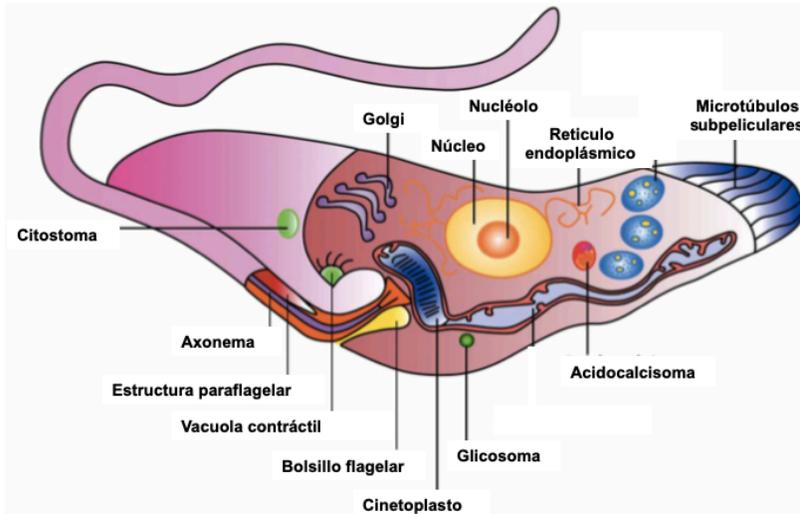


Figura 2. Representación esquemática de los principales organelos intracelulares de un tripanosomátido. Modificado de Lopes et al., 2010.

1.2. Clasificación taxonómica de *Leishmania*

El género *Leishmania* fue observado por primera vez en 1885, y trece años después fue descrito por William Leishman y Charles Donovan (1903). Aproximadamente 53 especies de *Leishmania* han sido identificadas; de esas, se conoce que 31 especies son capaces de parasitar mamíferos y 21 especies son patógenas para el ser humano. El esquema de la clasificación taxonómica se ilustra en la figura 3 (Akhoundi et al., 2016; Mauricio, 2018).



Figura 3. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*. Recuperado de Mauricio, 2018.

A partir de 1963 se señalaron patrones de comportamientos muy marcados en las formas flagelares de *L. braziliensis* y *L. mexicana*, por lo que Nicoli y posteriormente Johnson y Hertig sugirieron tal hallazgo como una característica taxonómica confiable. Con base en lo anterior, Lainson y Shaw (1979) propusieron una clasificación de *Leishmania* tomando como parámetro de selección el patrón de desarrollo en el intestino de la mosca de la arena (Tabla 1) (Vargas et al., 2011).

Sección del intestino	Especies representantes
Hipopilaria: la infección se restringe al intestino posterior (píloro, íleon y recto).	<i>L. agamae</i> <i>L. ceramodactyli</i>
Peripilaria: la infección mantiene un desarrollo obligado del parásito en el intestino posterior, pero presentan una migración al intestino medio y anterior.	<i>L. adleri</i> <i>L. tarentolae</i> <i>L. braziliensis</i>
Suprapilaria: los parásitos se restringen al intestino medio y anterior.	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. donovani</i> <i>L. mexicana</i>

Tabla 1. Clasificación del patrón de desarrollo del género *Leishmania* en el intestino de la mosca de la arena. Recuperado de Vargas et al., 2011.

De esa manera, las leishmanias fueron inicialmente agrupadas en dos subgéneros: *L. (Leishmania)*, que comprende los parásitos que se desarrollan solamente en el intestino medio y anterior, y que resultan ser los agentes causales de leishmaniasis cutánea y visceral en el Nuevo y Viejo mundo además del subgénero *L. (Viannia)*, causante de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Nuevo mundo, con desarrollo de los parásitos en el intestino anterior, medio y posterior del flobotómíneo. Posteriormente, se dilucidó un tercer subgénero llamado *L. (Sauroleishmania)*, una forma infecciosa que se limita al intestino posterior del vector y es patógena en reptiles (Fig. 4) (Vargas et al., 2011; Bates, 2007). Finalmente, las especies *L. martiniquensis*, *L. orientalis*, *L. enriettii* y *L. macropodum*, que causan leishmaniasis en humanos y animales, fueron recientemente incluidas en el cuarto subgénero *L. (Mundinia)* (Espinosa et al., 2018).

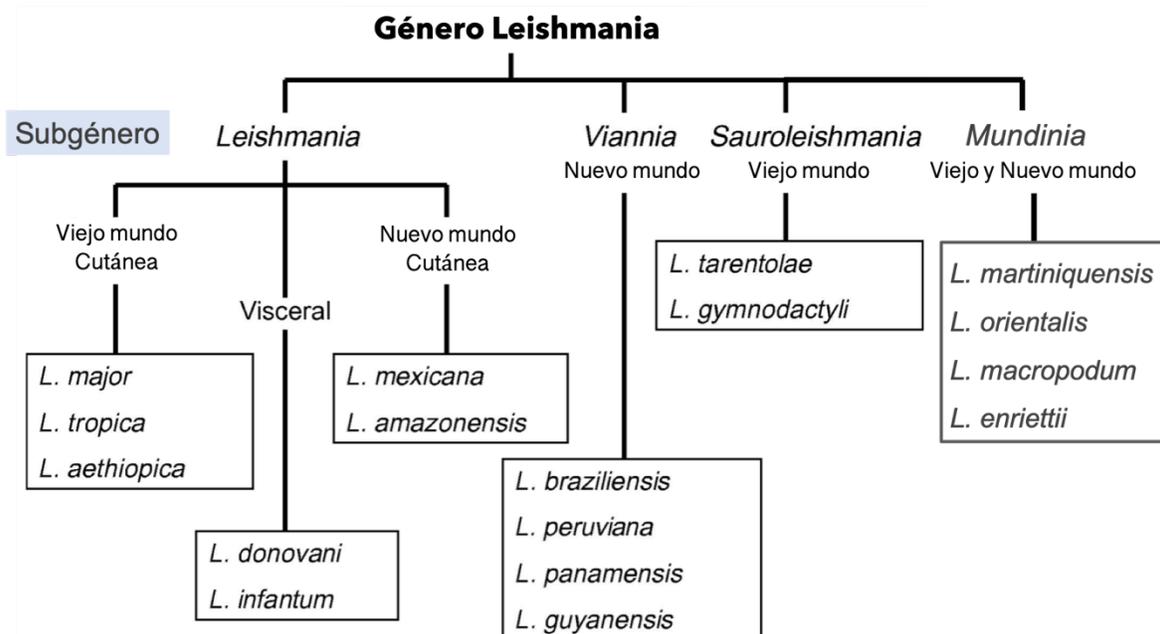


Figura 4. Esquema de clasificación de los subgéneros de *Leishmania*. Los parásitos pertenecientes a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* infectan a mamíferos, el subgénero *Sauroleishmania* infectan a reptiles mientras que, *Mundinia* es capaz de parasitar humanos y otras especies animales. Las especies mencionadas incluyen algunas de las más conocidas y representan el foco de la investigación biomédica. Modificado y recuperado de Bates, 2007; Espinosa et al., 2018.

1.3. Leishmaniasis

Es una enfermedad causada por protozoos del género *Leishmania* que son transmitidos al humano por la picadura de insectos flebótomos infectados. A la fecha se ha descrito la existencia de 21 especies patógenas del hombre. La leishmaniasis tiene tres formas clínicas principales: cutánea, mucocutánea y visceral (Valero y Uriarte, 2019). Esta patología afecta a las poblaciones más pobres del planeta, está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de personas, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos. Se estima que cada año se producen entre 700 000 a un millón de nuevos casos y entre 26 000 a 65 000 defunciones (WHO, 2019).

1.3.1. Leishmaniasis cutánea localizada

Se considera como la forma más común de leishmaniasis. En el Viejo Mundo es ocasionada por *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. infantum* (norte de África, Oriente Medio, Asia Central y Sur de Europa) y en el continente americano por *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*. Las lesiones cutáneas se desarrollan dentro de varias semanas, meses o años después de la exposición. Consiste en alteraciones en la piel que generalmente evolucionan de pápulas a placas nodulares y úlceras que se caracterizan por ser rosadas, redondas con bordes delimitados y elevados, con una base endurecida y, una costra que puede sangrar (Fig. 5A). Estas lesiones aparecen en áreas del cuerpo expuestas a picaduras de insectos tales como orejas, nariz, labio superior, mejillas, piernas, manos, antebrazos y tobillos. El proceso de curación generalmente produce cicatrices atróficas (CDC, 2017; Goto y Lauletta, 2012).

1.3.2. Leishmaniasis cutánea diseminada

Es ocasionada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* en Centroamérica, Brasil y Venezuela. Se caracteriza por la falta de respuesta

inmunitaria celular eficaz contra el parásito, de manera que ocurre una diseminación a través de los tejidos, linfa y vía sanguínea, desarrollando lesiones pleomórficas cutáneas en áreas no contiguas del cuerpo que pueden afectar las membranas mucosas en el 30% de los casos (Torres-Guerrero et al., 2017). Predomina en zonas expuestas, pabellones auriculares, mejillas y extremidades; se caracteriza por numerosas lesiones de tipo acné, ulceradas y papulares (Fig. 5B) (Vera-Izaguirre et al., 2006).

1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea

Está asociada principalmente a *L. braziliensis* aunque *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* también pueden actuar como agentes etiológicos en pueblos de América del Sur. En la mayoría de los casos ocurre después de haberse presentado leishmaniasis cutánea, y el diagnóstico de la afectación de la mucosa se establece meses o años luego de la curación clínica del sitio de infección cutánea original. Inicialmente, los síntomas incluyen picazón en la nariz y posteriormente la formación de costras y sangrado; la inflamación y la destrucción parcial o total de cartílago y de las membranas mucosas de boca, nariz, garganta, faringe y laringe pueden ocurrir eventualmente y en caso de que no se trate, puede ocasionar daños desfigurantes y cicatrices en las áreas afectadas (Fig. 5C) (Pereira et al., 2011; Goto y Lauletta, 2012).

1.3.4. Leishmaniasis visceral

Se conoce como la forma clínica más severa, también se denomina como kala-azar (fiebre negra) y es causada por *L. donovani* (India y África Oriental), *L. infantum* (área mediterránea), *L. chagasi* y *L. tropica* en el Nuevo Mundo. El cuadro clínico puede incluir fiebre prolongada, pancitopenia, anemia progresiva, hepatomegalia, esplenomegalia y pérdida de peso (Fig. 5D). En algunos casos, se pueden desarrollar nódulos endurecidos o máculas despigmentadas dando lugar a la leishmaniasis dérmica post kala-azar. La población en riesgo de padecer leishmaniasis visceral incluye niños en edad preescolar e individuos

inmunocomprometidos y desnutridos de modo que, en caso de no instaurar un tratamiento adecuado de forma oportuna, puede evolucionar hacia la muerte en más del 90% de los casos (PAHO, 2012; Sundar, 2015; Torres-Guerrero et al., 2017).



A



B



C



D

Figura 5. Presentación clínica de leishmaniasis. A) Úlcera en un área expuesta del cuerpo característica de leishmaniasis cutánea localizada B) Lesiones en la piel consideradas como signo clínico de la leishmaniasis cutánea diseminada C) Daño desfigurante en un área afectada por leishmaniasis mucocutánea D) hepatoesplenomegalia (crecimiento de hígado y bazo) ocasionados por leishmaniasis visceral. Imágenes recuperadas de PAHO, 2012; Torres-Guerrero et al., 2017; Zea et al., 2009.

1.3.5. Situación epidemiológica en México

En países latinoamericanos como México, la leishmaniasis y sus diversas formas clínicas se consideran desatendidas y suelen afectar sectores vulnerables y marginados de la población. Generalmente, la mayor parte de la población expuesta

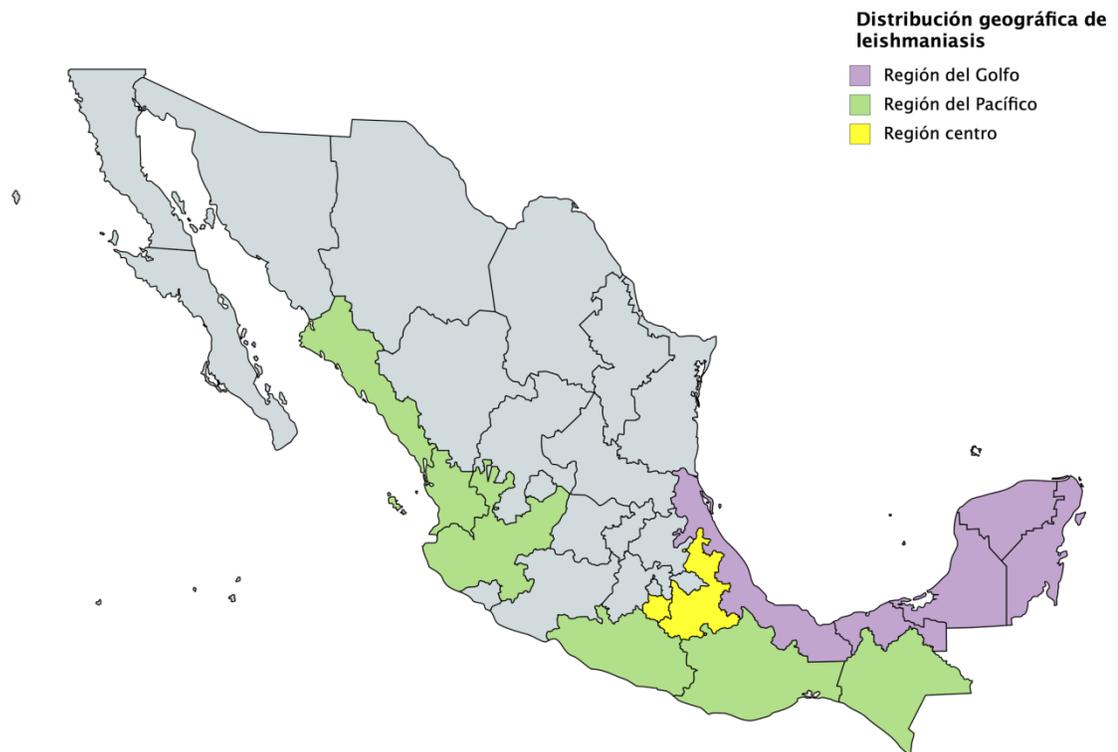
vive en áreas rurales y agrícolas, donde se siembra y cosecha café, cacao o árboles chicleros. Sin embargo, se ha llegado a considerar como una enfermedad ocupacional que afecta principalmente a hombres en edad productiva, de 15 a 44 años, quienes por motivos de trabajo o turismo se adentran a áreas selváticas donde habita el vector, exponiéndose a su picadura. En México, se conoce su presencia en las diversas formas clínicas (Tabla 2) (Córdova-Uscanga et al., 1993; WHO, 2010).

Agente etiológico	Distribución geográfica	Forma clínica
<i>L. mexicana</i>	Campeche, Chiapas, Coahuila, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán.	Leishmaniasis cutánea localizada.
<i>L. braziliensis</i>	Tabasco, Michoacán, Coahuila y Tamaulipas.	Leishmaniasis cutánea diseminada.
	Tabasco y Chiapas.	Leishmaniasis mucocutánea.
<i>L. infantum</i>	Guerrero y Morelos.	Leishmaniasis visceral.

Tabla 2. Distribución geográfica y formas clínicas de la enfermedad de las especies de *Leishmania* registradas en México. Retomado de Córdova-Uscanga et al., 1993.

En el año 2016 la Secretaría de Salud indicó que la población en riesgo de contraer *Leishmania* en nuestro país es de aproximadamente nueve millones de personas, distribuidas en 13 entidades federativas de tres áreas geográficas: Región del Golfo (Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán), Región del Pacífico (Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa) y Región Centro (Morelos y Puebla) (Fig. 6). Según las cifras del boletín epidemiológico semanal que emite la dirección general de epidemiología, en México se presentaron dos casos nuevos de leishmaniasis visceral y 726 de leishmaniasis cutánea durante el año

2019. Los reportes hasta la semana 24 del 2020 indican el padecimiento de leishmaniasis visceral en un individuo de Guerrero y 120 casos nuevos de leishmaniasis cutánea distribuidos en nueve estados del país.



Created with mapchart.net ©

Figura 6. Distribución geográfica de Leishmaniasis en México. La población que se encuentra en riesgo de adquirir leishmaniasis en sus diversas formas clínicas se asocia principalmente a tres áreas geográficas: región del Golfo, región del Pacífico y región centro. Mapa elaborado en mapchart.net.

1.4. Ciclo de vida

Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida heteroxeno ya que implica la participación de un vector invertebrado y un hospedero vertebrado (Fig. 7). El ciclo de vida comienza cuando una mosca hembra parasitada, del orden Diptera perteneciente a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, inocular en un vertebrado (entre ellos los humanos) promastigotes metacíclicos que se caracterizan por ser organismos unicelulares móviles que poseen un flagelo prominente. Dentro del hospedero, los parásitos son fagocitados por los macrófagos

y experimentan un proceso de diferenciación celular hacia la forma amastigote en los fagolisosomas. En el interior de este organelo, *Leishmania* se reproduce activamente por fisión binaria. Posteriormente, se alcanza un límite de protozoos intramacrofágicos que ocasiona la lisis celular, por consiguiente, los amastigotes son liberados y tienen la capacidad de infectar células circundantes. El ciclo continúa cuando una mosca ingiere sangre infectada y los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos en diferentes sitios del intestino del díptero, donde experimentan múltiples rondas de replicación por fisión binaria. Los parásitos migran a la probóscide del insecto y sufren una nueva alteración morfológica hacia el estadio infeccioso promastigote metacíclico. Cuando la mosca se alimenta de un nuevo hospedero le transmite esta forma patógena de *Leishmania* (Alemayehu y Alemayehu. 2017; Bañuls et al., 2007; Pérez-Arellano et al., 2010).

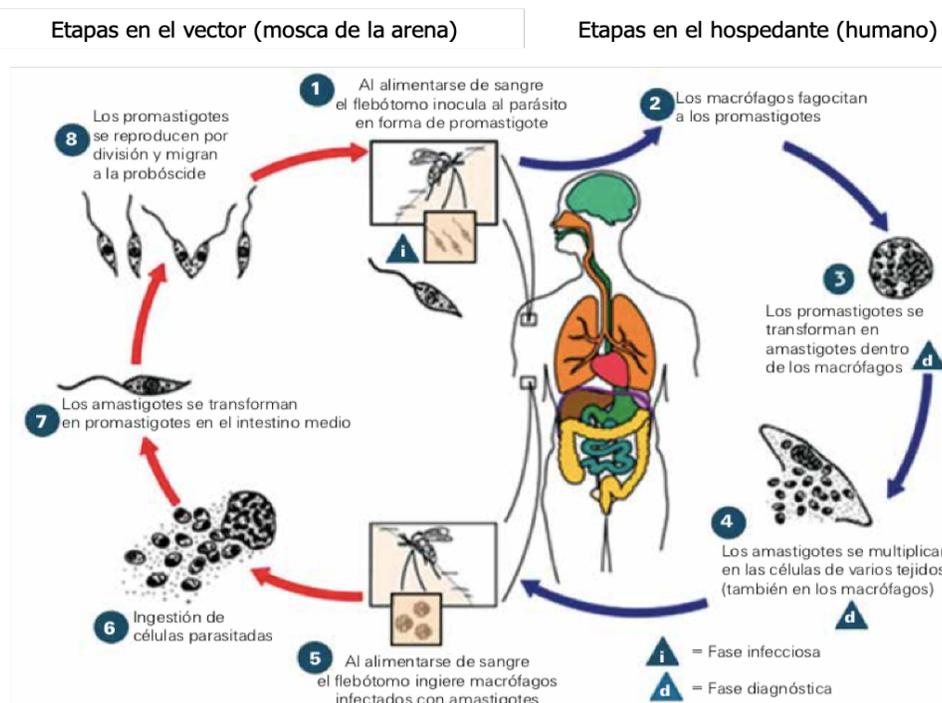


Figura 7. Esquema del ciclo de vida de *Leishmania* spp. Modificado y recuperado de CDC, 2017.

1.5. Biología de *Leishmania*

La secuenciación del genoma de *T. brucei* (cepa 927), *T. cruzi* (CL Brener) y *L. major* (Friedlin) ha proporcionado importantes conocimientos sobre la biología de los tripanosomátidos y también permitió realizar comparaciones del contenido y la

arquitectura de los tres genomas. De estos estudios se dilucidó un nivel sorprendente de sintenia (conservación en el arreglo génico del DNA nuclear) y la identificación de un núcleo de aproximadamente 6200 genes que está conservado en estas especies (Choi & El-Sayed, 2012). El genoma de *Leishmania* consta de 34 megabases (Mb) que están distribuidas en 36 cromosomas de diferente tamaño (de 0.3 Mb a 2.5 Mb) (Myley et al., 1999). El análisis de la secuencia de *L. major* (cepa Friedlin), por medio de algoritmos, indicó la presencia de 911 genes de RNA, 39 pseudogenes y 8272 genes codificadores de proteínas, los cuales están separados por regiones intergénicas relativamente cortas (longitud media de 2045 pb) (Ivens et al., 2005; Padilla-Mejía et al., 2013). En *Leishmania*, como en otros tripanosomátidos, el genoma se organiza en unidades policistrónicas largas, en donde decenas de genes están dispuestos secuencialmente en una misma cadena de DNA y orientados de manera divergente o convergente (Monnerat et al., 2004).

En contraste con la mayoría de los organismos eucariotas, los miembros de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* llevan a cabo la **transcripción del DNA de manera policistrónica** (Fig. 8) para generar transcritos primarios largos que contienen información para la síntesis de todas sus proteínas (Martínez-Calvillo et al., 2010). El procesamiento de estos precursores de mRNA se logra mediante **splicing en trans** (Fig. 8), un mecanismo por el cual al extremo 5' de cada pre-mRNAs se le adiciona una secuencia de 39 nucleótidos denominada miniexón o *spliced leader* que aporta la estructura 5'-cap característica de mRNAs maduros (Martínez-Calvillo et al., 2010). El splicing en *trans* involucra una reacción de transesterificación de dos pasos, análoga al empalme en *cis* pero formando una estructura en forma de Y en lugar de un intermediario lariat (Liang et al., 2003). Finalmente, la **poliadenilación 3'** (adición de adeninas o una cola poli-A en el extremo 3') permite la formación de los mRNAs maduros (Fig. 8). La incorporación de estas modificaciones específicas a los extremos 5' y 3' del pre-mRNA resultan importantes debido a que evitan la degradación enzimática de este ácido nucleico y permiten su exportación al citoplasma para su traducción (Lodish, 2016).

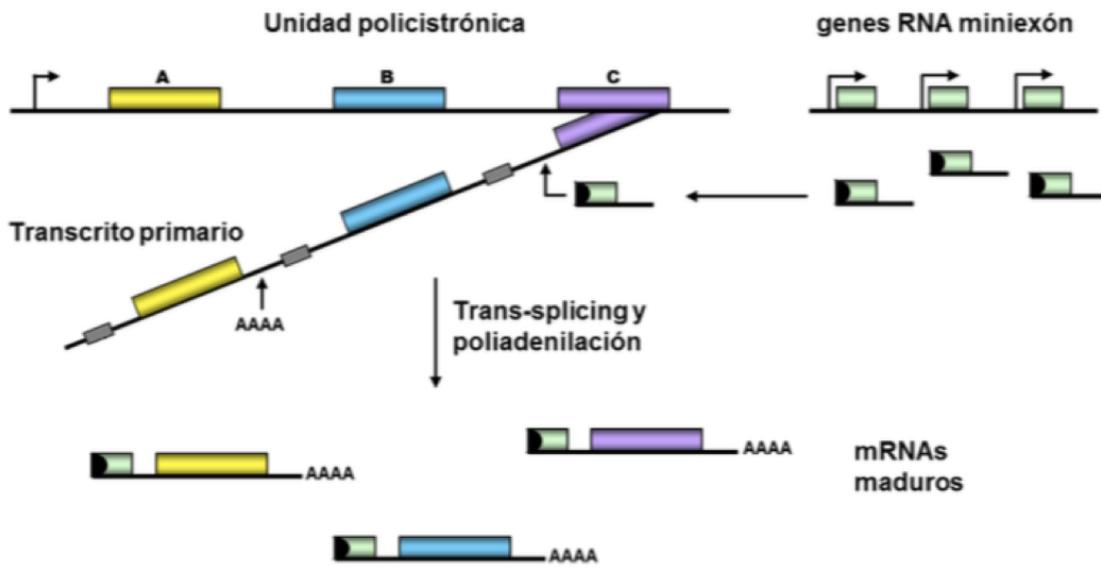


Figura 8. Transcripción policistrónica, splicing en *trans* y poliadenilación en tripanosomátidos. Recuperado de Martínez-Calvillo et al., 2012.

Diversas especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* presentan una característica poco común en la biogénesis ribosomal, la **polifragmentación del gen del rRNA 28S** en dos especies de rRNA grandes (24S α y 24S β) y en cuatro moléculas pequeñas (sr1, sr2, sr4 y sr6). De manera interesante, algunos cistrones ribosomales de *L. major* presenta dos copias de sr4, el significado biológico de esta duplicación aún no ha sido determinado. Las regiones codificantes de la unidad ribosomal se encuentran alternadas por siete espaciadores internos que formarán parte del rRNA precursor (Martínez-Calvillo et al., 2019). Tomando en consideración una situación haploide, en el genoma de *L. major* fueron identificadas ~12 copias del rDNA, que se encuentran orientados cabeza-cola en tándem en el cromosoma 27.

Por lo anterior, se puede reconocer que los tripanosomátidos son eucariontes relevantes dignos de estudio. En nuestro grupo de trabajo existe interés en la descripción de los factores proteicos nucleolares que estén involucrados en la generación de las especies maduras del rRNA de *L. major*.

1.6. Nucléolo

El nucléolo es un cuerpo nuclear que se encuentra en todas las células eucariotas descritas hasta el momento. Su función principal, la biogénesis ribosomal, parece estar conservada en animales, plantas y levaduras. La síntesis de las subunidades ribosomales es un proceso vectorial, complejo, que incluye la transcripción del DNA ribosomal (rDNA), el procesamiento y la modificación química del precursor ribosomal (pre-rRNA) además del ensamblaje de las especies maduras 18S, 5.8S y 25/28S rRNA con un set numeroso de proteínas y el 5S rRNA en las pre-subunidades menor y mayor que formarán los ribosomas citosólicos (Stępiński, 2018).

La primera descripción del nucléolo se atribuye a Gabriel Gustav Valentin en 1836, sin embargo, 100 años después hubo un progreso en el estudio de este organelo a partir de los hallazgos realizados por Barbara McClintock. En 1934, esta investigadora demostró que el nucléolo de células de *Zea mays* se ensambla alrededor de las regiones organizadoras nucleolares (NORs). Se ha reportado en organismos que condensan la cromatina durante la metafase, que las NORs se encuentran en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (Farley et al., 2015). Posteriormente se observó que las NORs están compuestas por decenas, cientos o miles de copias de rDNA arregladas en tándem y de abundantes proteínas nucleolares (Boisvert et al., 2007). El análisis ultraestructural del nucléolo indicó que en los eucariontes este cuerpo nuclear está compartimentalizado y, dependiendo de la especie, puede presentar dos o tres dominios morfológica y funcionalmente diferentes. En algunos eucariontes de divergencia tardía, el nucléolo tiene una organización tripartita compuesta por los centros fibrilares (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC). Los FC son estructuras circulares claras que están enriquecidas con rDNA y proteínas de la maquinaria de síntesis de rRNA, como la RNA polimerasa I (RNA pol I), topoisomerasa I y el factor de unión río arriba UBF (*upstream binding factor*) (Tsekrekou et al., 2017). Los FC se encuentran rodeados por el DFC, que consiste en el pre-rRNA y los factores que

lo procesan. Los FC y DFC se encuentran incrustados en el GC, región donde se realiza la maduración tardía del rRNA y se concentran las pre-subunidades ribosomales que saldrán al nucleoplasma. Al ser el GC el dominio mayoritario, dicta la forma general del nucléolo (Fig. 9A) (Tsekrekou et al., 2017; Schöfer y Weipoltshammer, 2018).

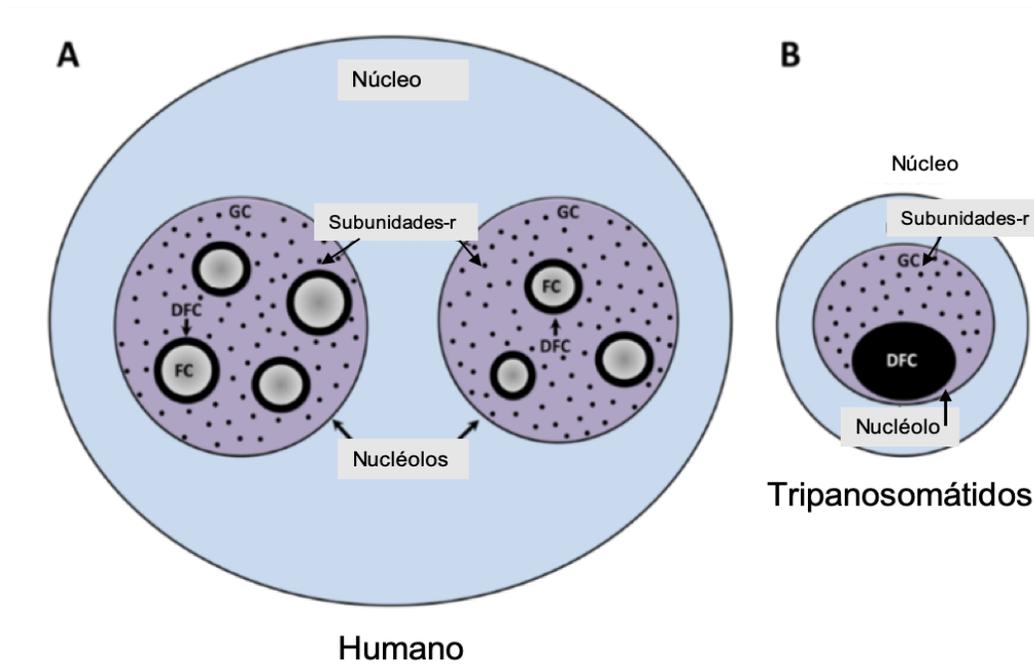


Figura 9. Representación esquemática del nucléolo en humanos (A) y tripanosomátidos (B). En humanos, el núcleo muestra nucléolos con organización tripartita, constituida por el componente granular (GC), centros fibrilares (FCs) y componentes fibrilares densos (DFCs). Las células de tripanosomátidos poseen un nucléolo bipartito, construido por GC y DFC. Modificado de Martínez-Calvillo et al., 2019.

En otro grupo grande de eucariontes el nucléolo se ensambla como una estructura bipartita formada por el DFC y el GC, pues no existe evidencia contundente que indique la presencia de FCs. El modelo de nucléolo bipartito ha sido reportado en protozoos, levaduras, células de invertebrados, peces y anfibios (Thiry et al., 2011; Martínez-Calvillo et al., 2019). Este tipo de arquitectura nucleolar fue descrita utilizando el microscopio electrónico de transmisión en *T. brucei* (Ogbadoyi et al., 2001), en *T. cruzi* (López-Velázquez et al., 2005) y en *L. major* (dato no publicado) (Fig. 10). En estos organismos, el nucléolo se ensambla como

un cuerpo nuclear fibrogranular, único, esférico, con un GC prominente y ligeramente polarizado hacia un extremo del núcleo (Fig. 9B y 10) (Nepomuceno-Mejia et al., 2010; 2016).

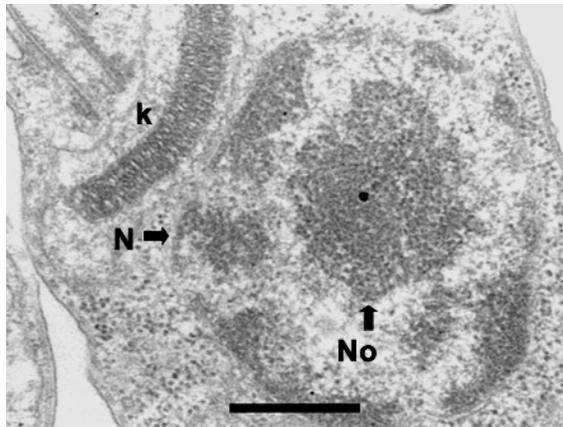


Figura 10. Micrografía electrónica de transmisión de un epimastigote de *T. cruzi*. Dentro del núcleo (N) se observa un nucléolo (No) bipartito con un componente granular mayoritario. k, cinetoplasto. Barra = 0.5 µm. Modificado de Nepomuceno-Mejía et al., 2016.

1.7. Biogénesis ribosomal

El ribosoma eucariota consta de dos subunidades diferentes formadas por la asociación intrincada de decenas de proteínas ribosomales (RP) con cuatro especies de rRNA distintas. La subunidad ribosómica menor o 40S está formada por el rRNA 18S asociado con 33 RPs y la subunidad mayor o 60S se ensambla por la interacción de los rRNA 5.8S y 25S/28S (generados por la RNA pol I en el nucléolo) con el 5S rRNA (sintetizado por la RNA pol III en el nucleoplasma) y con al menos 46 RPs. La producción de esta maquinaria molecular es un proceso complejo que consume una gran cantidad de la energía celular, requiere el ensamblaje coordinado de los productos generados por las tres RNAs polimerasas, la exportación a través de los poros nucleares y la maduración final en el citoplasma (Henras et al., 2014).

La biogénesis de las subunidades ribosómicas inicia con la transcripción del rDNA competente por la RNA Pol I en la porción fibrilar del nucléolo. Para realizar la síntesis del precursor ribosomal policistrónico se requiere la unión de UBF a un

elemento de control río arriba y al promotor del rDNA, ambas secuencias forman parte del espaciador intergénico que separa unidades de transcripción ribosomal adyacentes. La presencia de UBF en el promotor ribosomal produce el reclutamiento de SL1 -compuesto por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y varios factores asociados a TBP (TAFs)- así como la formación de un complejo de preinicio estable que resulta atractivo para la RNA pol I (Fig. 11) (Dubois y Boisvert, 2016). Posteriormente, esta polimerasa y otros factores de transcripción específicos como RRN3 y la topoisomerasa I y II α producen un pre-rRNA (Kopp et al., 2007). De manera paralela, en el nucleoplasma la RNA Pol II sintetiza los mRNAs de cada RP y de otros factores de procesamiento. Además, la RNA Pol III se encarga de generar el rRNA 5S (Núñez-Villacís et al., 2018).

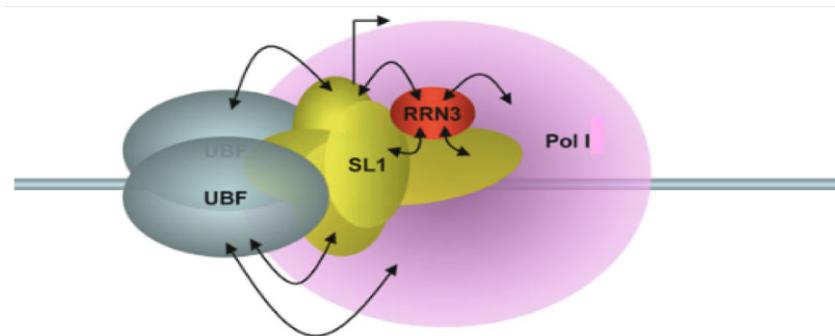


Figura 11. La RNA Pol I y el complejo de preiniciación. La transcripción catalizada por la RNA Pol I requiere del ensamblaje de factores de transcripción específicos denominados SL1 y UBF en el promotor de rRNA. Igualmente, se llevan a cabo varias interacciones proteína-proteína (flechas negras) que favorecen el adecuado ensamblaje del PIC. Recuperado de Goodfellow y Zomerdijk, 2013.

En tripanosomátidos no se han identificado ortólogos de los factores de transcripción SL1, UBF y RRN3. Sin embargo, en *T. brucei* se caracterizó un factor de iniciación de la transcripción de unión al promotor basal para la RNA Pol I denominado CIFTA (Brandenburg et al., 2007). También, se ha descrito que *T. brucei* y *L. major* contienen la proteína nucleolar Elp3b, un factor de elongación importante en el control de la transcripción de los genes del rRNA catalizada por la RNA Pol I (Nguyen et al., 2014; Martínez-Calvillo et al., 2019).

En el genoma de los eucariontes se pueden encontrar unas pocas (*L. major*), cientos (humano) o hasta miles (plantas) de copias de rDNA que están dispuestas como reiteraciones génicas arregladas en tándem separadas una de otra por espaciadores intergénicos (Fig. 13) y que pueden estar localizadas en uno o en varios cromosomas (Russell y Zomerdijk, 2005). La transcripción del rDNA genera un transcrito primario policistrónico que contiene las secuencias de los rRNA 18S, 5.8S y 28S, separadas por espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y flanqueadas por espaciadores transcritos externos en ambos extremos (5' - ETS y 3' - ETS) (Fig. 12) (Farley et al., 2015).

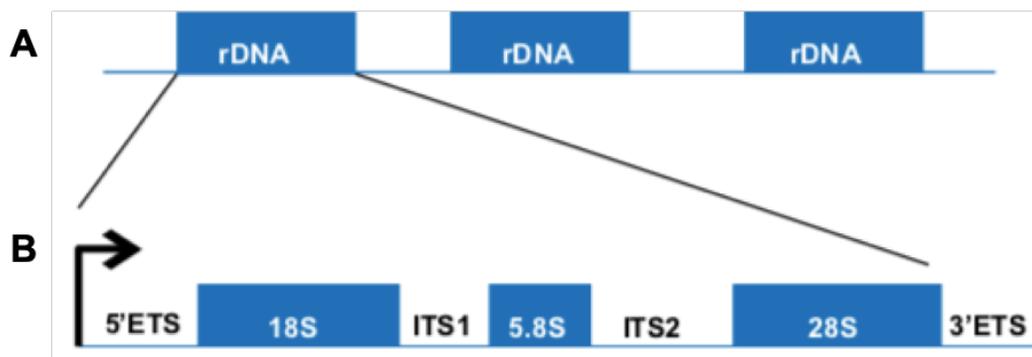


Figura 12. Genes ribosomales y transcrito ribosomal primario. A) Arreglo en tándem de tres cistrones ribosomales. B) Pre-rRNA (35-47S) que contiene los rRNA 18S, 5.8S y 25/28S flanqueados por espaciadores transcritos externos (5'-ETS and 3'-ETS) y espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Modificado de Faley et al., 2015.

Las especies de los rRNA 18S, 5.8S y 25/28S maduras son liberadas después del procesamiento del pre-rRNA. Una vez que el transcrito primario está disponible, sirve de sustrato para una multitud de enzimas como endonucleasas y exonucleasas, y también para partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleolares (snoRNPs) canónicas como U3, U8, U13, U14 y U17 o no canónicas como la RNasa MRP (Henras et al., 2015; Ojha et al., 2020). La actividad coordinada de estas moléculas genera una serie de cortes nucleolíticos para remover de manera secuencial todos los ETS e ITS. Como parte del proceso de maduración, el pre-rRNA es modificado químicamente en el nucléolo, núcleo o citoplasma por distintas

enzimas o por familias de snoRNPs. Se ha descrito que la alteración covalente de ribonucleótidos contribuye a la estabilización de la estructura del ribosoma y favorece una eficiente síntesis de proteínas (Sloan et al., 2017). Las especies individuales de rRNA ribosomal son ensambladas en las dos pre-subunidades 40S y 60S, abandonan el nucléolo y experimentan procesos adicionales de maduración en el nucleoplasma antes de ser exportadas al citoplasma, donde finalmente alcanzan su madurez (Fig. 13) (Henras et al., 2012).

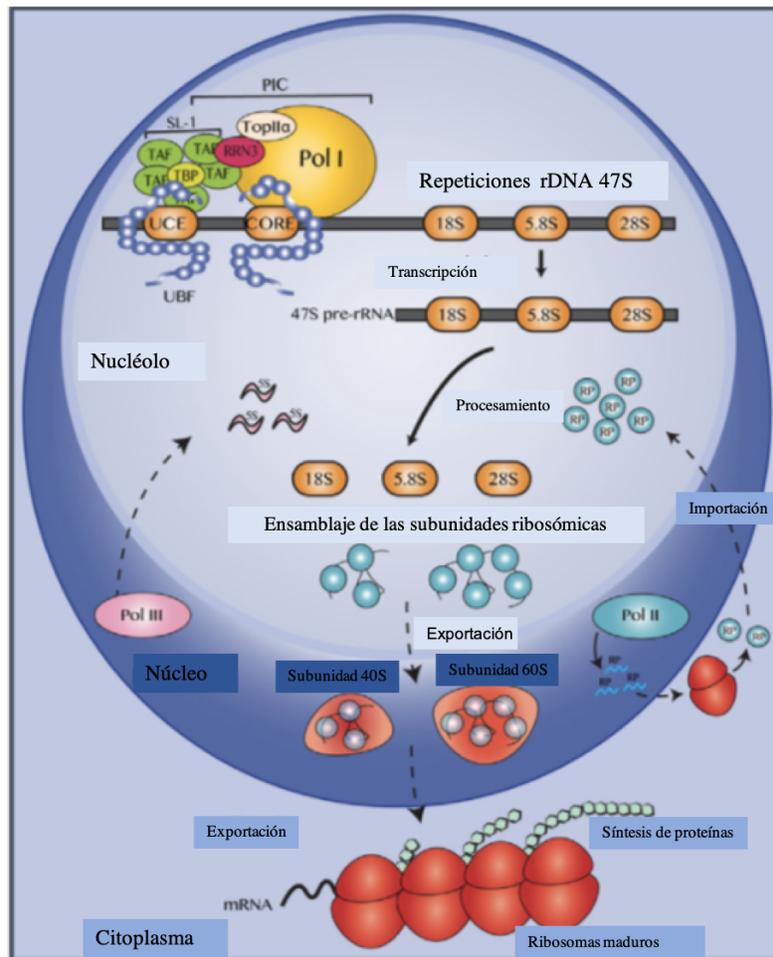


Figura 13. Representación esquemática de la biogénesis de ribosomas en eucariontes. La biogénesis ribosomal ocurre principalmente en el nucléolo, a partir de la transcripción activa de las repeticiones de rDNA. Para que ocurra la transcripción del pre-rRNA 47S se debe formar el complejo de preiniciación (PIC). El rRNA sintetizado se procesa para producir los rRNA maduros 28S, 18S y 5.8S. Finalmente, los rRNA se ensamblan y forman las subunidades ribosómicas pre-40S y pre-60S que se exportan al citoplasma para generar los ribosomas 80S maduros. Modificado y recuperado de Núñez-Villacís et al., 2018.

De manera general, en levaduras y mamíferos el procesamiento del pre-rRNA comienza con cortes en el sitio 5'-ETS en la posición A0, seguido de cortes consecutivos en los sitios A1 y A2 localizados en el ITS1, esto ocasiona que se elimine el espaciador transcrito externo 5'-ETS y la separación de los precursores 18S (subunidad menor o SSU) y 27S (subunidad mayor o LSU). El procesamiento de LSU se lleva a cabo con cortes en las posiciones C1 y C2, presentes en el ITS2 con el objetivo de generar los rRNAs 5.8S y 25/28S individuales (Michaeli, 2012). La situación en *Leishmania* y otros tripanosomátidos es diferente, en estos organismos el LSU se procesa de forma única y compleja, como producto de las reacciones endonucleolíticas se generan dos fragmentos grandes de 1900 nt (24S α) y 1600 nt (24S β), así como cuatro fragmentos de rRNA pequeños de aproximadamente 70 a 220 nt, conocidos como γ , δ , ϵ y ϵ en *Leishmania* o sr1, sr2, sr6 y sr4 en *Trypanosoma* (Fig. 14) (Campbell et al., 1987).

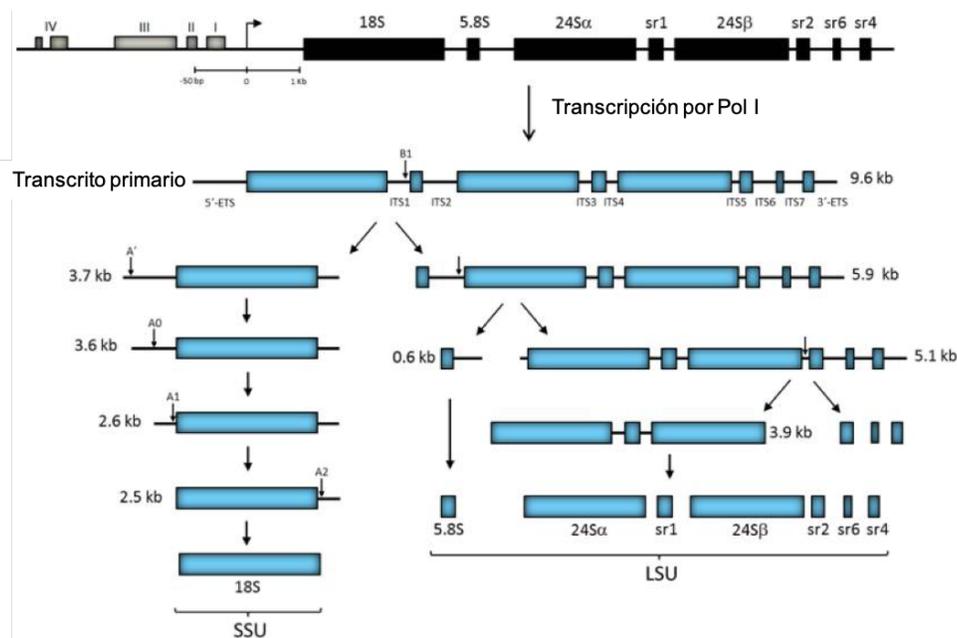


Figura 14. Esquema general del procesamiento del transcrito ribosomal primario en tripanosomátidos. En la parte superior se ilustra una copia del gen de rRNA. Los dominios (I-IV) forman parte de la región promotora y en color negro se muestran los módulos codificantes de las ocho especies de rRNA. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. La RNAPol I genera un transcrito primario ribosomal que es procesado para liberar los distintos rRNAs maduros, que conforman la SSU (18S) y la LSU (5.8S, 24S α , sr1, 24S β , sr2, sr4 y sr6). Modificado y recuperado de Martínez-Calvillo et al., 2019.

1.7.1. snoRNPs y el procesamiento del rRNA

Además de la eliminación de cada espaciador transcrito, el precursor ribosomal experimenta una serie de alteraciones químicas en residuos particulares. La gran mayoría de modificaciones que presenta el rRNA son la pseudouridilación y la 2'-O-metilación. Existen diferentes clases de complejos que están asociados con los cambios postranscripcionales del rRNA, dentro de los que contienen RNA, están incluidas las snoRNPs (Klinge y Woolford, 2019). En eucariontes, las snoRNPs están compuestas por un RNA pequeño nucleolar (snoRNA), guía, no codificante asociado con cuatro proteínas esenciales que se conservaron a lo largo de la evolución. Los snoRNA han sido agrupados en distintas familias con base en elementos de secuencia distintivos como snoRNA caja C/D o caja H/ACA (Fig. 15). Los snoRNA hibridan transitoriamente con el pre-rRNA por complementariedad de bases, para posicionar correctamente a la enzima responsable de modificar los ribonucleótidos blanco (Dieci et al., 2009). Los snoRNPs caja H/ACA (Fig. 15A) contienen las proteínas Nhp2, Nop10, Gar1 y la pseudouridina sintasa Cbf5 (Diskerina en humanos), enzima que produce la isomerización de uridina a pseudouridina (Massenet et al., 2017; Ojha et al., 2020).

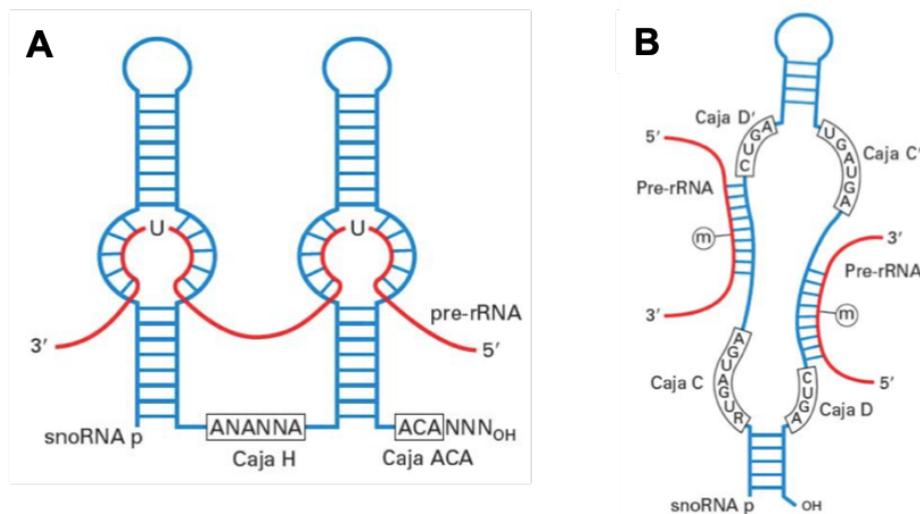


Figura 15. Tipos de snoRNA que guían la modificación del pre-rRNA. A) snoRNA H/ ACA se pliegan en tallo-bucle y presentan ciertas regiones que contienen cadenas sencillas internas donde el pre-rRNA se hibrida para llevar a cabo la pseudouridilación. B) snoRNA caja C/D está involucrado en la 2'-O- metilación de ribosa y dos secuencias de este snoRNA se hibridan en dos regiones distintas en el pre-rRNA para llevar a cabo la metilación. Retomado de Lodish et al., 2016.

La reacción de metilación del grupo hidroxilo 2' de la ribosa de algunos residuos del pre-rRNA es realizada por snoRNPs caja C/D. El snoRNA contenido en esta partícula posee dos motivos conservados, la secuencia 5'-RUGAUGA-3' (caja C; donde R es una purina) y 5-CUGA-3' (caja D), próximos a los extremos 5' y 3', respectivamente (Fig. 15B). En la región central del snoRNA están presentes dos copias (idénticas o no) referidas como cajas C' y D' (Fig. 15B). En conjunto, las cajas C, C', D y D' sirven como sitios de unión para las proteínas 15.5 kDa (Snu13), Nop56, Nop58 y la metil transferasa Fibrilarina (Nop1 en levaduras), enzima que utiliza al cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) como donador del grupo metilo para transferirlo al rRNA (Fig. 16A). En snRNPs caja C/D de Arqueas, Nop5 reemplaza al heterodímero formado por Nop56 y Nop58 (Fig. 16B) (Quinternet et al., 2016; Liang et al., 2019; Kiss-László et al., 1996; Shubina et al., 2016).

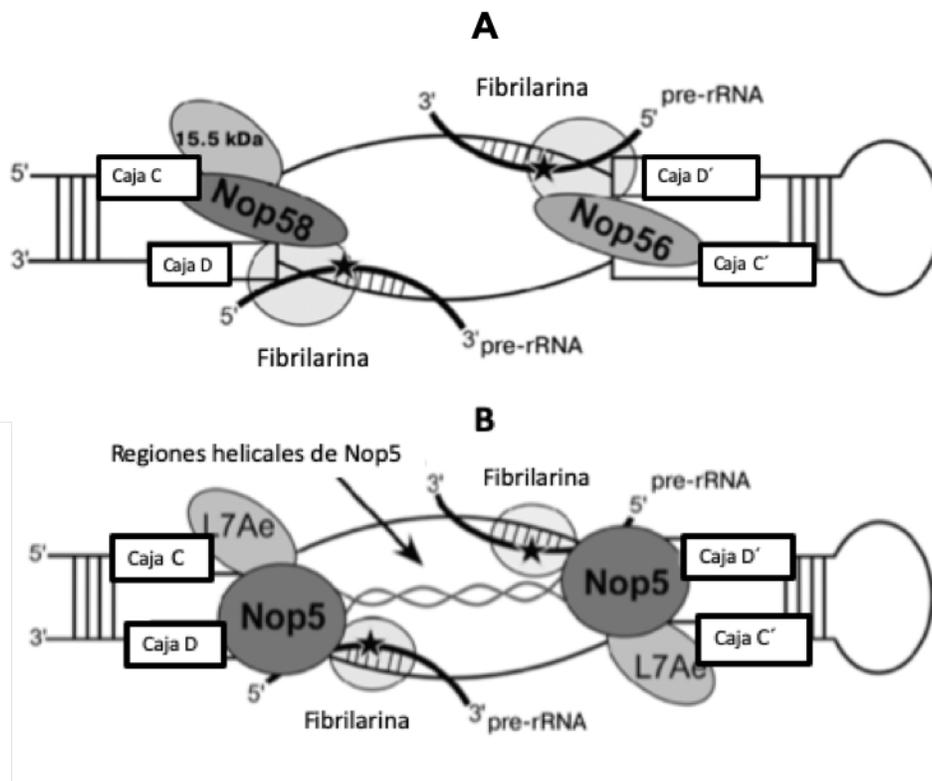


Figura 16. Estructura general de los snoRNPs caja C/D. A) En eucariotes los snoRNPs contienen un snoRNA, dos copias de 15.5kDa y de Fibrilarina y una versión de Nop56 y una de Nop58. B) En Arqueas el heterodímero Nop56/Nop58 es reemplazado por el homodímero Nop5. Recuperado de Shubina et al., 2016.

1.7.2. Fibrilarina

Fibrilarina es una proteína esencial que se ha conservado a lo largo de la evolución, pues está distribuida desde las Arqueas hasta los seres humanos. En eucariontes, esta enzima se concentra en la zona fibrilar del nucléolo donde se realiza la transcripción y el procesamiento temprano del pre-rRNA (Ochs et al., 1985). Adicionalmente, se ha demostrado que Fibrilarina se localiza en el interior de los cuerpos de Cajal, estructuras nucleares donde se modifican y ensamblan algunos componentes del spliceosoma (Raska et al., 1990). Fibrilarina está involucrada en la metilación y en el procesamiento del pre-rRNA (Tollervey et al., 1993), además de participar en la regulación de la transcripción del rDNA al metilar la histona H2A en el nucléolo (Tessarz et al., 2014).

En una diversidad de organismos, Fibrilarina tiene una masa molecular que oscila entre los 30 y los 40 kDa y está compuesta por alrededor de 300 aminoácidos. Esta proteína nucleolar posee dominios estructurales conservados y diferentes (Fig. 17). En humanos, fue descrito que dentro de la región amino terminal se localiza una secuencia rica en glicinas y argininas (GAR), en la parte central de la molécula está un motivo de unión al RNA (RB) y en el extremo carboxilo se encuentra un dominio α -helicoidal (Aris y Blobel, 1991). Se han identificado dos secuencias espaciadoras inter dominios (Sp1 y Sp2) cuya función aún no se conoce con precisión (Fig. 18). Es deseable destacar que los dominios RB y el α -helicoidal constituyen el dominio de metil transferasa (Fig. 18).

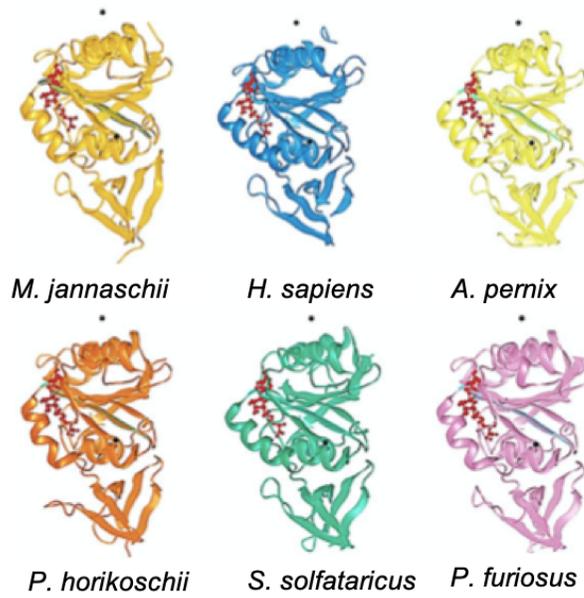


Figura 17. La estructura secundaria y tridimensional de Fibrilarina presenta un alto nivel de conservación desde arqueas hasta humanos. Recuperado de Rodríguez-Corona et al., 2017.

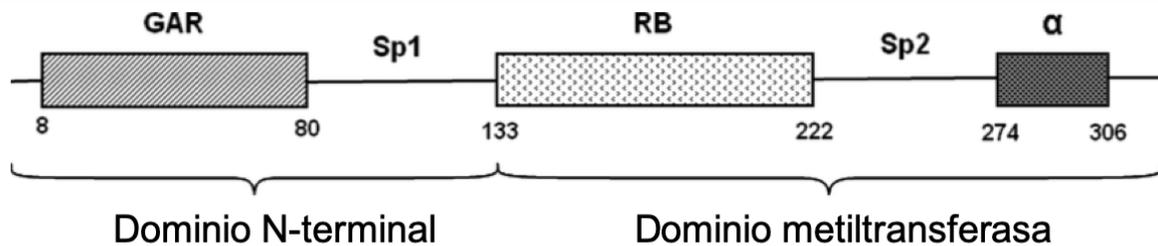


Figura 18. Conformación de la molécula de Fibrilarina en humanos. En el amino terminal de Fibrilarina se encuentra la región rica en glicina y arginina (GAR), además está presente el dominio metil transferasa que abarca el resto de la proteína. Recuperado de Shubina et al., 2016.

1.8 Purificación por afinidad en tándem

La purificación por afinidad en tándem se ha desarrollado como una herramienta eficaz para el aislamiento de complejos proteicos de interés. Inicialmente fue empleada para levaduras pero ha sido aplicada con éxito a otros organismos, incluidos los tripanosomátidos. Para realizar esta metodología, la proteína de estudio debe ser fusionada con un péptido de extracción conocido como

PTP-tag, para posteriormente expresarse en el organismo bajo investigación y entonces, interactuar y formar complejos moleculares que serán aislados por cromatografía de afinidad en tándem. Para este fin son empleadas dos matrices diferentes que reconocen distintos epítopes estructurales de la bandera PTP. La arquitectura del PTP-tag está compuesta por dos epítopes adyacentes de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (**Prot A**), un sitio de escisión para la proteasa del virus del tabaco **TEV** y una secuencia de 12 aminoácidos de la proteína C (**Prot C**) hepática de humano (Fig. 19). La etiqueta **PTP-tag** ha permitido aislar una diversidad de complejos proteicos de *T. brucei* (Schimanski et al., 2005) y de *L. major* (Florencio-Martínez et al., 2021).

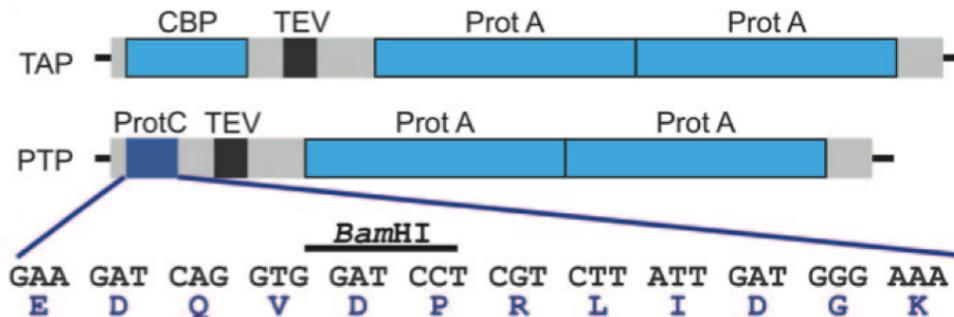


Figura 19. Esquema de la etiqueta PTP. Esta bandera molecular está formada por un epítipo de 12 aminoácidos de Prot C de humano, un sitio de corte para la proteasa TEV y dos secuencias de la proteína A de *S. aureus*. Es ilustrada la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del epítipo Prot C. Se indica un sitio de restricción para la endonucleasa *Bam*HI. Recuperado de Schimanski et al., 2005.

1.9 Antecedentes

La biogénesis de las subunidades ribosomales es un proceso vital para todos los organismos. La metil transferasa Fibrilarina es una componente importante que participa activamente en la maduración del rRNA. En diversos tripanosomátidos se ha demostrado la presencia de Fibrilarina como parte del proteoma nucleolar (Dunbar et al., 2000; Guerrero-Sánchez et al., 2015). El análisis de la secuencia primaria de aminoácidos indicó que esta enzima porta los dominios conservados GAR y metil transferasa que se han caracterizado en ortólogos de otras especies de eucariontes. En extractos totales de células procíclicas de *T. brucei* se realizaron

ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos dirigidos contra Fibrilarina, y se observó que este tripanosomátido posee al menos 30 snoRNA asociados con esta enzima. De este total, fueron caracterizados y nombrados 17 (TBR1-17). La secuenciación de estos RNA demostró la presencia de las cajas C, D, C' y D', elementos de secuencia conservados en los snoRNA de caja C/D de otros organismos (Dunbar et al., 2000). A partir de algoritmos, se hizo la predicción de que 15 de los 17 snoRNA estudiados cumplen con la función de metilación de la 2'-O-ribosa del rRNA.

De manera interesante, se demostró que Fibrilarina resulta ser una molécula esencial para el crecimiento celular, debido a que en *T. brucei* el silenciamiento de Fibrilarina por la vía del RNA de interferencia produce defectos severos de procesamiento y modificación del rRNA, conduciendo a la muerte del parásito (Barth et al., 2007). En estudios realizados en epimastigotes de *T. cruzi* se reportó que Fibrilarina está codificada por dos genes (TcFib 1 y TcFib 2). Las versiones fluorescentes de Fibrilarina se concentran en el nucléolo de las células transfectadas (Guerrero- Sánchez et al., 2015).

Dentro del laboratorio al que pertenezco existe el interés de identificar proteínas involucradas en la metilación del rRNA de *L. major*. Con este objetivo y haciendo un análisis *in silico* del genoma de este parásito, encontramos que la Fibrilarina (LmFib) está representada por dos versiones alélicas, una localizada en el cromosoma 19 (ID: LmjF.19.0100) y la otra en el 36 (ID: LmjF.36.3070). La expresión del primero de estos genes produce una proteína de 297 aminoácidos (aa) con una masa molecular de 31 kDa; por su parte, el producto del segundo alelo es una molécula de 298 aa con una masa de 31.4 kDa.

Por la importancia que tiene esta metil transferasa en todas las células descritas al momento, nosotros realizamos la caracterización molecular de Fibrilarina en promastigotes de *L. major*. Con base en lo anterior, se obtuvo una línea celular de *L. major* que expresa la proteína recombinante LmFib acoplada a una etiqueta PTP (LmFib-PTP). Posteriormente, por cromatografía de afinidad en tándem se identificaron proteínas que se asocian con Fibrilarina. Estos datos obtenidos contribuirán a generar conocimiento básico para entender con mayor precisión la maduración de las especies ribosomales en parásitos tripanosomátidos.

2. Objetivos

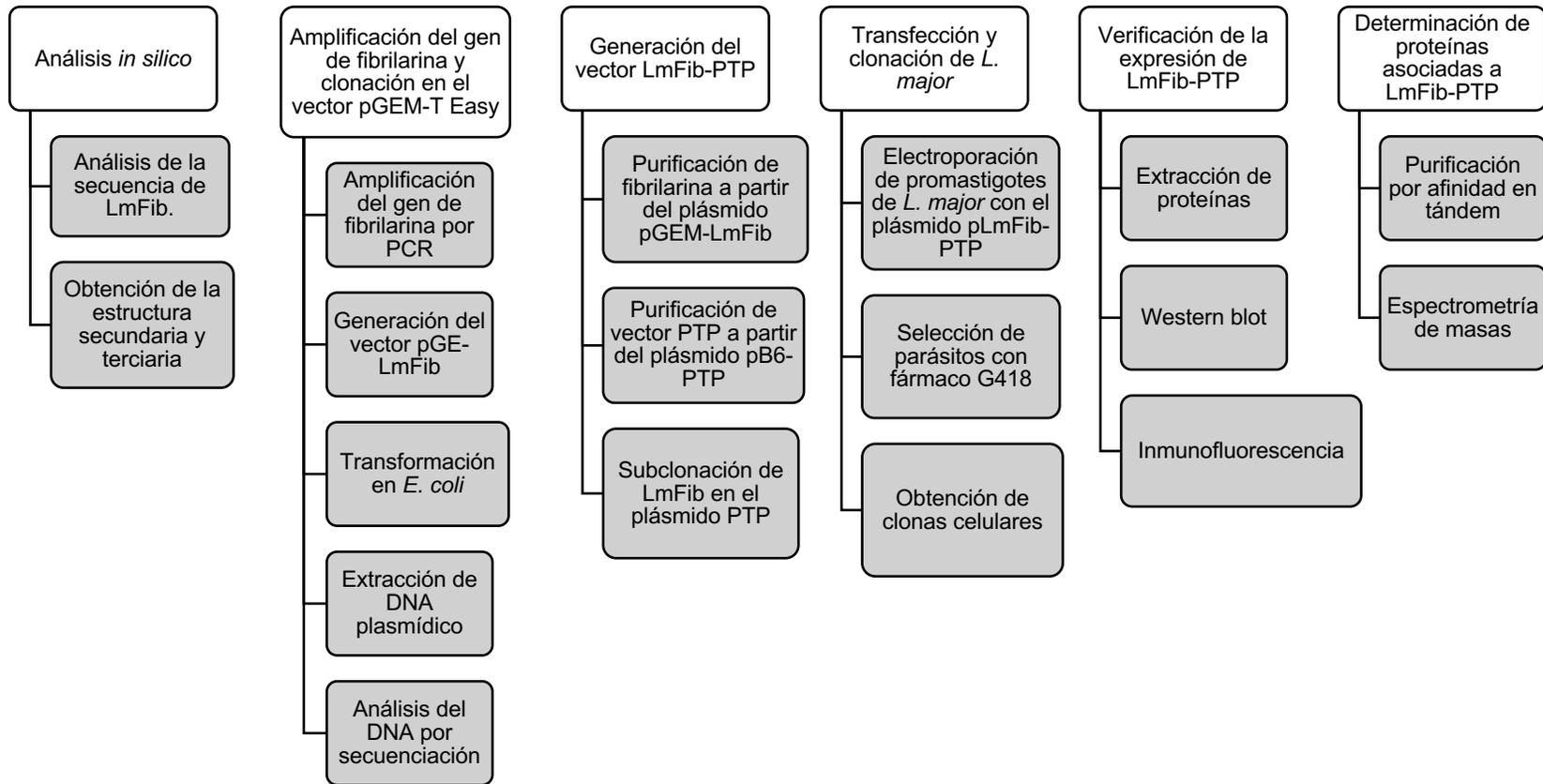
2.1. Objetivo general

- Caracterizar la enzima Fibrilarina de promastigotes de *Leishmania major*.

2.2. Objetivos particulares

- Analizar *in silico* la secuencia de aminoácidos de LmFib.
- Generar líneas celulares que expresen la proteína LmFib-PTP.
- Evaluar la expresión de la proteína LmFib-PTP.
- Determinar la localización subcelular de LmFib-PTP.
- Identificar las proteínas que interaccionan *in vivo* con LmFib-PTP.

3. Estrategia experimental



4. Materiales y métodos

4.1. Análisis *in silico*

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la enzima Fibrilarina de *L. major* y de *Trypanosoma brucei* fue obtenida de la base de datos del genoma de los tripanosomátidos (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) y de *Saccharomyces cerevisiae* de <https://www.yeastgenome.org>. Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de Fibrilarina en las distintas especies se realizaron con el servidor clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La predicción de la posible estructura secundaria fue realizada en el programa bioinformático Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). La conservación de dominios funcionales fue parcialmente evaluada con InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Utilizando la herramienta bioinformática Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org>), la cual genera modelados por homología de estructuras proteicas en 3D, y el programa computacional UCSF Chimera se obtuvo el modelo tridimensional predicho de distintas Fibrilarinas, empleando como modelo la estructura 3D de *S. cerevisiae* (SWISS-MODEL Template Library ID: 5wyk.1.C).

4.2. Cultivo y conteo de promastigotes

Promastigotes silvestres (*wild type*) de *L. major* cepa Friedlin fueron cultivados a 28°C en medio líquido BM (medio M199 0.5×, bicarbonato de sodio 1.1 g/l, infusión de cerebro-corazón 0.25×, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 2 mg/l, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0.1 mg/ml y suero fetal bovino al 10%). Las poblaciones y las líneas celulares LmFib-PTP crecieron en medio BM con geneticina (G418). La densidad poblacional se determinó diariamente en una cámara de Neubauer. Los parásitos se mantuvieron en crecimiento logarítmico.

4.3. Obtención del gen LmFib 1 por PCR

Con base en la secuencia de nucleótidos de Lm-Fibrilarina (ID: LmjF.36.3070) fueron diseñados dos oligonucleótidos para amplificar por PCR el gen de esta proteína (un producto de 894 pb en el cual el codón de paro de la traducción fue intencionalmente excluido). Al oligonucleótido sentido 5'-LmFib-*Xma*I-For (5'-ACCCGGGATGCGCGGTGGCTTTGGA) se le adicionó el sitio de corte de la enzima de restricción *Xma*I (CCCGGG). El oligonucleótido antisentido 3' Lm Fib-*Xba*I-Rev (GTCTAGATTGCTTCGACTTCTTGACA) incluía el sitio de corte para la enzima de restricción *Xba*I (TCTAGA). Para realizar las reacciones de PCR se emplearon 100 ng DNA genómico de *L. major wild type*, 1U de Taq polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen), Buffer de reacción 1× (Pfx amplification, Invitrogen), solución enhancer 2× (Invitrogen), una mezcla de dNTPs (10 mM), sulfato de magnesio (MgSO₄, 50 mM) y 10 μM de los dos oligonucleótidos. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Bio-Rad T100 y las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 95°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización (95°C por 30s), alineamiento (58°C a 60°C por 30s) y extensión (72°C por 1 min) y una extensión final a 72°C por 7 min. El producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

4.4. Generación del vector pGE-LmFib.

El gen de Fibrilarina, amplificado por PCR, fue precipitado con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M a -70°C por una hora. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. La pastilla de DNA se resuspendió en 30 μl de agua bidestilada, se fraccionó por electroforesis en agarosa y la banda correspondiente a Lm-Fib fue purificada del gel utilizando el kit PCR clean-up gel extract II (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo del fabricante. Después, el DNA Lm-Fib purificado fue adenilado utilizando 1U de Taq polimerasa (Kapa biosystems), buffer Kapa B Taq 1×, 1 μl de dATP (2 mM) en un volumen final de 10 μl, durante 30 minutos a 70°C. 50 ng del producto de Lm-Fib adenilada fue ligado en 50 ng del vector pGEM-T Easy utilizando 1U de la enzima T4 DNA ligasa

(Promega) y buffer de ligación T4 1×, a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente toda la noche a 4°C.

4.5. Transformación de bacterias competentes.

La construcción pGE-LmFib se utilizó para transformar *Escherichia coli* cepa JM109 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se inocularon en LB agar que contenía 100 µl de IPTG (100 mM), 20 µl de Xgal (50 mg/ml) y ampicilina 100 µg/ml. Las bacterias se incubaron a 37°C toda la noche. Tres colonias blancas fueron transferidas a 6 ml de medio LB líquido con ampicilina 100 µg/ml e incubadas a 37°C con agitación vigorosa durante la noche. Después de verificar el crecimiento bacteriano, se llevó a cabo la extracción del plásmido utilizando el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel). pGE-LmFib se caracterizó por medio de análisis de restricción utilizando una mezcla de las enzimas *XbaI-XmaI* y de manera individual *EcoRI* (New England Biolabs). La ausencia de errores en la secuencia de DNA de pGE-LmFib fue confirmada por secuenciación.

4.6. Purificación del inserto LmFib

El plásmido pGEM-LmFib fue digerido simultáneamente con las enzimas de restricción *XbaI* y *XmaI* para liberar el inserto de LmFib. El DNA se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa. La banda de 894 pb fue cortada y el gen LmFib fue purificado utilizando el kit Nucleospin Gel and PCR Clean Up (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.7. Generación del vector pLmFib-PTP

El plásmido pB6-PTP (Moreno-Campos *et al.*, 2016) fue digerido con las enzimas de restricción *XmaI* y *XbaI* y el cuerpo del vector (6.67 Kb) se purificó como se mencionó en la sección previa. Para poder llevar a cabo la subclonación de LmFib en el plásmido PTP, fueron ligados 100 ng del inserto LmFib con 100 ng del vector PTP empleando 1U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega). La reacción se

incubó durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C toda la noche. La construcción resultante pLmFib-PTP se utilizó para transformar *E. coli* cepa DH5 α E (Invitrogen) con el electroporador ECM Electro Cell Manipulator 630 (BTX) sometiendo a las bacterias a un micropulso de 2000 volts, 25 ohms y 25 μ F. Las células transformadas se inocularon en agar LB con ampicilina 100 μ g/ml. Se seleccionaron cuatro clonas positivas, se obtuvo el DNA plasmídico, que fue analizado por análisis de restricción con las enzimas *Xba*I y *Xma*I. Los plásmidos seleccionados se enviaron a secuenciar para confirmar la ausencia de errores en la secuencia y que LmFib haya quedado en marco de lectura correcto con la bandera PTP.

4.8. Purificación del vector pLmFib-PTP

Para poder llevar a cabo la transfección de promastigotes, fue purificado el DNA plasmídico a mediana escala de una de las cuatro clonas obtenidas. Para ello, una asada de la colonia bacteriana seleccionada fue inoculada en 500 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml e incubada durante la noche en agitación a 37°C. El plásmido pLmFib-PTP fue obtenido empleando el kit Nucleobond Xtra Midi Plus (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad del plásmido se rectificó por análisis de restricción empleando las enzimas *Xba*I y *Xma*I y los productos de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

4.9. Transfección *L. major*

Se cultivaron promastigotes de *L. major* hasta la fase media logarítmica (20-25 \times 10⁶ células/ ml). Para realizar la electroporación, 1 \times 10⁸ parásitos fueron cosechados y lavados con PBS-G (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, sacarosa 6 mM). La pastilla celular se resuspendió en buffer cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM) y las células se transfirieron a una celda de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes PlusTM, BTX) y se mezclaron con 25 μ g de DNA plasmídico (LmFib-PTP). Después de incubar en hielo, los

promastigotes recibieron un pulso eléctrico de 1600 V, 25 ohms y 50 μ F utilizando el EMC Electro Cell Manipulator (BTX). Los parásitos transfectados fueron transferidos a tubos cónicos de 50 ml con 10 ml de medio BM, incubados a 28°C toda la noche. La selección de parásitos se realizó utilizando 50 μ g/ml del fármaco G418 (Sigma) 24 h después del pulso. Cuatro días posteriores a la electroporación, se transfirieron 2 ml del cultivo de los tubos cónicos a cajas de cultivo con 3 ml de medio BM y G418. Las células se monitorearon diariamente hasta observar el crecimiento constante de poblaciones transgénicas.

Para la crio-preservación de cada población se cosecharon, por centrifugación, 1×10^8 células creciendo en la fase media logarítmica. Cada pastilla celular se resuspendió en 1 ml de suero fetal bovino con 10% de glicerol y se transfirió a tubos crioviales que se almacenaron a -70°C por 24 h. Después se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido.

4.10. Obtención de clonas celulares

Para obtener clonas celulares a partir de las poblaciones de *L. major* transgénicas, fueron esparcidos 100, 250, 500, 1000 y 2000 parásitos en medio semisólido que contenía agarosa (SeaPlaque GTG, Cambrex) al 0.8% en medio BM, suero fetal bovino al 20% y G418. Los promastigotes se incubaron a 28°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Se monitorearon los cultivos hasta la aparición de colonias, cinco de estas fueron transferidas, de manera individual, a cajas de cultivo de 25 ml con medio BM y G418. Las células fueron mantenidas en agitación suave y a 28°C.

4.11. Extracción de proteínas

Se cosecharon 100 millones de promastigotes LmFib-PTP y *L. major wild type* en fase media logarítmica, fueron lavados con 500 μ l de PBS frío. La pastilla celular se resuspendió en buffer RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas 1 \times).

Las muestras se incubaron en hielo por 30 min y se agitaron vigorosamente cada 5 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 20 min. La fracción soluble se almacenó a -70°C. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford.

4.12. Ensayo Western blot

Aproximadamente 40 µg de extractos proteicos (obtenidos por buffer RIPA) de parásitos LmFib-PTP y *L. major* silvestre se desnaturalizaron empleando buffer Laemmli (Tris-HCl 22 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02%, glicerol 10% y β-Mercaptoetanol 5%). Posteriormente, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas fraccionadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Immun-Blot™ PVDF, BIO-RAD) empleando buffer de transferencia (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, metanol 20%) a 4°C. Al término, los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con una solución de leche (BioRad) en PBS-Tween 20 al 0.05%. La presencia de la proteína LmFib-PTP se analizó utilizando individualmente una serie de anticuerpos primarios dirigidos contra diferentes epitopes de la bandera PTP. Fueron empleados un anti-Proteína A (Sigma), un anti-Proteína C (Delta biolabs) y un anti-Flag (Sigma). Después de lavados exhaustivos, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (BioLegend). Finalmente, el complejo antígeno-anticuerpo se puso de manifiesto por una reacción quimioluminiscente empleando el kit Immobilon Western (Millipore).

4.13. Inmunofluorescencia

Se emplearon parásitos *L. major* Fib-PTP y *L. major wild type* de fase media logarítmica. Las células fueron cosechadas, lavadas con PBS y adheridas a un portaobjetos tratado con Poly-L-Lisina. Posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 min a 4°C. Los promastigotes fueron permeabilizados con 0.1% Tritón X-100 (Sigma) por 5 minutos y los sitios inespecíficos de unión fueron bloqueados con albúmina sérica bovina al 2% por 30

min. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-prot C, anti-prot A y anti-Flag. Como marcador nucleolar se empleó un suero policlonal α -LmNop56. Después de lavar con PBS, los parásitos se trataron con Anti-IgG de conejo y de ratón conjugada con Alexa Fluor 488 o 546 (Molecular Probes). Para teñir el DNA, se añadió VectaShield con DAPI. Las preparaciones fueron analizadas por microscopía de epifluorescencia.

4.14. Purificación por cromatografía de afinidad en tándem

Fueron utilizados tres litros de cultivo de promastigotes LmFib-PTP que alcanzaron la fase media logarítmica. Los parásitos fueron cosechados por centrifugación a 4°C y resuspendidos en una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP40 al 0.1% e inhibidores de proteasas 2 \times (Sigma). Las células se lisaron con 1% de Triton X-100 y fueron mantenidas a 4°C por 20 min. Las muestras se transfirieron a un homogenizador tipo Wheaton para completar la lisis celular, la suspensión resultante fue centrifugada a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y colocado en una columna de cromatografía con una matriz de perlas de sefarosa-IgG (Amersham) en su interior. La interacción se realizó por 4 h a 4°C con rotación suave. Después de una serie de lavados, los complejos proteicos formados fueron digeridos con buffer TEV [KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, EDTA 0.5 mM y 100 U de la proteasa de cisteína del virus del grabado del tabaco (TEV)] durante toda la noche a 4°C y agitación suave. Posteriormente, los complejos proteicos que interaccionaron con las perlas son eluidos y mezclados con una solución amortiguadora que contenía (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, CaCl₂ 3 mM, inhibidores de proteasas). Esta mezcla fue transferida a una columna de cromatografía con una matriz de afinidad α -Prot C (Roche). La interacción proteica se llevó a cabo durante 4h a 4°C con rotación suave. La muestra de interés fue eluida, recuperada en fracciones con 250 μ l de buffer de elución (Tris-HCl 5mM pH 7.7, EGTA 10mM, EDTA 5mM e inhibidores de proteasas al 1 \times). Las proteínas eluidas se concentraron en columnas

Amicon® Ultracell 3K (Millipore) de 0.5 ml y, en una fracción fue analizada en SDS-PAGE y teñida con SYPRO-ruby (Molecular Probes). El extracto proteico sobrante fue concentrado en gel de acrilamida y enviado al servicio de Proteómica y Espectrometría de masas de la Upstate Medical University para la identificación de las proteínas que interaccionan con LmFib *in vivo*.

LmjF.36.3070). Son señalados los residuos conservados (caja negra) y los semiconservados (caja gris) en ambas secuencias. El arreglo de aminoácidos en forma de láminas β plegadas se representa con flechas azules y las α -hélices con rectángulos redondeados de color morado. Cabe señalar que el alineamiento de la secuencia de aminoácidos no es continuo (línea negra). Son indicados los elementos funcionales conservados que han sido identificados en otras Fibrilarinas, con una línea azul la región GAR y el dominio metil transferasa con una línea roja.

Con el análisis de la secuencia de aminoácidos de LmFib fue posible distinguir los motivos conservados y funcionales que han sido descritos en las Fibrilarinas de otras especies, como levadura y humano. Como ocurre en sus ortólogos, en el extremo amino de LmFib está presente la región GAR, que posee una longitud de 54 aminoácidos y está compuesta principalmente por residuos de glicina y arginina (Fig. 20; línea azul). Por otro lado, el dominio metil transferasa (también identificado como dominio Fibrillarín en todos los servidores que fueron consultados), consta de 230 aminoácidos y está dispuesto en el resto de la proteína (Fig. 20, línea roja). En conjunto, estos datos bioinformáticos nos sugieren que las Fibrilarinas de *L. major* son muy parecidas entre sí. Con base en estos resultados se decidió realizar el resto del proyecto estudiando a LmFib 2 (ID: LmjF.36.3070) (que a partir de ahora llamaremos simplemente LmFib).

5.1.1. Comparación de la secuencia de LmFib con su ortólogo en levadura

Las secuencias primarias de LmFib y de Fibrilarina de *S. cerevisiae* (ScFib; ID: P15646) fueron obtenidas y analizadas *in silico*. Las predicciones computacionales indican que LmFib es 63.51% idéntica a la proteína de levadura, un porcentaje de identidad relativamente alto. Se puede observar que la región amino terminal entre las proteínas presenta un mayor grado de variabilidad y que ScFib cuenta con 29 aminoácidos adicionales (Fig. 21). Con base en la estructura secundaria predicha, se observó que hay una similitud importante en el número y la posición de los residuos que forman las α -hélices y las láminas β en la proteína de estas dos especies (Fig. 21). En *L. major*, Fibrilarina está estructurada por siete α -hélices y doce láminas β (Fig. 21, flechas color azul) mientras que en *S. cerevisiae* se encuentran once α -hélices y trece láminas β (Fig. 21, flechas color morado). De

acuerdo con estos resultados, es posible mencionar que, en las dos especies aquí analizadas, la organización dimensional es altamente similar. Esto nos sugiere que Fibrilarina se conservó a lo largo de la evolución (Fig. 22). Finalmente, se llevó a cabo la predicción de la arquitectura tridimensional de LmFib utilizando como templado la estructura de ScFib (PDB ID: 5wyk.1.C) generada por microscopía crioelectrónica (Sun et al., 2017). El modelaje 3D de LmFib reveló un arreglo global bastante parecido al reportado en levadura (Fig. 23). Después de generar un modelo en el que fueron superpuestas estas dos proteínas, fue posible distinguir que la conformación tridimensional exhibida por el dominio metil transferasa es prácticamente idéntica en ambas especies (Fig. 23).

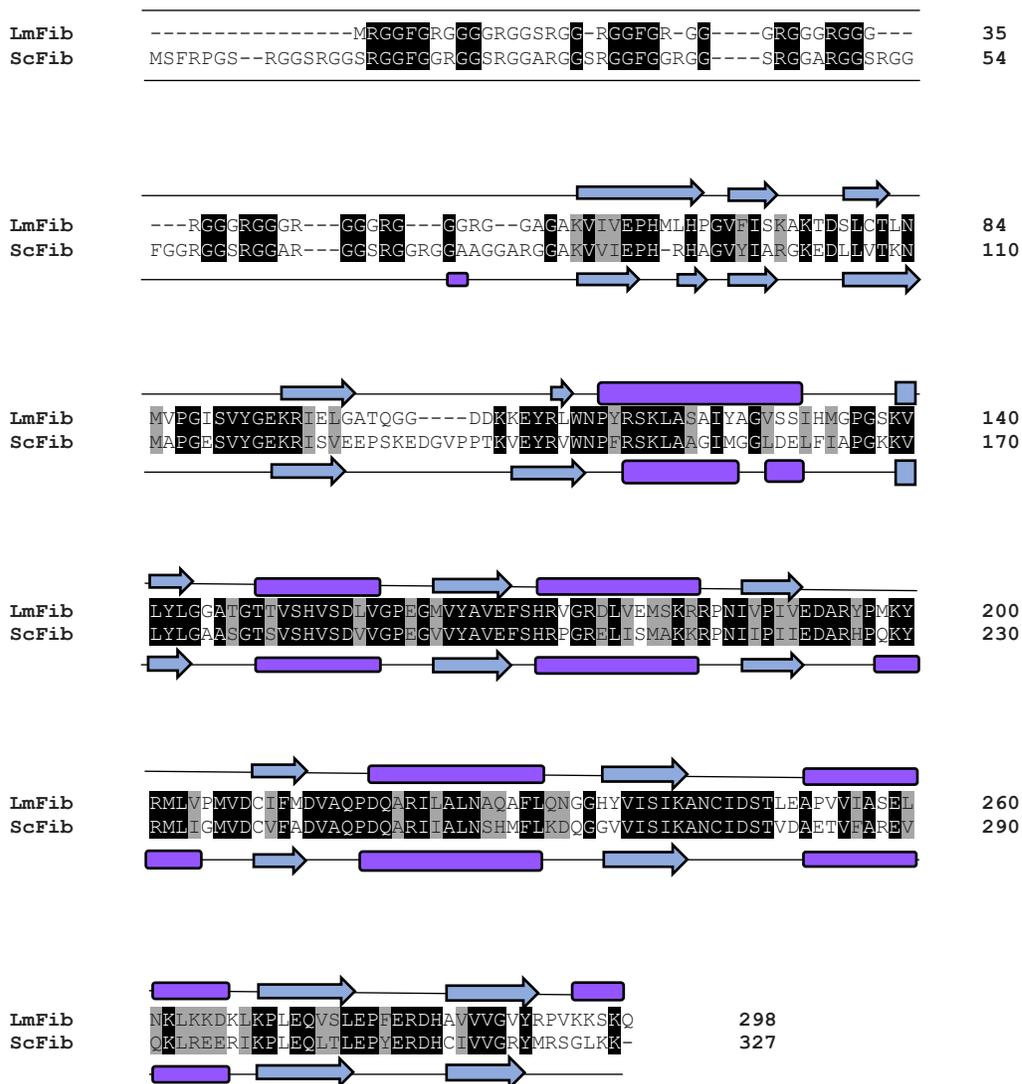


Figura 21. Comparación de secuencia primaria y estructura secundaria de Fibrilarina en *L. major* (LmFib) y de *S. cerevisiae* (ScFib). Las secuencias de aminoácidos de las dos especies fueron alineadas en el servidor Clustal Ω . Los elementos predichos de la estructura secundaria de LmFib se muestra en la parte superior y los de ScFib en la parte inferior del alineamiento. Las láminas β se representan en flechas azules y las α -hélices con rectángulos redondeados color morado. Las cajas negras representan los residuos conservados y las cajas grises los residuos semiconservados.

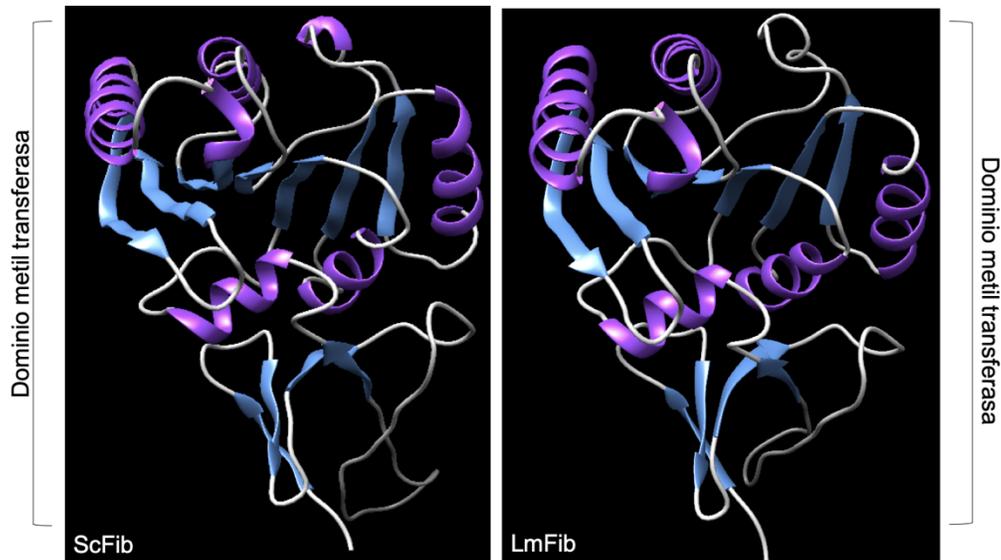


Figura 22. Modelo tridimensional de Fibrilarina en *S. cerevisiae* (ScFib) y *L. major* (LmFib). ScFib fue modelada utilizando los residuos del 88 al 322, para LmFib se incluyeron los aminoácidos 61 al 291 para generar la estructura tridimensional. Con base en el número de residuos que se tomaron en cuenta para elaborar los modelos 3D de ambas especies, es posible reconocer la conformación y estructura que adopta el dominio metil transferasa.

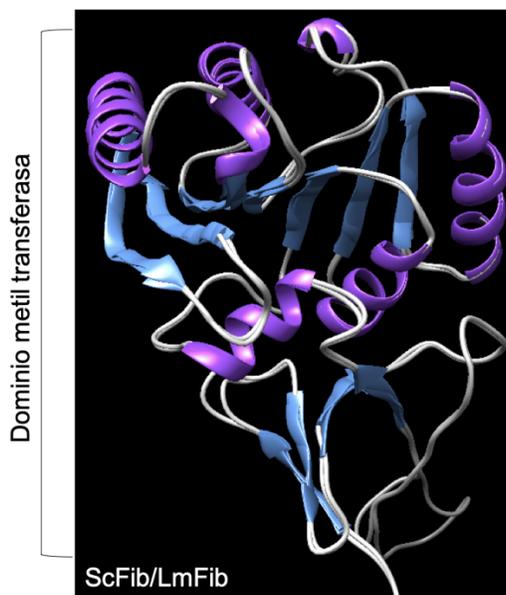


Figura 23. Sobreposición de los modelos tridimensionales de ScFib y LmFib. Con base en la estructura predicha obtenida se puede observar la alta similitud estructural compartida entre estas Fibrilarinas.

5.1.2. Fibrilarina en tripanosomátidos

A continuación se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de Fibrilarina de algunas especies del género *Leishmania* y *Trypanosoma* para dilucidar el grado de conservación. Los porcentajes de identidad obtenidos con el servidor Clustal Omega sugieren que la Fibrilarina en las diferentes especies del género *Leishmania* (al menos las incluidas en este análisis) presenta un grado de conservación relativamente elevado (Fig. 24, cajas negras). Los residuos idénticos entre LmFib y los ortólogos de otros tripanosomátidos van desde un 99.57% con *L. infantum*) hasta un 85.27% de identidad con el ortólogo de *T. brucei* (Fig. 24; Tabla 3). Aparentemente, la región amino terminal es más variable, mientras que la parte central y el carboxilo terminal presentan un alto grado de homogeneidad (Fig. 24). Los resultados de los porcentajes de identidad entre los diferentes ortólogos de Fibrilarina de las especies que fueron contempladas en este estudio están resumidos en la tabla 3.

TbFib	-----MRGGFGRGGGS--GFRGGRGGGA----PSRGRGGAGRGGGRGGNA--	39
TcFib	MNSHCDIEFKNSAMRGGFGRG-----GFRGGGRGGGSARGRGGASRG	43
LbFib	-----MRGGFARGGGGRGG-----FGRGGARGGGRGGGARGGGRGG--	37
LpaFib	-----	0
LmxFib	-----	0
LmFib	-----MRGGFGRGGGRGGSRGGRRGGFGRGGGRGG-----RGGGRGG--	39
LiFib	-----	0
TbFib	-GPHGRGGRRGGGRGGGAGAKVVVEPHMLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	98
TcFib	AGRGGPGRGGRRGGGAGAKVVVEPHMLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	103
LbFib	-RGGGRGGRRGGGRGGSAGAKVIVEPHMLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	96
LpaFib	-----MLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	33
LmxFib	-----MLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	33
LmFib	-RGGGRGGRRGGGRG--AGAKVIVEPHMLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	97
LiFib	-----MLHPGVFISKKADSLCTLNMVPGISVYGEKRI	33
TbFib	EVCATQSGDEKKEYRLWNPYRSKLA ^{AAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGAASGTTVSHVSDL}	158
TcFib	ELCATQGGDEKKEYRLWNPYRSKLA ^{AAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGCASGTTVSHVSDL}	163
LbFib	ELSATQGGDDKKEYRLWNPYRSKLA ^{SAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGCATGTTVSHVSDL}	156
LpaFib	ELSATQGGDDKKEYRLWNPYRSKLA ^{SAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGCATGTTVSHVSDL}	93
LmxFib	ELCATQGGDDKKEYRLWNPYRSKLA ^{SAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGCATGTTVSHVSDL}	93
LmFib	ELCATQGGDDKKEYRLWNPYRSKLA ^{SAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGCATGTTVSHVSDL}	157
LiFib	ELCATQGGDDKKEYRLWNPYRSKLA ^{SAIYAGV} SIHMC ^{PGSKVLYLGCATGTTVSHVSDL}	93
TbFib	VGPEGMVYAVEFS ^{NRSGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	218
TcFib	VGPEGMVYAVEFS ^{NRSGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	223
LbFib	VGPEGMVYAVEFS ^{RVGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	216
LpaFib	VGPEGMVYAVEFS ^{RVGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	153
LmxFib	VGPEGMVYAVEFS ^{RVGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	153
LmFib	VGPEGMVYAVEFS ^{RVGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	217
LiFib	VGPEGMVYAVEFS ^{RVGRDLVEMSKRRPNIVP} IEDARYPMKYRMLVPMVDCIFMDVAQP	153
TbFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	278
TcFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	283
LbFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	276
LpaFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	213
LmxFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	213
LmFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	277
LiFib	DQARILALNAQAF ^{LKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIA} SELNKLKDKLKP ^{LEQVSLE}	213
TbFib	PFERDHAVVGVYRSM ^{KKAVQQ}	300
TcFib	PFERDHAVVGVYRSM ^{VKRKTE} --	304
LbFib	PFERDHAVVGVYRPM ^{VKKS} --	296
LpaFib	PFERDHAVVGVYRPM ^{VKKS} --	233
LmxFib	PFERDHAVVGVYRPM ^{VKKSQ} --	234
LmFib	PFERDHAVVGVYRPM ^{VKKSQ} --	298
LiFib	PFERDHAVVGVYRPM ^{VKKSQ} --	234

Figura 24. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Fibrilarina de diferentes especies de *Leishmania* y *Trypanosoma*. Fueron incluidas las secuencias de *T. brucei* (TbFib; ID Tb927.10.7500), *T. cruzi* (TcFib; ID TcCLB.510105.50), *L. braziliensis* (LbFib; ID LBRM2903_350041600), *L. panamensis* (LpFib; ID LPMP_353140), *L. mexicana* (LmxFib; ID LmxM.36.3070), *L. major* (LmFib; ID LmjF.36.3070) y *L. infantum* (LiFib; ID LINF_360038800). Los aminoácidos conservados y semiconservados están resaltados en cajas color negro y gris, respectivamente.

	TbFib	TcFib	LbFib	LpaFib	LmxFib	LmFib	LiFib
TbFib	100	88.31	83.79	87.12	87.61	85.27	88.03
TcFib		100	86.36	89.70	90.17	87.54	90.60
LbFib			100	100	98.28	97.93	98.71
LpaFib				100	98.28	98.28	98.71
LmxFib					100	99.15	99.57
LmFib						100	99.57
LiFib							100

Tabla 3. Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la Fibrilarina de distintas especies de tripanosomátidos. TbFib (*T. brucei*), TcFib (*T. cruzi*), LbFib (*L. braziliensis*), LpFib (*L. panamensis*), LmxFib (*L. mexicana*), LmFib (*L. major*) y LiFib (*L. infantum*). Por ejemplo, LmFib es 97.93% idéntica con el ortólogo de *L. braziliensis*. La Fibrilarina de *L. mexicana* y la de *L. infantum* son 99.57% iguales. LmFib es 87.54% y 85.27% equivalente con *T. cruzi* y *T. brucei*, respectivamente.

5.2. Obtención del vector pGEM-T Easy

Para realizar la caracterización de LmFib, fueron diseñados dos oligonucleótidos para amplificar el gen, sin codón de paro, de LmFib 2 (LmjF.36.3070) por PCR. Al finalizar, el producto de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa. Observamos una banda abundante que oscila alrededor de las 900 pb que corresponde al tamaño de LmFib (Fig. 25A; Fib). Posteriormente, el DNA de interés (LmFib) fue purificado del gel y analizado por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 25B).

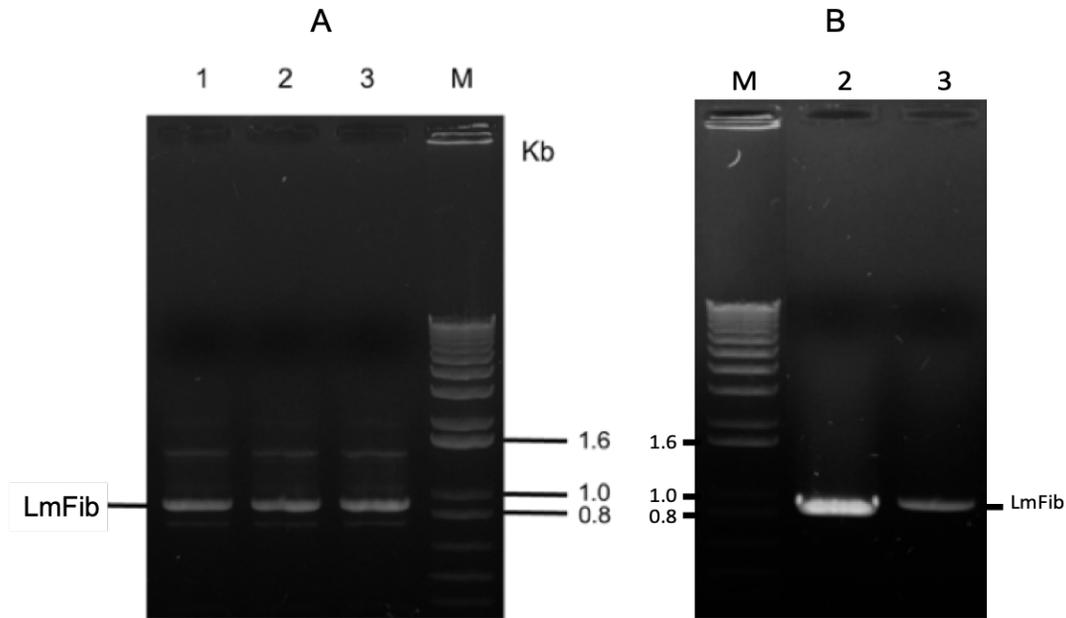


Figura 25. Obtención del gen Lmfib-1 por PCR. A) Se muestran tres reacciones de PCR indicando la banda esperada de 900 pb. Diferentes temperaturas de alineamiento fueron utilizadas. En el carril 1 = 58°C, en 2 = 59°C y en 3 = 60° C. B) DNA de LmFib purificado del gel utilizando un kit comercial. En ambos carriles se observa LmFib purificado a diferentes concentraciones. En el carril 2= 600ng y en el carril 3= 200ng de DNA. M, Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen); Fib, Fibrilarina. Gel de agarosa al 1% teñido con Midory Green (Nippon genetics).

LmFib purificado fue adenilado y ligado al vector pGEM-T Easy (Fig. 26A). Con las mezclas de ligación fueron transformadas células competentes de *E. coli*. De varios cientos de colonias positivas, se aisló el plásmido por lisis alcalina de tres colonias que fueron elegidas al azar. Se cuantificó la concentración del DNA obtenido por espectrofotometría y la construcción plasmídica fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 26B).

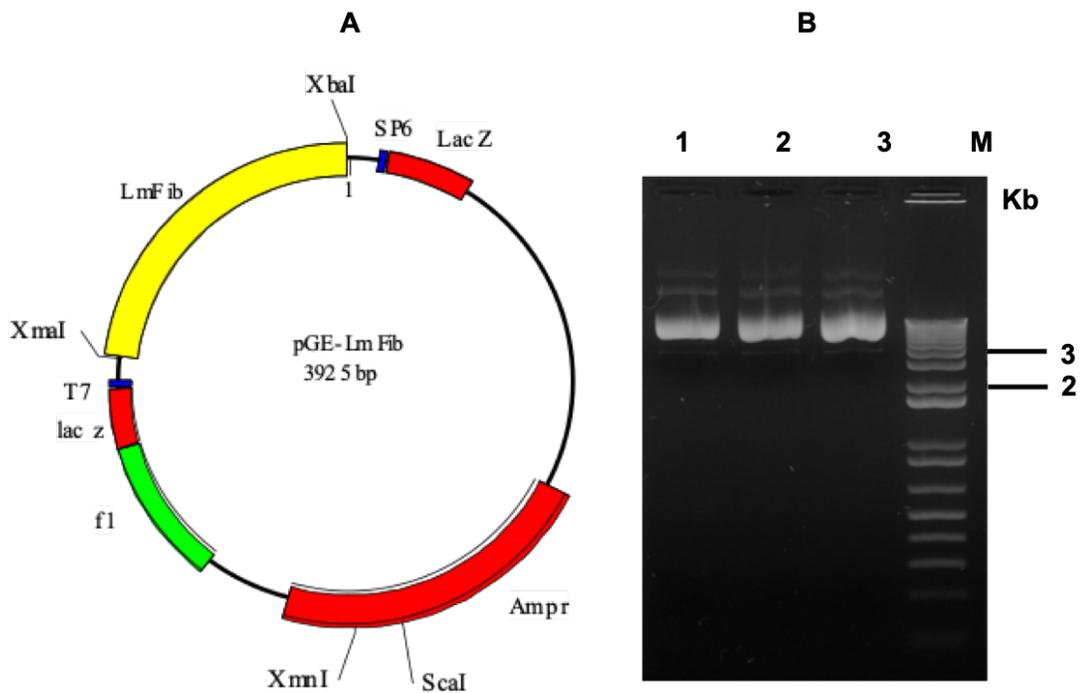


Figura 26. Clonación de LmFib en el vector pGEM-T Easy. A) Mapa del vector pGE-LmFib realizada con el programa DNAMAN (<https://www.lynnon.com/dnaman.html>). Se muestran los principales componentes del vector como los sitios de corte de las enzimas de restricción, la secuencia de resistencia a ampicilina y el inserto de LmFib. B) Imagen del gel de agarosa con el DNA plasmídico de las tres colonias seleccionadas (1 a 3). M, marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con Midory Green (Nippon genetics).

Para corroborar la naturaleza del plásmido pGE-LmFib obtenido de las tres clonas, fue realizado un análisis utilizando algunas endonucleasas de restricción. La caracterización se llevó a cabo empleando la enzima *EcoRI* debido a que están presentes dos sitios de corte en el vector pGEM-T Easy y uno interno en LmFib. Como era esperado, se observaron tres fragmentos de DNA con diferentes tamaños. El primero menor de las 3 Kb, otro cercano a las 700 pb y el último de aproximadamente 270 pb (Fig. 27; carriles 2, 6 y 10). También, pGE-LmFib fue digerido simultáneamente con las enzimas *XmaI* y *XbaI* que cortan a LmFib en los extremos 5' y 3', respectivamente (Fig. 26A). Ambas enzimas no presentan actividad sobre el cuerpo del vector. Como se había predicho, al finalizar la

electroforesis se observó la presencia de dos bandas resultantes de la reacción de restricción, una de 3 Kb (que corresponde al vector pGEM) y otra cercana a las 900 pb (perteneciente al inserto LmFib) (Fig. 27; carriles 3, 7 y 11).

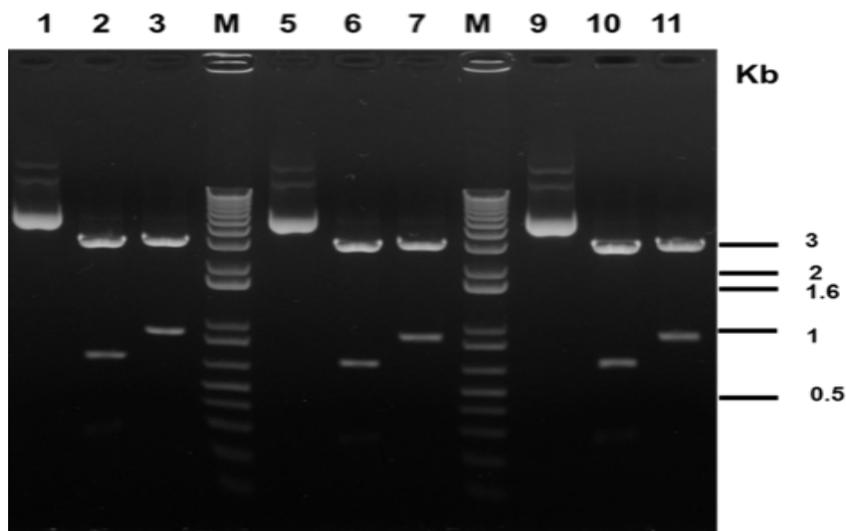


Figura 27. Análisis de restricción del DNA plasmídico pGE-LmFib. Los carriles 1 al 3 corresponden a la colonia uno (1: DNA sin digerir, 2: DNA digerido con *EcoRI* y 3: DNA digerido con *XmaI* y *XbaI*). Los carriles 5 a 7 son de la colonia dos (5: DNA sin digerir, 6: DNA digerido con *EcoRI* y 7: DNA digerido con *XmaI* y *XbaI*). Los carriles 9 a 11 plásmido de la colonia tres (9: DNA sin digerir, 10: DNA digerido con *EcoRI* y 11: DNA digerido con *XmaI* y *XbaI*). M, marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con Midory Green (Nippon genetics).

Se decidió enviar a secuenciar pGE-LmFib de las colonias uno y dos. La serie de nucleótidos resultantes fue comparada contra la secuencia genómica de las dos versiones de Fibrilarina de *L. major* disponibles en la página web TritypDB, utilizando las herramientas bioinformáticas Clustal Ω y BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Con base en el análisis *in silico* determinamos que pGE-LmFib de la colonia número dos está libre de errores (Fig. 28) y que presenta una identidad del 100% con el gen de Fibrilarina localizado en el cromosoma 36 (LmjF.36.3070). De esta forma se confirmó la obtención del vector pGE-LmFib (Fig. 26A). Por lo anterior, esta construcción fue seleccionada para generar el plásmido pLmFib-PTP.

LmjF.36	ATGCGCGGTGGCTTTGGACGTGGCGGTGGTGGTCGCGGCGGCAGCCGTGGTGGTCGCGGA	60
C2LmFib	-----	60

LmjF.36	GGCTTTGGCCGTGGCGGCGGTTCGCGGTGGAGGCCGTGGCGGCGGTTCGCGGTGGAGGCCGT	120
C2LmFib	-----	120

LmjF.36	GGCGGCGGTTCGCGGTGGTGGCCGTGGCGGCGGTTCGCGGTGGTGGCGGTGCCAAGTTATC	180
C2LmFib	-----	180

LmjF.36	GTGGAGCCACACATGCTGCATCCTGGCGTGTTCATTTCCAAGGCCAAGACCGACTCTCTT	240
C2LmFib	-----TGGCGTGTTCATTTCCAAGGCCAAGACCGACTCTCTT	240

LmjF.36	TGCACGCTGAACATGGTGCCCGGTATTTCCGTTTATGGCGAGAAGCGTATCGAGCTGGGT	300
C2LmFib	TGCACGCTGAACATGGTGCCCGGTATTTCCGTTTATGGCGAGAAGCGTATCGAGCTGGGT	300

LmjF.36	GCAACGCAGGGAGGTGATGATAAGAAGGAGTACCGTCTGTGGAACCCCTACCGCTCGAAG	360
C2LmFib	GCAACGCAGGGAGGTGATGATAAGAAGGAGTACCGTCTGTGGAACCCCTACCGCTCGAAG	360

LmjF.36	CTGGCCTCCGCCATCTACGCTGGTGTGAGTAGCATTACATGGGTCCCGGCTCGAAGGTA	420
C2LmFib	CTGGCCTCCGCCATCTACGCTGGTGTGAGTAGCATTACATGGGTCCCGGCTCGAAGGTA	420

LmjF.36	CTGTATCTCGGCGGTGCAACGGGTACCACCGTCAGCCACGTGAGCGACCTTGTGGGTCCG	480
C2LmFib	CTGTATCTCGGCGGTGCAACGGGTACCACCGTCAGCCACGTGAGCGACCTTGTGGGTCCG	480

LmjF.36	GAGGGCATGGTGTATGCTGTGGAGTTCCTCGCACCGTGTAGGCCGCGATTTAGTGGAGATG	540
C2LmFib	GAGGGCATGGTGTATGCTGTGGAGTTCCTCGCACCGTGTAGGCCGCGATTTAGTGGAGATG	540

LmjF.36	TCGAAGCGCCGCCGAATATTGTGCCATTGTTGAGGATGCCCGCTACCCCATGAAGTAC	600
C2LmFib	TCGAAGCGCCGCCGAATATTGTGCCATTGTTGAGGATGCCCGCTACCCCATGAAGTAC	600

LmjF.36	CGCATGCTTGTGCCGATGGTGGATTGCATTTTCATGGATGTCGCCAGCCAGACCAGGCG	660
C2LmFib	CGCATGCTTGTGCCGATGGTGGATTGCATTTTCATGGATGTCGCCAGCCAGACCAGGCG	660

LmjF.36	CGAATCTTGCACTCAACGCACAGGCTTTTCTGCAGAACGGTGGTCACTATGTGATCTCT	720
C2LmFib	CGAATCTTGCACTCAACGCACAGGCTTTTCTGCAGAACGGTGGTCACTATGTGATCTCT	720

LmjF.36	ATCAAGGCTAACTGCATCGACTCTACCCTGGAGGCCCTGTAGTGATCGCGTCTGAGCTG	780
C2LmFib	ATCAAGGCTAACTGCATCGACTCTACCCTGGAGGCCCTGTAGTGATCGCGTCTGAGCTG	780

LmjF.36	AACAAGCTGAAGAAGGACAAGCTGAAGCCACTGGAGCAAGTGTCCTTGAGCCGTTTCGAG	840
C2LmFib	AACAAGCTGAAGAAGGACAAGCTGAAGCCACTGGAGCAAGTGTCCTTGAGCCGTTTCGAG	840

LmjF.36	CGCGATCACGCTGTAGTTGTTGGCGTGTACCGCCCTGTCAAGAAGTCGAAGCAATGA---	897
C2LmFib	CGCGATCACGCTGTAGTTGTTGGCGTGTACCGCCCTGTCAAGAAGTCGAAGCAAT-----	894

Figura 28. Alineamiento de la secuencia del gen de Fibrilarina localizado en el cromosoma 36 de *L. major* (LmFib) con la secuencia de la clona 2 (C2LmFib).

5.3. Obtención del vector LmFib-PTP

Se realizó la digestión del vector pGE-LmFib y del plásmido pB6-PTP con las enzimas de restricción *XmaI* y *XbaI*. Estas reacciones se llevaron a cabo para purificar el inserto de LmFib (900 pb) y el cuerpo del vector que contiene la bandera PTP (6.67 Kb). Después de fraccionar por electroforesis en gel de agarosa, ambos DNAs fueron recuperados (Fig. 29A) y cuantificados por espectrometría. Posteriormente, el gen de Fibrilarina de *L. major* fue subclonado en el vector PTP (Fig. 29B).

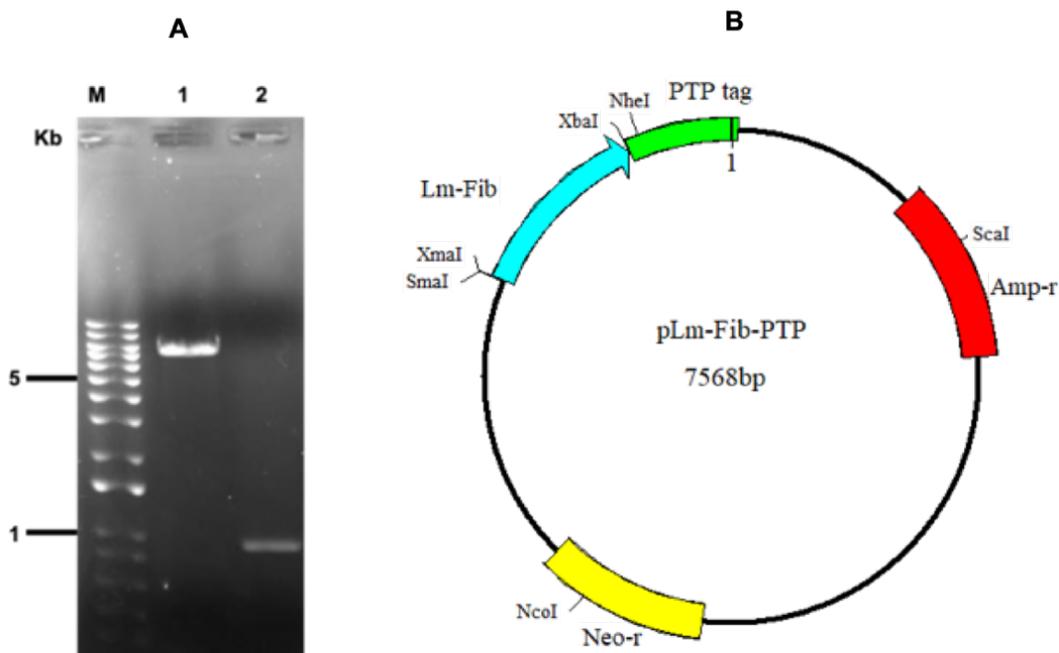


Figura 29. Generación del vector pLmFib-PTP. A) Cuerpo del vector PTP purificado (carril 1) e inserto LmFib purificado (carril 2). M, marcador de peso molecular de 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con Midory Green (Nippon genetics). B) Mapa del vector pLmFib-PTP realizado con el programa DNAMAN.

La ligación (LmFib con el cuerpo del vector PTP) se empleó para transformar células de *E. coli* electrocompetentes cepa DH5 α E. Fueron seleccionadas cuatro

colonias para aislar DNA de plásmido pLmFib-PTP utilizando un kit de miniprep y el DNA obtenido se analizó en un gel de agarosa (Fig. 30).

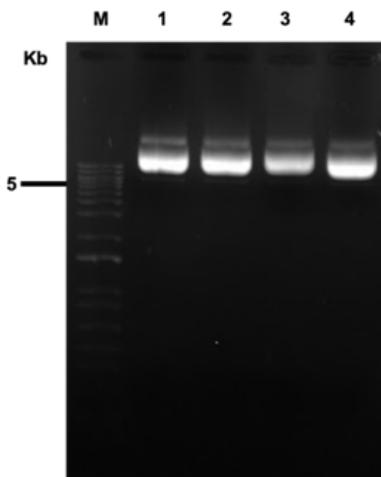


Figura 30. Análisis del vector pLmFib-PTP. DNA de plásmido sin digerir extraído de las cuatro clonas (carriles de 1 a 4) seleccionadas al azar. M, marcador de 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con Midory Green (Nippon genetics).

Después el plásmido pLmFib-PTP de cada clona fue digerido simultáneamente con las enzimas *Xma*I y *Xba*I. En todas las muestras analizadas observamos dos fragmentos de DNA, el primero de 900 pb que corresponde al gen LmFib y una banda mayor a las 6 Kb que representa el cuerpo del vector PTP (Fig. 31).

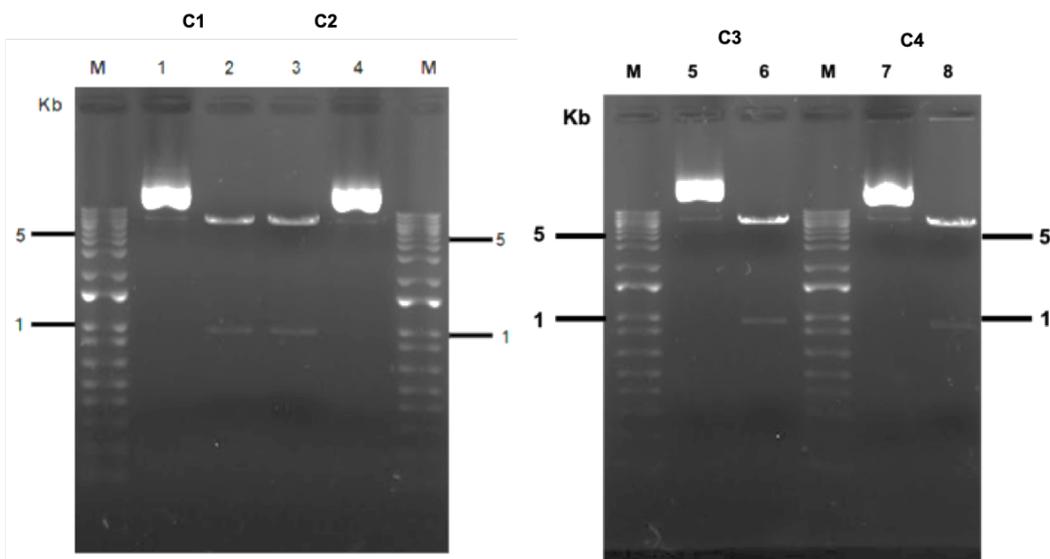


Figura 31. Análisis de restricción del plásmido pLmFib-PTP con las enzimas *Xma*I y *Xba*I. Colonia uno (línea 1: DNA sin digerir, línea 2: DNA digerido con *Xma*I y *Xba*I). Colonia dos (línea 3: DNA


```

*****

LmFib      GCGACCTTGTGGGTCCGGAGGGCATGGTGTATGCTGTGGAGTTCTCGCACCGTGTAGGCC  540
Rev        GCGACCTTGTGGGTCCGGAGGGCATGGTGTATGCTGTGGAGTTCTCGCACCGTGTAGGCC  540
*****

LmFib      GCGATTTAGTGGAGATGTCGAAGCGCCGCCGAATATTGTGCCCATGTTGAGGATGCC    600
Rev        GCGATTTAGTGGAGATGTCGAAGCGCCGCCGAATATTGTGCCCATGTTGAGGATGCC    600
*****

LmFib      CGCTACCCCATGAAGTACCGCATGCTTGTGCCGATGGTGGATTGCATTTTCATGGATGTC  660
Rev        CGCTACCCCATGAAGTACCGCATGCTTGTGCCGATGGTGGATTGCATTTTCATGGATGTC  660
*****

LmFib      GCCCAGCCAGACCAGGCGGAATTCCTGCACTCAACGCACAGGCTTTTCTGCAGAACGGT   720
Rev        GCCCAGCCAGACCAGGCGGAATTCCTGCACTCAACGCACAGGCTTTTCTGCAGAACGGT   720
*****

LmFib      GGTCATATGTGATCTCTATCAAGGCTAACTGCATCGACTCTACCCTGGAGGCCCTGTA   780
Rev        GGTCATATGTGATCTCTATCAAGGCTAACTGCATCGACTCTACCCTGGAGGCCCTGTA   780
*****

LmFib      GTGATCGCGTCTGAGCTGAACAAGCTGAAGAAGGACAAGCTGAAGCCACTGGAGCAAGTG  840
Rev        GTGATCGCGTCTGAGCTGAACAAGCTGAAGAAGGACAAGCTGAAGCCACTGGAGCAAGTG  840
*****

LmFib      TCTCTTGAGCCGTTTCGAGCGGATCACGCTGTAGTTGTTGGCGTGTACCGCCCTGTCAAG  900
Rev        TCTCTTGAGCCGTTTCGAGCGGATCACGCTGTAGTTGTTGGCGTGTACCGCCCTGTCAAG  900
*****

LmFib      AAGTCGAAGCAATCTAGAGGTTCCGACGGCGAAGATCAGGTGGATCCTCGTCTTATTGAT  960
Rev        AAGTCGAAGCAATCTAGAGGTTCCGACGGCGAAGATCAGGGGACCCCCCCTACGAGCG   960
***** *  *  *  *  *

```

Figura 32. Alineamiento de la secuencia del gen de Fibrilarina localizado en el cromosoma 36 de *L. major* (LmFib) con la secuencia de la clona tres, utilizada para la construcción de pLmFib-PTP.

Para generar una mayor cantidad de DNA, se creció un cultivo de 500 ml de medio LB con bacterias de la clona tres, se extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina a mediana escala o midiprep. Después, se determinó la concentración del DNA y fue realizado un análisis de restricción con las enzimas

*Xma*I y *Xba*I para corroborar el plásmido pLmFib-PTP antes de electroporarlo, por duplicado, a promastigotes de *L. major* en cultivo. Al finalizar la electroforesis, observamos las dos bandas del tamaño que esperabamos encontrar (Fig. 33).

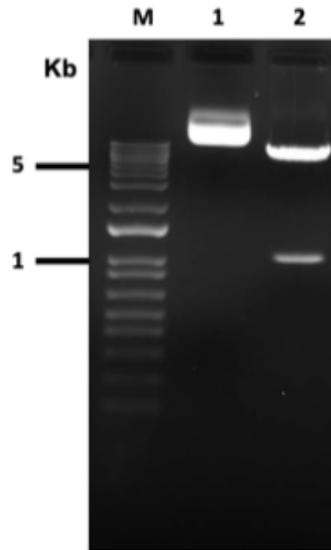


Figura 33. Análisis de restricción del vector pLmFib-PTP. Carril 1 corresponde al vector pLmFib-PTP sin digerir. Carril 2 corresponde al vector pLmFib-PTP digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xma*I. M, marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con Midory Green (Nippon genetics).

5.4. Obtención de poblaciones estables de LmFib-PTP

Fueron transfectados 100 millones de promastigotes de *L. major* cepa Friedlin con 25 μ g del plásmido pLmFib-PTP por duplicado. Aproximadamente una semana después de la selección con el fármaco G418, fue observado crecimiento celular en las dos poblaciones LmFib-PTP generadas. Los parásitos transgénicos se mantuvieron en fase media logarítmica por varios días antes de obtener extractos proteicos necesarios para determinar, por ensayos tipo Western blot, la expresión de la proteína recombinante Fibrilarina-PTP. En ambas poblaciones se encontró una banda principal de alrededor de 50 kDa formada por los 31.4 kDa de LmFib y los 20 kDa de la bandera PTP (Fig. 34).

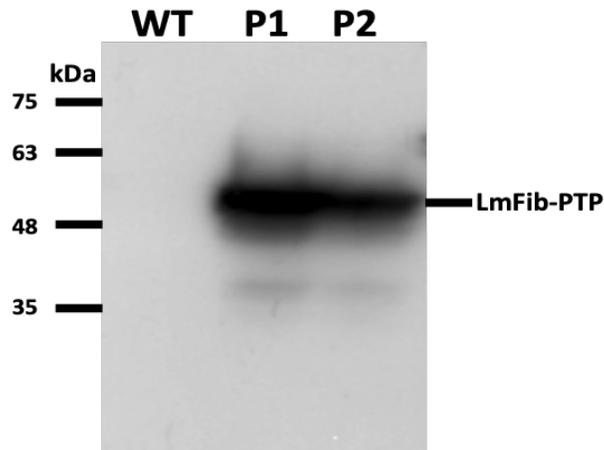


Figura 34. Análisis de Western blot de dos poblaciones transfectadas de LmFib-PTP. En ambas poblaciones se visualiza una banda de aproximadamente 51 kDa, masa molecular correspondiente a LmFib (31.4 kDa) fusionado a la bandera PTP (20 kDa). Marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

5.5. Obtención de clonas celulares LmFib-PTP

Una vez que se demostró la presencia de LmFib-PTP en las dos poblaciones, inició el proceso de clonación celular. Se hicieron tres resiembras de los cultivos cada 24 horas y los parásitos fueron esparcidos en agarosa con medio BM y G418. La aparición de las primeras clonas ocurrió 14 días después de la inoculación. Se seleccionaron cinco clonas al azar, se mantuvieron como *stock*, resemebrando en medio BM líquido con fármaco G418 en cajas de 25 cm².

5.6. LmFib-PTP se expresa en las clonas celulares

Para comprobar que las cinco clonas expresaban la proteína recombinante Fib-PTP, se llevaron a cabo ensayos tipo Western blot. Fue extraída la proteína total de cada línea celular-PTP y de promastigotes *wild type*. La concentración proteica se cuantificó por el método de Bradford y la integridad fue evaluada por SDS-PAGE y tinción con azul de Comassie (dato no mostrado). Por otro lado, una vez verificado este parámetro, realizamos la transferencia de las proteínas fraccionadas por SDS-PAGE a una membrana de PVDF que fue sondeada con tres anticuerpos primarios diferentes dirigidos hacia distintos epitopes de la bandera PTP. Inicialmente empleamos el anti-prot C. En los cinco extractos obtenidos observamos una banda

con un tamaño 51 kDa que corresponde a LmFib-PTP. Son visibles algunas señales adicionales, consideramos que son productos de la degradación de LmFib-PTP que aún conservan el péptido de prot C (Fig. 35).

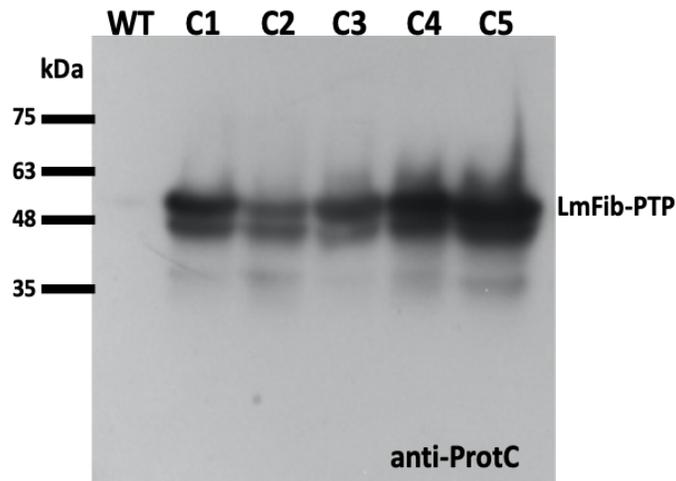


Figura 35. Expresión de LmFib-PTP utilizando el anticuerpo primario anti-Prot C. Se emplearon extractos proteicos obtenidos de parásitos silvestres (*wild type*) y de cinco clones LmFib-PTP. En todas las muestras transgénicas analizadas se encontró una banda con una masa molecular de aproximadamente 51 kDa, que sugiere la expresión correcta de la proteína recombinante LmFib-PTP. Marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

Con base en el resultado anterior (Fig. 35), decidimos eliminar la clona 2, ya que la señal de LmFib-PTP fue más baja. Después, utilizamos el anticuerpo primario anti-Prot A. Se encontró una señal con el tamaño estimado para LmFib-PTP en las cuatro clonas analizadas. De nueva cuenta, existe la presencia de una banda con una masa molecular ligeramente menor pero que es claramente distinguible (Fig. 36).

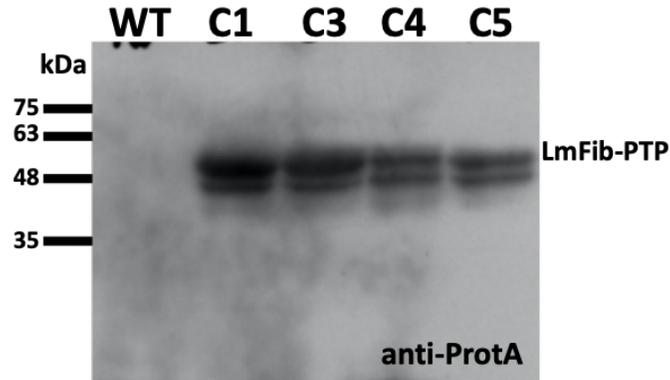


Figura 36. Expresión de LmFib-PTP utilizando el anticuerpo primario anti-Prot A. Para el análisis de las clonas transfectadas se emplearon extractos proteicos obtenidos de cuatro clonas LmFib-PTP (C1, C3, C4 y C5) y de parásitos silvestres (*wild type*). Marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

Finalmente, la última caracterización molecular se realizó usando un anticuerpo primario anti-Flag. En este caso, en las cuatro clonas se visualizaron dos bandas, una de aproximadamente 51 kDa correspondiente a LmFib-PTP y otra secundaria de menor masa (Fig. 37). Ante la ausencia de la etiqueta PTP en las células silvestres (*wild type*), no se observó ningún tipo de señal (Figs. 34-37).

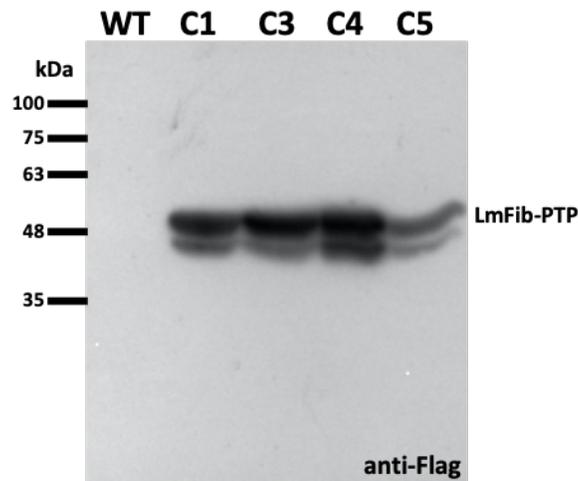


Figura 37. Expresión de LmFib-PTP utilizando el anticuerpo primario anti-Flag. Para el análisis de las clonas transfectadas se emplearon extractos proteicos obtenidos de cuatro clonas LmFib-PTP (C1,C3,C4 y C5) y de parásitos silvestres (*wild type*). Marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

5.7. La proteína LmFib-PTP se localiza en el nucléolo

Para determinar la localización subcelular de LmFib-PTP se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Se empleó una solución que contenía los anticuerpos anti-Prot C y un suero policlonal dirigido contra la proteína Nop56 de *L. major* como marcador nucleolar. En las micrografías de fluorescencia seleccionadas (Fig. 38) se observa que en los parásitos transgénicos la proteína recombinante LmFib-PTP (verde) se concentra mayoritariamente en una zona nuclear débilmente teñida con DAPI (azul), probablemente en la región organizadora del nucléolo (Fig. 38A). Como era de esperarse, la señal fluorescente de LmNop56 (rojo) indica la localización exclusivamente nucleolar (Fig. 38B). La confirmación de que LmFib-PTP se acumula en el nucléolo de los promastigotes de dos líneas celulares elegidas, fue obtenida al observar una clara co-localización (amarillo), en la misma región nuclear, de ambas proteínas (Fig. 38C). En conjunto, estos resultados nos indican que la localización de LmFib y LmNop56 se limita a un mismo cuerpo nuclear: el nucléolo (Fig. 38D).

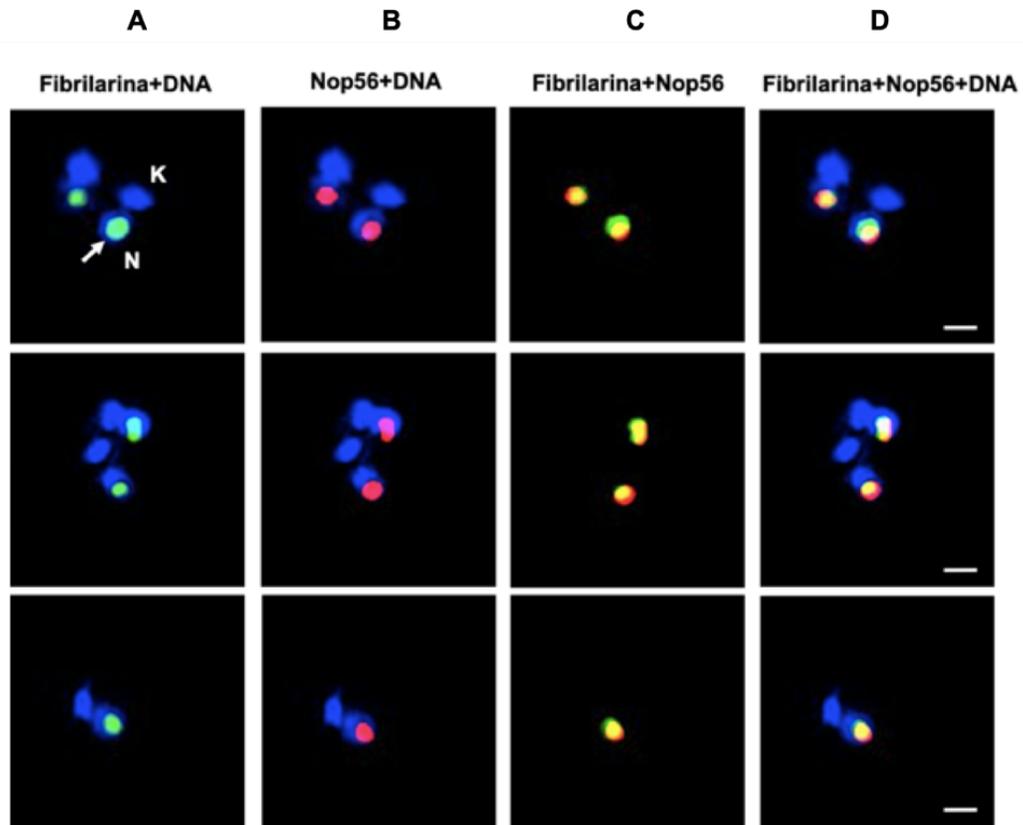


Figura 38. Localización subcelular de la proteína LmFib-PTP. A) LmFib-PTP fue detectada con el anticuerpo anti-prot C y revelada con una IgG anti-conejo conjugada con Alexa Fluor 488 (verde). B) El suero policlonal anti-LmNop56 detecta la proteína nucleolar LmNop56, revelada con una IgG anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 568 (rojo). C) La co-localización entre LmFib-PTP y LmNop56 es visible por la formación del color amarillo. D) LmFib-PTP y LmNop56 se limitan a la región del nucléolo celular. La flecha blanca señala el nucléolo, el DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (k) fue teñido con DAPI (azul). Barra = 2µm.

5.8. Purificaciones por afinidad en tándem

Después de realizar los experimentos para corroborar la expresión y localización subcelular de LmFib-PTP, se llevó a cabo la purificación de complejos proteicos que están asociados con Fibrilarina *in vivo*. El aislamiento se realizó realizando dos cromatografías en tándem, la primera empleando perlas de sefarosa-IgG (Amersham) y la segunda con una matriz de afinidad α -Prot C (Roche). Posteriormente, la suspensión eluida fue concentrada y una fracción representativa se analizó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 39). Una vez que el gel se tiñó e iluminó con luz UV, fue posible distinguir un número significativo de bandas con diferente masa molecular (Fig. 39; carril 1). Se identificó una señal de aproximadamente 34 kDa que corresponde a LmFib-PTP, derivada de 31 kDa (LmFib) y de 3.56 kDa del epítipo Prot C (Fig. 39, flecha blanca).

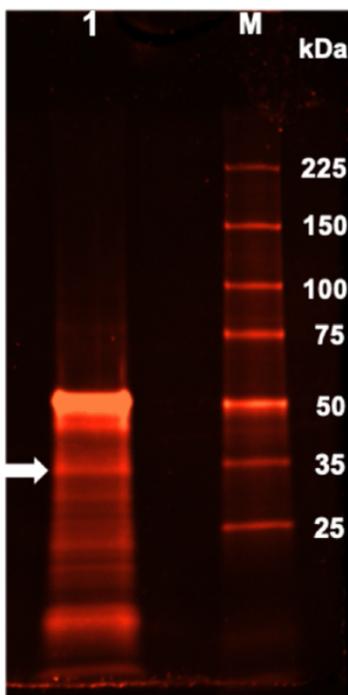


Figura 39. Gel de poliacrilamida con las proteínas copurificadas con LmFib-PTP obtenidas de la purificación por afinidad en tándem. La muestra corresponde a una alícuota del eluido proteico concentrado que fue fraccionada por electroforesis. El gel fue teñido con Sypro Ruby y analizado bajo luz UV. Carril M: marcador (Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA); Carril 1: muestra. La flecha indica la posición donde probablemente se encuentra LmFib-PTP (alrededor de los 35 kDa).

5.9. Análisis por espectrometría de masas

Con la finalidad de identificar las proteínas que co-purificaron con LmFib-PTP, el extracto proteico restante fue concentrado en una matriz de poliacrilamida para ser enviado a la Upstate Medical University en la ciudad de Syracuse, Nueva York, donde fue analizado por espectrometría de masas. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la escrita en la base de datos de los tripanosomátidos. El análisis de la muestra confirmó la presencia de la proteína blanco LmFib además de las otras tres proteínas que conforman el *core* de los snoRNPs de caja C/D (Snu13, Nop58 y Nop56). Asimismo, se identificaron las proteínas que conforman los snoRNPs caja H/ACA (Nop10, Gar 1, Nhp2 y Cbf5). Se identificó un número considerable de proteínas asociadas a la subunidad mayor (60S) y menor (40S) de los ribosomas. Se encontraron proteínas asociadas a U3, helicasas, de unión a mRNA, GTPasas, diversas Nop's, proteínas de choque térmico, histonas y proteínas hipotéticas (Fig. 40 y tabla 4).

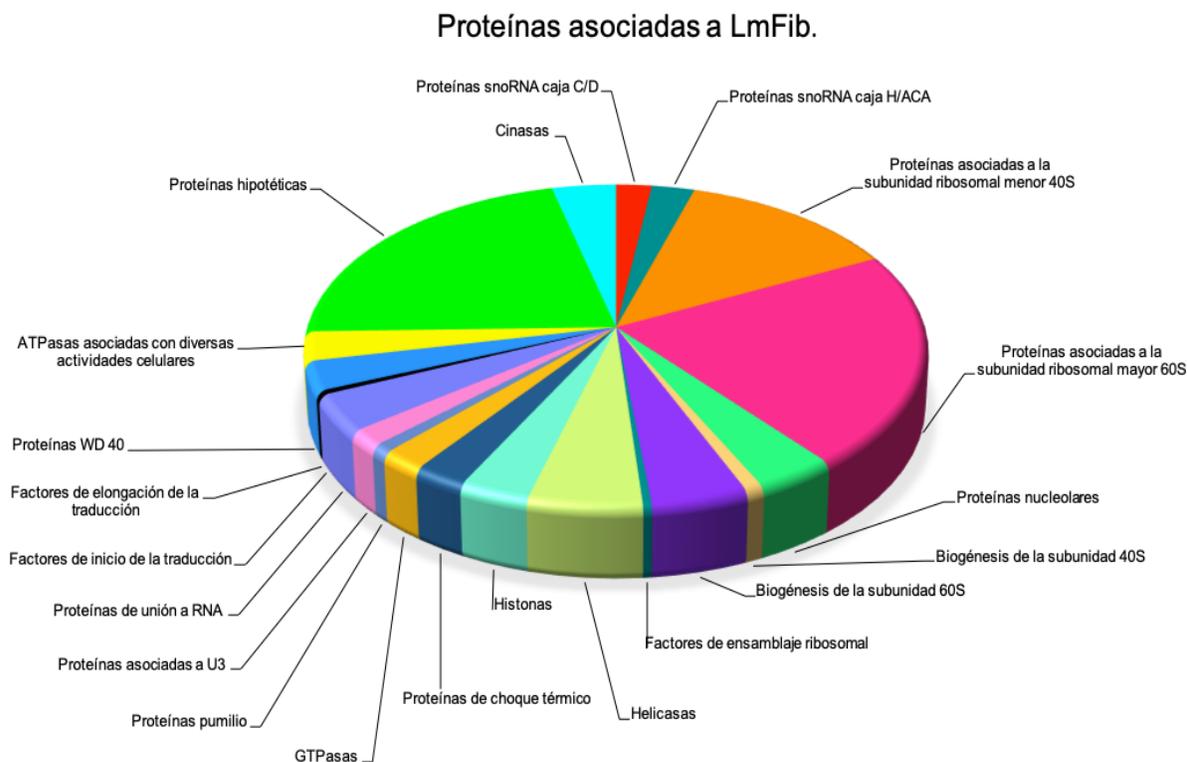


Figura 40. Proteínas asociadas a LmFib. Se representa de manera gráfica las principales categorías a las cuales pertenecen las proteínas que co-purificaron con LmFib.

ID del gen	Proteína identificada	Masa molecular (KDa)	Número de péptidos	Número de aminoácidos
Proteínas snoRNA caja C/D				
Lmjf.36.3070	Fibrilarina	31.43	61	298
LmjF.19.0100	Fibrilarina, putativa	31	22	297
Lmjf.10.0210	Proteína nucleolar 56, putativa	52.7	63	473
Lmjf.15.1380	Proteína de unión a RNA nucleolar Nop58, putativa	66	65	602
LmjF.15.1470	Proteína ribosomal S6, putativa	13.5	10	126
Proteínas snoRNA caja H/ACA				
Lmjf.21.1760	Proteína de unión a centromeros/microtúbulos Cbf5, putativa	48.4	150	430
Lmjf.34.3980	Proteína nucleolar parecida a un miembro NHP2	16.7	39	148
Lmjf.34.4290	Proteína nucleolar de la familia a, GAR1 putativa	21.9	31	220
Lmjf.36.0340	Proteína nucleolar 10	7.4	15	63
Lmjf.32.3810	Proteína que contiene el dominio SHQ1	63.6	50	580
LmjF.32.3980	Subunidad del complejo de ribonucleoproteína H/ACA	22	1	198
Proteínas asociadas a la subunidad ribosomal menor 40S				
Lmjf.35.0400	Proteína ribosomal S3a de la subunidad 40S	30	19	264
LmjF.24.2070	Proteína ribosomal S8 de la subunidad 40S	24.9	12	220
LmjF.24.2080	Proteína ribosomal S4 de la subunidad 40S	30.7	17	273
LmjF.13.1220	Proteína ribosomal S4 de la subunidad 40S	30.7	17	273
LmjF.13.1230	Proteína ribosomal S4 de la subunidad 40S	30.7	17	273
LmjF.32.0450	Proteína ribosomal S2 de la subunidad 40S	28.6	8	264
LmjF.36.5010	Proteína ribosomal SA de la subunidad 40S	27.5	9	246
LmjF.36.5120	Proteína ribosomal SA de la subunidad 40S	27.5	9	246
LmjF.36.1250	Proteína ribosomal S9 de la subunidad 40S	22.1	9	190
LmjF.01.0410	Proteína ribosomal S7 de la subunidad 40S	23.7	8	200
LmjF.01.0420	Proteína ribosomal S7 de la subunidad 40S	23.7	8	200
LmjF.22.1520;	Proteína ribosomal L14 de la subunidad 40S	19.9	8	175
LmjF.22.1560	Proteína ribosomal L14 de la subunidad 40S	19.9	8	175
LmjF.11.0960;	Proteína ribosomal S5 de la subunidad 40S	21.3	4	190
LmjF.11.0970	Proteína ribosomal S5 de la subunidad 40S	21.3	4	190
LmjF.29.2860	Proteína ribosomal similar a S19	18.1	6	161
LmjF.19.0390;	Proteína ribosomal S13 de la subunidad 40S	17.4	7	151
LmjF.33.3150	Proteína ribosomal S13 de la subunidad 40S	17.4	7	151
LmjF.13.0570	Proteína ribosomal S12 de la subunidad 40S	15.6	3	141
LmjF.21.1060;	Proteína ribosomal S23 de la subunidad 40S	15.9	5	143
LmjF.21.1070	Proteína ribosomal S23 de la subunidad 40S	15.9	5	143
LmjF.28.2555;	Proteína ribosomal S17 de la subunidad 40S	16.5	7	143
LmjF.28.2560	Proteína ribosomal S17 de la subunidad 40S	16.5	7	143
LmjF.20.1650;	Proteína ribosomal S11 de la subunidad 40S	16.3	5	141
LmjF.21.1550	Proteína ribosomal S11 de la subunidad 40S	16.3	5	141
LmjF.29.1800;	Proteína ribosomal S15A de la subunidad 40S	14.7	4	130
LmjF.11.1190	Proteína ribosomal S15A de la subunidad 40S	14.7	4	130
LmjF.30.3200	Proteína ribosomal S26 de la subunidad 40S	12.7	3	112
LmjF.11.0760;	Proteína ribosomal S21 de la subunidad 40S	17	2	164
LmjF.11.0780	Proteína ribosomal S21 de la subunidad 40S	17	2	164
LmjF.36.6400	Proteína ribosomal S8 de la subunidad 40S	29.7	3	260
LmjF.26.0880;	Proteína ribosomal S16 de la subunidad 40S	16.7	3	149
LmjF.26.0890	Proteína ribosomal S16 de la subunidad 40S	16.7	3	149

LmjF.36.0930	Proteína ribosomal S18 de la subunidad 40S	24.6	4	218
LmjF.15.0950; LmjF.33.0920	Proteína ribosomal S3 de la subunidad 40S	24.5	3	219
LmjF.28.0540	Proteína ribosomal S26	12.8	3	112
LmjF.22.0420; LmjF.22.0460	Proteína ribosomal S15 de la subunidad 40S	17.4	1	152
LmjF.25.1190	Proteína ribosomal S25	13	1	120
LmjF.36.3750	Proteína ribosomal S27-1 de la subunidad 40S	9.8	1	86
LmjF.36.0980; LmjF.36.0990	Proteína ribosomal S10 de la subunidad 40S	18.6	1	168
LmjF.28.1010; LmjF.28.1030	Proteína ribosomal S20 de la subunidad 40S	13	1	116
LmjF.28.0960	Proteína ribosomal S14 de la subunidad 40S	15.6	6	144
LmjF.35.2010	Proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S	28.3	13	249
Proteínas asociadas a la subunidad ribosomal mayor 60S				
LmjF.18.0620	Proteína ribosomal L10a de la subunidad 60S	24.5	24	214
LmjF.27.1380	Proteína ácida P0 de la subunidad 60S	34.8	20	323
LmjF.33.0720; LmjF.15.1000	Proteína ribosomal L6 de la subunidad 60S	21.1 23	23 21	195 195
LmjF.07.0500	Proteína ribosomal L7a de la subunidad 60S	29.7	16	264
LmjF.32.0880	Proteína ribosomal L18a de la subunidad 60S	20.8	14	179
LmjF.35.1430; LmjF.35.1440; LmjF.32.3900	Proteína ribosomal L2 de la subunidad 60S	28.3	12	260
LmjF.04.0950; LmjF.04.0750	Proteína ribosomal L10 de la subunidad 60S	24.5	13	213
LmjF.26.0170; LmjF.26.0180	Proteína ribosomal L7 de la subunidad 60S	28.8	12	252
LmjF.35.1900; LmjF.35.1880; LmjF.35.1900	Proteína ribosomal L5 de la subunidad 60S	34	14	305
LmjF.13.0560	Proteína ribosomal L18	9	22	198
LmjF.35.3290; LmjF.35.3280; LmjF.35.3290	Proteína ribosomal L31 de la subunidad 60S	21.2	8	188
LmjF.29.2460; LmjF.29.2460	Proteína ribosomal L13 de la subunidad 60S	24.7	10	220
LmjF.15.0200	Proteína ribosomal L13a de la subunidad 60S	25.4	9	222
LmjF.04.0470	Proteína ribosomal L11 de la subunidad 60S	21.6	10	188
LmjF.24.2050; LmjF.35.1670	Proteína ribosomal L26 de la subunidad 60S	16.2	8	143
LmjF.21.1050	Proteína ribosomal L9 de la subunidad 60S	21.5	6	190
LmjF.06.0410	Proteína ribosomal L19 de la subunidad 60S	30.5	6	267
LmjF.36.3740	Proteína ribosomal L34 de la subunidad 60S	19.3	6	168
LmjF.34.3650; LmjF.16.0460	Proteína ribosomal L21 de la subunidad 60S	18 18	6 7	159 159
LmjF.32.0430	Proteína ribosomal L17 de la subunidad 60S	19.1	5	166
LmjF.06.0570; LmjF.06.0580	Proteína ribosomal L23a de la subunidad 60S	16.3	5	145
LmjF.21.0730	Proteína ribosomal L36 de la subunidad 60S	11.9	6	105

LmjF.18.0230	Proteína ribosomal L7 de la subunidad 60S	34.5	5	298
LmjF.35.2050	Proteína ribosomal L32 de la subunidad 60S	15.4	5	133
LmjF.11.1110; LmjF.11.1130	Proteína ribosomal L28 de la subunidad 60S	16.3	5	147
LmjF.35.5100; LmjF.35.5100	Proteína ribosomal L37 de la subunidad 60S	9.1	3	76
LmjF.35.3780; LmjF.35.3760; LmjF.35.3780	Proteína ribosomal L27A/L29 de la subunidad 60S	16.1	4	145
LmjF.36.0600	Proteína ribosomal L40 de la subunidad 60S	17	4	152
LmjF.36.3270; LmjF.36.4420	Proteína ribosomal L22 de la subunidad 60S	15	1	129
LmjF.32.2690; LmjF.32.2710	Proteína ribosomal L27 de la subunidad 60S	15.4	4	134
LmjF.35.3790; LmjF.35.3790; LmjF.35.3800	Proteína ribosomal L23 de la subunidad 60S	14.9	3	139
LmjF.35.2190; LmjF.24.2210	Proteína ribosomal L12 de la subunidad 60S	17.5	2	164
LmjF.11.0900	Proteína ribosomal L24 de la subunidad 60S	22.6	4	190
LmjF.26.2330; LmjF.26.2340	Proteína ribosomal L35 de la subunidad 60S	15.2	2	127
LmjF.35.0240	Proteína ribosomal L30 de la subunidad 60S	11.3	2	104
LmjF.21.1820; LmjF.36.1925	Proteína ribosomal L37a de la subunidad 60S	10.3	1	92
LmjF.15.0370; LmjF.15.0380	Proteína ribosomal ácida de la subunidad 60S	10.1	1	108
LmjF.21.1720	Proteína ribosomal L32 de la subunidad 60S	15.4	6	133
LmjF.30.3730	Proteína ribosomal ácida P2 de la subunidad 60S	12.8	2	125
LmjF.29.1070	Proteína ribosomal L1a de la subunidad 60S	41	24	373
LmjF.32.3130	Proteína ribosomal L3 de la subunidad 60S	47.5	17	419
LmjF.36.1070; LmjF.36.1100	Proteína ribosomal L24 de la subunidad 60S	14.6	6	124
LmjF.30.3650	Proteína ribosomal L15 de la subunidad 60S	24.4	6	204
LmjF.10.0070; LmjF.34.2470	Proteína ribosomal L35a de la subunidad 60S	16.4	6	144
LmjF.15.1203; LmjF.15.1207	Proteína ribosomal ácida P2 de la subunidad 60S	11	3	111
LmjF.16.0010	Proteína que contiene el dominio ribosomal L18e/L15P	43.5	1	374
LmjF.14.0950	Proteína que contiene el dominio ribosomal L16	19.1	1	168
LmjF.36.6920	Familia de la proteína ribosomal L1p/L10e	30.7	8	275
LmjF.14.0780	Ribosomal protein L21	21	1	186
Proteínas nucleolares				
LmjF.36.2480	Proteína (de unión a ácido nucleico) hipotética conservada	27.9	9	259
LmjF.11.0410	Homólogo de la proteína BOP1 (Nop 89) de biogénesis ribosomal	91.1	1	808
LmjF.31.0190	Proteína nucleolar	70.1	3	629
LmjF.04.0810	Homólogo de proteína pescadillo	77.2	4	671
LmjF.10.0860	Proteína nucleolar 16	22.7	5	196

LmjF.30.3020	Componente del procesoma de la subunidad pequeña KRR1	36	11	321
LmjF.20.0420	Proteína 8 de procesamiento de RNA ribosomal	41.7	1	374
LmjF.16.0890	Proteína nucleolar 52	74.6	5	662
LmjF.07.0570	Proteína nucleolar 54	50.7	5	464
Biogénesis de la subunidad 40S				
LmjF.28.1880	Proteína que contiene el dominio G de tipo Bms1	139.6	2	1261
LmjF.16.1390	Methyltransferasa EMG1/NEP1	32.5	1	287
LmjF.35.1090	Proteína que contiene el dominio Kri1_C	114.1	12	1049
Biogénesis de la subunidad 60S				
LmjF.20.1670	Proteína de biogénesis ribosomal, putativa	36	5	317
LmjF.22.1380	Homólogo de la proteína MAK16	32.1	3	267
LmjF.35.1820	Proteína de procesamiento de rRNA eucariota EBP2	31.6	6	273
LmjF.27.0450	Proteína de biogénesis ribosomal	39.3	3	330
LmjF.09.0005	Proteína hipotética conservada	41.1	5	373
LmjF.30.0620	Proteína reguladora de la biogénesis ribosomal	28.4	5	245
LmjF.10.1030	Proteína similar a una proteína de unión a RNA	41.1	1	379
LmjF.33.1350	Homólogo de la proteína NIP7 implicada en la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S	20.6	1	181
LmjF.27.1450	Proteína que contiene el dominio CBF	93.1	2	853
LmjF.26.0010	Proteína similar a la que contiene el dominio Brix	40.2	17	362
LmjF.36.1880	Familia CBF/Mak21	70.2	1	634
LmjF.18.1610	Familia Noc2p	73	2	654
Factores de ensamblaje ribosomal				
LmjF.36.4650	Factor de ensamblaje ribosomal mrt4	25.3	6	227
Helicasas				
LmjF.35.3100	Helicasa de RNA dependiente de ATP DEAD/DEAH, putativa	100.2	1	923
LmjF.24.0250	Helicasa de RNA dependiente de ATP DEAD/DEAH, putativa	66.7	2	605
LmjF.32.0400	Helicasa de RNA HEL67 dependiente de ATP, putativa	67	6	615
LmjF.35.0370	Helicasa de RNA DEAD, dependiente de ATP, putativa	46.4	5	405
LmjF.35.1200	Factor de corte y empalme de pre-mRNA, Helicasa de RNA dependiente de ATP, putativa	79.8	14	704
LmjF.34.2610	Helicasa tipo RuvB	53.6	20	483
LmjF.34.3500		50.3	14	459
LmjF.32.2230	Helicasa de RNA dependiente de ATP DEAD/DEAH, putativa	85.7	1	773

LmjF.36.1840	Helicasa de RNA DEAD, putativa	73	1	657
LmjF.01.0770; LmjF.01.0780	Probable factor de iniciación eucariota 4A	45.3	2	403
LmjF.15.0130	Helicasa de RNA dependiente de ATP DEAD/DEAH, putativa	72.5	1	648
LmjF.21.1190	Helicasa de RNA dependiente de ATP DEAD/DEAH, putativa	84.1	1	786
LmjF.31.1010	Proteína hipotética conservada, probable helicasa de RNA DDX46 dependiente de ATP	79.8	12	751
Histonas				
LmjF.17.1220; LmjF.28.0210	Histona H2B	12.2	2	111
		15.7	1	142
LmjF.29.1720	Histona H2A	13.8	4	132
LmjF.21.0915		13.8	4	132
LmjF.10.0870; LmjF.10.0990; LmjF.16.0570; LmjF.16.0575; LmjF.16.0610	Histona H3	14.7	2	130
LmjF.16.0600	Histona H3, putativa	14.7	2	130
LmjF.02.0020; LmjF.35.1310; LmjF.25.2450; LmjF.31.3180; LmjF.36.0020	Histona H4	11.4	5	100
LmjF.06.0010	Histona H4	11.4	3	100
Proteínas de choque térmico				
LmjF.28.2770	Proteína de choque térmico hsp70, putativa	71.6	19	658
LmjF.18.1370	Proteína de choque térmico 110, putativa	91.7	1	823
LmjF.33.0330	Proteína de choque térmico 83	80.4	5	700
LmjF.26.1240	Proteína relacionada con la proteína de choque térmico 70	70.5	2	641
LmjF.30.2460 LmjF.30.2470 LmjF.30.2480 LmjF.30.2490 LmjF.30.2550	Proteína 1 relacionada con la proteína de choque térmico 70	68.3	2	634
LmjF.36.6660	Metil transferasa (relacionada con el dominio de la proteína de choque térmico FtsJ) , putativa	44.8	27	400
GTPasas				
LmjF.33.1870	Proteína de unión a GTP nucleolar 1(NOG 1)	74.3	17	652
LmjF.19.0240	Proteína putativa de la familia GTPasa GNL3L/Grn1	72.7	10	671
LmjF.25.1420	Proteína nuclear de unión a GTP	24.2	5	216
LmjF.05.0460	Proteína 2 de unión a GTP nucleolar (NOG 2)	71.4	6	627
LmjF.35.5310	GTPasa 2 que interactúa con ribosomas, putativa	42.1	1	374
Proteínas pumilio				
LmjF.32.1750	Proteína 7 de unión a RNA de Pumilio/PUF, putativa	85.2	1	780
LmjF.11.0470	Proteína Pumilio 10, putativa	81.8	2	751

Proteínas asociadas a U3				
LmjF.26.1790	Proteína nucleolar 287,	296.1	9	2766
LmjF.19.0670	Proteína UTP 11 asociada a U3	41.8	3	361
LmjF.30.1290	Ribonucleoproteína pequeña nuclear (SnRNP) U3	33.1	2	288
LmjF.36.4580	Proteína UTP 18 asociada a U3	48.8	8	452
Proteínas de unión a RNA				
LmjF35.4130	Proteína de unión a poliadenilato	65.3	25	594
LmjF.32.0750	Proteína de unión a RNA, putativa	25.2	13	235
LmjF.35.2200	Proteína de unión a RNA, putativa	30.2	10	274
LmjF.32.2810	Proteína de unión a RNA, putativa	51.1	2	447
LmjF.07.0870	Factor de empalme proteína similar a Ptrs1	41.9	7	372
LmjF.26.0290	Nucleótido hidrolasa, putativo	29.6	1	271
LmjF.35.5230	RNA ^t (guanina-N (7)-metil transferasa, putativo	27.9	1	241
Factores de inicio de la traducción				
LmjF.36.0890	Factor 6 de iniciación de la traducción eucariota (eIF-6), putativo	27.1	9	249
LmjF.03.0980	Subunidad alfa del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota	49	2	432
Factores de elongación de la traducción				
LmjF.17.0080; LmjF.17.0081; LmjF.17.0083; LmjF.17.0084; LmjF.17.0085; LmjF.17.0086	Factor de elongación 1-alfa	49.1	15	449
Proteínas WD 40				
LmjF.23.0030	Proteína 1 beta de hélice	59.9	6	533
LmjF.23.0620	Dominio WD, repetición G-beta, proteína que contiene el dominio BIN (NUC141)	76.5	1	680
LmjF.35.5270	Dominio WD, repetición G-beta, putativo	39.8	2	356
LmjF.24.1490	Dominio WD, repetición G-beta, putativo	47.5	1	434
LmjF.36.4710	Proteína hipotética, conservada	79.8	1	727
LmjF.31.0200	Repetición de proteína WD	52.2	7	485
LmjF.34.0300	Proteína hipotética, conservada	80.5	7	757
ATPasas asociadas con diversas actividades celulares				
LmjF.24.0990	Factor de replicación C, subunidad 1, putativo	71.7	8	661
LmjF.30.2630	Factor de replicación C, subunidad 1, putativo	38.4	6	354
LmjF.35.3250	Factor de replicación C, subunidad 3, putativo	39.8	4	364
LmjF.27.0550	Factor de replicación C, subunidad 4, putativo	39.5	4	360
LmjF.36.6710	Factor de replicación C, subunidad 5, putativo	39.3	4	351
LmjF.17.0540	Proteína que contiene el dominio AAA	137	1	1292

LmjF.20.1530	Proteína similar a la proteína del ciclo de división celular		94	1	881
Proteínas hipotéticas					
Lmjf.32.3640	Proteína conservada	hipotética,	48.6	33	448
Lmjf.34.2485	Proteína conservada	hipotética,	38.1	30	359
Lmjf.12.0440	Proteína conservada	hipotética,	75.5	27	710
LmjF.04.0490	Proteína conservada	hipotética,	34.1	7	318
LmjF.22.1610	Proteína conservada	hipotética,	76.2	4	723
LmjF.20.0690	Proteína conservada	hipotética,	140.5	4	1321
LmjF.30.2810	Proteína conservada	hipotética,	24.6	2	205
LmjF.05.0340	Proteína conservada	hipotética,	40.9	2	371
LmjF.36.6050	Proteína conservada	hipotética,	38.6	1	331
LmjF.35.5140	Proteína conservada	hipotética,	31.7	1	286
LmjF.15.1400	Proteína conservada	hipotética,	33.8	2	295
LmjF.33.0040	Proteína conservada	hipotética,	55.9	1	520
LmjF.33.0080	Proteína conservada	hipotética,	21	1	183
LmjF.27.0070	Proteína conservada	hipotética,	33.8	2	313
LmjF.30.0090	Proteína conservada	hipotética,	27.6	2	228
LmjF.29.1060	Proteína conservada	hipotética,	109.1	1	1074
LmjF.36.3260	Proteína conservada	hipotética,	22.4	1	194
LmjF.33.0690	Proteína conservada	hipotética,	18.6	1	156
LmjF.04.0860	Proteína conservada	hipotética,	45.5	1	409
LmjF.15.0080	Proteína conservada	hipotética,	36.7	1	321
LmjF.27.1100	Proteína conservada	hipotética,	69.1	1	647
LmjF.33.0935	Proteína conservada	hipotética,	57.7	1	548
LmjF.04.0370	Proteína conservada	hipotética,	30.3	1	268
LmjF.36.5100	Proteína conservada	hipotética,	105.2	1	981
LmjF.08.0920	Proteína conservada	hipotética,	22.1	1	204
LmjF.36.3350	Proteína conservada	hipotética,	22.1	1	195
LmjF.30.2750	Proteína conservada	hipotética,	27.2	1	234
LmjF.08.0120	Proteína conservada	hipotética,	30.2	1	270
LmjF.36.6190	Proteína conservada	hipotética,	21.2	1	185
LmjF.25.1380	Proteína conservada	hipotética,	26.1	1	236
LmjF.25.0890	Proteína conservada	hipotética,	28.8	1	252
LmjF.03.0020	Proteína conservada	hipotética,	29.5	1	268

LmjF.14.1230	Proteína conservada	hipotética,	60.4	1	570
LmjF.35.3740	Proteína conservada	hipotética,	43.4	1	388
LmjF.13.0580	Proteína conservada	hipotética,	164.1	1	1564
LmjF.35.4490	Proteína conservada	hipotética,	156.3	1	1487
LmjF.15.0850	Proteína conservada	hipotética,	101.1	1	954
LmjF.21.0290	Proteína conservada	hipotética,	120.2	1	1094
LmjF.32.1800	Proteína conservada	hipotética,	26.1	1	243
LmjF.34.3530	Proteína conservada	hipotética,	215.6	1	1945
LmjF.35.2470	Proteína conservada	hipotética,	55.4	1	495
LmjF.34.2030	Proteína conservada	hipotética,	129.1	1	1171
LmjF.23.0547	Proteína conservada	hipotética,	90.9	1	856
LmjF.31.2990	Proteína conservada	hipotética,	215.4	1	1935
LmjF.36.1830	Proteína conservada	hipotética,	94.8	1	877
LmjF.28.2360	Proteína conservada	hipotética,	28.5	1	244
LmjF.30.0650	Proteína conservada	hipotética,	45.6	1	397
LmjF.30.0760	Proteína conservada	hipotética,	116.6	1	1057
LmjF.31.0080	Proteína conservada	hipotética,	25.71	1	318
LmjF.32.0840	Proteína conservada	hipotética,	57.4	3	525
LmjF.11.0080	Proteína conservada	hipotética,	25.4	2	225
LmjF.30.3430	Proteína conservada	hipotética,	90.2	2	796
Cinasas					
LmjF.21.1250	Adenilato cinasa, putativa		30	1	529
LmjF.30.3380	Fosfoglicerato cinasa		57.5	2	527
LmjF.32.2950	Nucleósido difosfato cinasa		16.6	2	151
LmjF.29.2510; LmjF.29.2510	6-Fosfofructocinasa dependiente de ATP		54	3	486
LmjF.21.0853	Proteína que contiene el dominio de la proteína cinasa		238.8	1	241
LmjF.25.0870	Proteína cinasa serina/treonina inespecífica BUD32		31.5	1	292
LmjF.27.1250	Proteína asociada al receptor de la cinasa serina-treonina, putativo		35.3	5	196
LmjF.30.1250	Cinasa piridoxal		93.1	2	853

Tabla 4. Proteínas identificadas en la espectrometría de masas.

6. Discusión

Los tripanosomátidos son organismos capaces de producir enfermedades importantes como la tripanosomiasis y leishmaniasis, las cuales representan graves problemas de salud pública en países localizados en zonas tropicales del planeta. Adicional a su evidente importancia médica, *Leishmania* y otros tripanosomátidos patógenos son organismos biológicamente atractivos para la investigación biomédica debido a los mecanismos atípicos de expresión génica que presentan y los distinguen de otros eucariontes. El interés de estudiar eventos a nivel molecular tales como los relacionados con la biogénesis ribosomal y el procesamiento único que sufre la especie 28S rRNA polifragmentada en un nucléolo bipartito obedece a poder contribuir a un mejor entendimiento de este proceso celular esencial, así como también en la identificación y la caracterización de moléculas involucradas únicas que podrían constituir blancos terapéuticos potenciales para el desarrollo de fármacos o de vacunas antiparasitarias necesarias para el tratamiento de las enfermedades que ocasionan estos parásitos.

En eucariontes, la biogénesis de ribosomas es un proceso complejo que, en la mayoría de sus pasos se lleva a cabo dentro del nucléolo. La generación de rRNA individuales y maduros implica el procesamiento y el ensamble del pre-rRNA (McCulloch & Navarro, 2016). Las alteraciones post-transcripcionales que experimenta el pre-rRNA son catalizadas, en su mayoría, por un grupo de partículas ribonucleoproteicas de tamaño pequeño y de localización nucleolar denominadas como snoRNPs. Estas moléculas están estructuradas por un RNA nucleolar pequeño (snoRNA) guía, no codificante y por un “core catalítico”, formado por cuatro proteínas esenciales muy bien conservadas (Watkins et al., 2012). Una modificación importante es la que llevan a cabo los snoRNA de caja C/D, los cuales están involucrados en la metilación del pre-rRNA. Estas partículas hibridan específicamente con secuencias blanco de rRNA y posicionan en el sitio apropiado, a la enzima Fibrilarina, capaz de catalizar la 2'-O-metilación, este fenómeno es facilitado por los componentes proteicos Nop56, Nop58 y 15.5k (Snu13 en levaduras; Sloan et al., 2017).

Fibrilarina es una metil transferasa conservada a través de la evolución, desde levaduras hasta humanos. Se ha demostrado que la supresión del gen de Fibrilarina mediante *knockout* resulta letal en *S. cerevisiae*, la generación de mutantes de este gen provoca defectos en el procesamiento y modificación del pre-rRNA así como en el ensamblaje ribosomal (Tollervey et al., 1993). Además, en plantas, la reducción de los niveles de Fibrilarina a más del 90% por medio de iRNA, generó un fenotipo apoptótico (Kim et al., 2007), estos hallazgos sugieren que Fibrilarina resulta esencial para la viabilidad celular.

En este trabajo se realizó la caracterización de la versión alélica de Fibrilarina localizada en el cromosoma 36 del genoma de *L. major*. Con base en el análisis de la secuencia de aminoácidos de LmFib comparada con su ortólogo en levadura (ScFib), se demuestra que ambas secuencias tienen un porcentaje de identidad relativamente alto (63.51%). Asimismo, es posible identificar que, en la Fibrilarina de ambas especies, los dominios estructurales se encuentran conservados: el dominio N-terminal (región GAR) y el dominio C-terminal (metil transferasa; Fig. 20). La información disponible en la literatura indica que la secuencia de la región GAR es variable entre los eucariontes además de no estar presente en arqueas, y también que resulta necesaria para el correcto funcionamiento de Fibrilarina. La región GAR parece ser imprescindible para la interacción con diferentes proteínas celulares y virales, además de promover una señal nucleolar de Fibrilarina (Snaar et al., 2000). En el caso del dominio C-terminal o metil transferasa, es aquel que contiene la actividad enzimática, la secuencia conservada de unión a RNA y la región que interactúa con Nop56/58.

La predicción de la estructura secundaria (Fig. 21) permitió identificar que el dominio metil transferasa de *L. major* y *S. cerevisiae* guarda similitud con el descrito en el trabajo de Shubbina y colaboradores (2016), donde mencionan que la estructura del dominio catalítico de la metil transferasa se encuentra conservado entre las especies, este se caracteriza por contener alrededor de siete láminas β

flaqueadas por tres α -hélices en cada lado, en la disposición $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 1-\beta 2-\beta 3-\beta 4-\beta 5-\beta 6-\beta 7-\alpha 4-\alpha 5-\alpha 6$. La estructura tridimensional reveló que el plegamiento global que exhibe Fibrilarina es muy similar al comparado con ScFib, el parecido entre ambas estructuras indica el elevado nivel de conservación evolutivo de Fibrilarina.

Por medio del alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos que se realizó con Fibrilarina de *L. major* y especies pertenecientes a este mismo género (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. donovani*) y del género *Trypanosoma* (*T. cruzi* y *T. brucei*) se sugiere un alto nivel de conservación de Fibrilarina entre tripanosomátidos. Era de esperarse que los mayores porcentajes de identidad se presentaran entre LmFib y sus ortólogos del mismo género sin embargo, las especies del género *Trypanosoma* también presentaron un alto nivel de homología con LmFib (Tabla 3). Por otro lado, fue posible distinguir que el dominio N- terminal es el que presentó mayor variación en la secuencia de aminoácidos entre las especies comparadas (Fig. 23).

A partir de ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se determinó la localización subcelular de Fibrilarina-PTP de *L. major*. Con base en los resultados de estos experimentos, se determinó que la señal fluorescente observada tiene una evidente localización nucleolar (Fig. 38). Esta concentración de Fibrilarina en el nucléolo es similar a lo reportado en epimastigotes de *T. cruzi*, un cinetoplástido relacionado (Guerrero-Sánchez et al., 2015). Asimismo, la colocalización de LmFib con la proteína nucleolar Nop56, permitió determinar que nuestra proteína recombinante se encuentra en el nucléolo. La sobreposición de LmFib-PTP y LmNop56 posiblemente ocurre en el componente fibrilar de este organelo, debido a que es el sitio donde se lleva a cabo la transcripción de rDNA y el procesamiento temprano del rRNA. Cabe destacar que Fibrilarina es una proteína altamente dinámica que alterna rápidamente entre el nucléolo y el nucleoplasma, y se ha propuesto que recorre el núcleo en busca de parejas de unión específicas para metilar (Rodríguez-Corona et al., 2018). De manera interesante, algunas proteínas

nucleolares, como Fibrilarina, pueden concentrarse en los cuerpos de Cajal y participar en la modificación y ensamblaje de varias U snRNPs. Sin embargo, dentro del género *Leishmania* no ha sido esclarecida la presencia de cuerpos nucleares esenciales (Daniels et al., 2010).

En este trabajo se realizaron ensayos de purificación por afinidad en tándem, con el objetivo de identificar las proteínas que interactúan con LmFib y que potencialmente participan en la biogénesis ribosomal de *L. major*. Este proceso celular esencial ha sido ampliamente estudiado en el organismo modelo *S. cerevisiae* y se ha descrito la participación de más de 200 factores de ensamble ribosomal, dentro de éstos se incluyen diversas proteínas de unión a RNA o a proteínas, endo y exonucleasas, helicasas, GTPasas, ATPasas, entre otras. Estos factores de ensamblaje promueven el correcto plegamiento y procesamiento del pre-rRNA, la exportación nuclear y el control de calidad que requiere este fenómeno celular (Peña et al., 2017).

La organización básica del operón de rRNA eucariota es similar en todas las especies estudiadas al momento, ya que tres de los cuatro rRNA (18S, 5.8S y 25/28S) son transcritos por la RNA pol I como un precursor largo que experimenta una extensa maduración co y postranscripcional. El procesamiento del precursor y el ensamblaje de la subunidad pequeña o 40S (SSU) y grande o 60S (LSU) se lleva a cabo por separado, y de manera jerárquica se van incorporando varias proteínas estructurales ribosómicas y factores no ribosómicos que se asocian transitoriamente con el proceosoma de la SSU y LSU (Venena & Tollevey, 1999).

Un gran número de proteínas de biogénesis ribosomal de levadura están anotadas en el genoma de *L. major*, sin embargo, y debido a la peculiaridad de la fragmentación de la especie ribosomal 28S (LSU α , LSU β , sr1, sr2, sr4 y sr6) que ocurre en tripanosomátidos, han sido identificadas algunas moléculas específicas que están involucradas en el procesamiento del precursor ribosomal

polisegmentado que resultan esenciales para que se lleve de manera correcta la síntesis de las subunidades 40 y 60S (Shanmugha et al., 2019).

En este estudio fueron co-purificadas una diversidad importante de proteínas involucradas en el procesamiento y ensamblaje del transcrito ribosomal primario. Una de éstas es Imp4 (LmjF.30.1290), un factor de unión al U3 snoRNP que participa en la maduración temprana del pre-18S rRNA al mediar la escisión en las posiciones A0, A1 y A2, además de permitir la formación del complejo de procesamiento activo (Dragon, 2002). La proteína nucleolar 287 (LmjF.26.1790; UTP10 en levaduras), que se asocia con U3, también fue identificada. Se ha demostrado que la ablación mediante iRNA da como resultado una interrupción del procesamiento del rRNA pre-18S, así como una disminución en el nivel del snoRNA U3 (Faktorová et al., 2018). Además, por estudios de criomicroscopía electrónica se describió que los ribosomas de *L. donovani* contienen más de 70 proteínas ribosomales (Zhang et al., 2016), un número importante de estos polipéptidos que constituyen la subunidad 40S y 60S citoplásmicas fueron purificadas con LmFib-PTP (Tabla 4).

Adicionalmente se encontraron las tres proteínas que forman el complejo PeBoW, Nop7 (LmjF.04.0810), YTM1 (LmjF.31.0200) y ERB1 (LmjF.11.0410), que juega un papel crucial en el procesamiento y maduración del rRNA 5.8S y 28S, componentes estructurales y funcionales de la subunidad ribosómica 60S (Rohrmoser et al., 2007). Mediante experimentos de purificación por afinidad en tándem, estas tres proteínas PeBoW pudieron aislarse en *S. cerevisiae* y se determinó que contribuyen al recorte del extremo 5' del pre-rRNA 27SA₃ realizado por las exonucleasas Rat1 y Xrn1, lo sugiere que la función de este complejo trimérico podría estar conservada en *L. major* (Kressler et al., 2010).

Algunas proteínas ribosomales de estos parásitos son más largas debido a la presencia de varias extensiones N o C terminales, algunas son exclusivas de tripanosomátidos. Particularmente, en *T. cruzi* las proteínas S21 (LmjF.11.0760) y

L19 (LmjF.06.0410) mostraron extensiones C-terminales de 164 y 168 aminoácidos, respectivamente (Ayub et al., 2009). Se ha sugerido que debido a la naturaleza cargada y dinámica de estas proteínas, las extensiones podrían contribuir al ensamblaje del ribosoma para facilitar el plegamiento del rRNA (Timsit et al., 2021). Muy posiblemente estas modificaciones diferenciales del rRNA pueden representar una fuente importante de la heterogeneidad de los ribosomas al ajustar y regular la síntesis de proteínas en respuesta a señales ambientales (Timsit et al., 2021; Shanmugha et al., 2019), tal como el cambio de temperatura al que los tripanosomátidos se ven sometidos durante su ciclo de vida. Se sabe que la 2'-O metilación está guiada por los snoRNA de caja C/D y que dicha reacción enzimática está catalizada por Fibrilarina (Nop1), una metil transferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina (SAM). Los resultados de la purificación por afinidad en tándem que realizamos nos permitieron identificar las dos isoformas de Fibrilarina (Lmjf.36.3070 y LmjF.19.0100) que están incluidas en el genoma de *L. major*. Esta observación es interesante debido a que nos sugiere que las dos proteínas pueden ser empleadas para la reacción de metilación del rRNA. La presencia de más de un gen de Fibrilarina en tripanosomátidos es común, con base en la información en TriTrypDB en una diversidad de especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* están presentes dos versiones alélicas de Fibrilarina. Asimismo, fue posible identificar las proteínas que conforman el core de los snoRNP de caja C/D: Nop56 (Lmjf.10.0210), Nop58 (Lmjf.15.1380) y 15.5 (LmjF.15.1470) que en conjunto forman un complejo que permite dirigir la metilación, posicionando la subunidad catalítica en el RNA objetivo, al contactar simultáneamente el RNA guía y la Fibrilarina (Rodríguez-Corona et al., 2018). Adicionalmente, se encontró la S-adenosil-L-metionina sintetasa (LmjF.30.3520), capaz de catalizar en todos los organismos vivos la síntesis del metabolito S-adenosilmetionina (AdoMet) que funge como donante principal de grupos metilo para reacciones de transmetilación en sistemas eucariontes (Reguera et al., 2002).

Los snoRNA de caja H/ACA guían la isomerización de uridinas a partir de la pseudouridina sintasa Cbf5. Los cuatro elementos (Cbf5, Lmjf.21.1760; GAR, Lmjf.34.4290; Nop10, Lmjf.36.0340; y NHP2, Lmjf.34.3980) que forman el core

proteico asociado con esta clase de snoRNAs también fueron identificados. Es de relevancia mencionar que en *T. brucei* y *L. major* hay una expresión elevada de snoRNA de caja C/D y H/ACA durante su estadio en torrente sanguíneo del hospedero, y se sugiere que las hipermodificaciones en el rRNA como la metilación y la pseudouridilación les permite hacer frente a los cambios de temperatura durante el ciclo entre la etapa procíclica (26°C) y la forma del torrente sanguíneo (37°C). Se sabe que la hipermetilación del RNA es un fenómeno que ocurre en plantas y organismos termófilos y permite mantener la función de los ribosomas a altas temperaturas, de manera que estos mecanismos epigenéticos podrían conllevar una función dual en tripanosomátidos: ajustar la estructura del ribosoma para optimizar la función en el hospedero mamífero y prevenir la activación de los receptores tipo Toll, lo que contribuye a una reducción en la inmunidad innata del hospedero (Shanmugha et al., 2019).

Se identificaron otras proteínas que participan en el procesamiento del rRNA de los parásitos tripanosomátidos. Algunas proteínas Pumilio (PUF) se unen a las regiones 3'-UTR de los mRNA, actuando para reprimir la traducción y promover la degradación; otras están involucradas en la maduración del RNA ribosómico. Se identificó a PUF7 (LmjF.32.1750) que tiene un papel en el procesamiento del pre-rRNA y en la reorganización de proteínas ribosomales durante el ensamblaje de subunidades pequeñas (Droll et al., 2010). Otra proteína de interés estudiada en *T. brucei* es PUF10 (LmjF.11.0470), los experimentos de iRNA dieron como resultado niveles reducidos del RNA 5.8S maduro, así como del precursor inmediato de esta molécula (Shumann et al., 2013).

Las GTPasas son reguladores clave de muchos procesos celulares, algunos están involucrados directamente en la biogénesis ribosomal. La GTPasa Nog1 (LmjF.33.1870) está muy bien conservada evolutivamente y se asocia con partículas pre-60S desde la etapa nucleolar hasta la citoplasmática. Sin embargo, aún no es clara cuál es su función específica y qué eventos son desencadenados por su hidrólisis de GTP. Otra GTPasa identificada en este trabajo fue Nog2

(LmjF.05.0460) que también se asocia con subunidades ribosómicas pre-60S en el nucléolo y resulta necesaria para su exportación, ensamblaje y maduración (Kressler et al., 2010).

Las proteínas de choque térmico (Hsps) se identificaron por primera vez como proteínas cuya síntesis subyace al estrés ocasionado por condiciones medioambientales, tales como la temperatura. Posteriormente, se identificó que también están directamente involucradas en la biogénesis de proteínas. En este caso, Hsp70 (LmjF.28.2770) interactúa con proteínas plegadas de forma incompleta, como las cadenas nacientes de los ribosomas (Craig et al., 1993).

Una gran cantidad de cinasas están implicadas en la biogénesis de los ribosomas, pues se ha determinado que tienen un papel predominante en la formación de la subunidad ribosomal 40S (Kressler et al., 2010). En *S. cerevisiae*, el agotamiento genético de la adenilato cinasa Fap 7 provoca la acumulación del pre-rRNA 20S en rRNA 18S (Granneman et al., 2005). En este trabajo copurificamos el ortólogo de esta adenilato cinasa (LmjF.21.1250). Es relevante mencionar que en *T. cruzi* se demostró que esta adenilato cinasa nuclear igualmente se encuentra ligada al procesamiento del 18S rRNA mediante la interacción con la proteína ribosomal Rps24 (Cámara et al., 2013). Por medio de la purificación por afinidad en tándem se identificaron algunas cinasas de las cuales no se han descrito funciones relacionadas con la biogénesis ribosomal, sin embargo, no descartamos que alguna de estas proteínas pudiera estar involucrada en este proceso. Son necesarios futuros estudios para comprobar esta hipótesis.

Otro tipo de cofactores importantes son las helicasas de RNA de caja DEAD, ya que se ha demostrado que contribuyen en todos los aspectos del metabolismo del RNA desde la degradación, regulación de la traducción y edición del RNA (Martin et al., 2013). Recientemente se ha caracterizado en *L. infantum* una RNA helicasa de 67 kDa (Hel67) y se ha demostrado que previene la degradación del RNA ribosómico. El agotamiento genómico de Hel67 afecta el crecimiento de

promastigotes y reduce la diferenciación de amastigotes de *L. infantum*. El papel de Hel67 en *L. donovani* se estudió mediante la construcción de mutantes nulos y se confirmó su eficacia profiláctica como candidata a vacuna viva atenuada contra la leishmaniasis visceral realizada en un modelo de hámster (Chandra et al., 2020). Interesantemente en este estudio se logró purificar el ortólogo de esta RNA helicasa (LmjF.32.0400), esto sugiere su participación en la síntesis de las subunidades ribosomales. Cabe la posibilidad de que experimentos de delección y mutación hacia Hel67 de *L. major* puedan influir en el ciclo de vida del parásito y con ello, representar una posibilidad de usarse como blanco terapéutico contra alguna de las manifestaciones clínicas ocasionadas por esta especie.

Estudios realizados en *S. cerevisiae* han permitido determinar que las ATPasas de tipo AAA Rix 7, Rea1/ Mdn1 y Drg1/ Afg2, son esenciales para la biogénesis ribosomal, debido que se encargan de disociar factores ribosómicos de ensamble unidos a las partículas pre-60S, lo cual favorece que ocurran las subsiguientes etapas para generar la versión madura de la subunidad mayor (Kressler et al., 2010). Aquí, nosotros identificamos algunas AAA-ATPasas que funcionan como factor de replicación *clamp loader* (RFC1, RFC3 y RFC5), que facilitan la replicación procesiva del DNA (Yao & O'Donnell, 2012).

Entre las proteínas que fueron copurificadas con LmFib hay un número nutrido de proteínas hipotéticas, muchas de las cuales no guardan parecido con ningún ortólogo involucrado en la biogénesis del ribosoma. En la información contenida en la página del genoma de los tripanosomátidos observamos que en algunos ortólogos de estas proteínas en *T. brucei* son de localización mitocondrial, relacionadas directamente con las subunidades ribosomales contenidas en mitocondrias. Minoritariamente, se identificó que algunas de estas proteínas hipotéticas presentan localización nuclear (LmjF.30.0090, Lmjf.34.2485) y nucleolar (LmjF.04.0490, LmjF.05.0340) lo cual podría sugerir que tienen un papel potencial en la síntesis de las subunidades ribosomales.

Dentro del conjunto de proteínas identificadas en el espectrómetro de masas y por análisis bioinformáticos está un grupo particular cuya localización celular puede ser la mitocondria, los glicosomas, la membrana, el retículo endoplásmico o el citoplasma. La función que desempeñan estas moléculas en *L. major* aparentemente no está asociada con la biogénesis del ribosoma. Por este par de motivos, y debido a que es común que algunas proteínas abundantes del parásito puedan ser aisladas durante las purificaciones por afinidad en tándem, nosotros las consideramos como “contaminantes”. Sin embargo, debemos aclarar que no excluimos que podrían jugar algún rol relacionado con la síntesis de la subunidad 40S y 60S. Evidentemente, estudios futuros nos permitirán entender el verdadero papel de estas proteínas “contaminantes” y así poder descartarlas una por una, si su función es extraribosomal.

Es de relevancia mencionar que generar la línea celular LmFib-PTP y llevar a cabo la identificación de proteínas que establecen una asociación con Fibrilarina de *L. major* sirve como un parteaguas para el entendimiento del procesamiento único del rRNA de tripanosomátidos, el estudio de este mecanismo atípico y la cantidad de moléculas involucradas resulta factible para dilucidar la vía compleja de la biogénesis ribosomal en estos parásitos.

7. Conclusiones y logros

- LmFib presenta los dominios conservados en los ortólogos de otras especies: el dominio metil transferasa y la región GAR, rica en residuos de glicina y arginina.
- La estructura tridimensional predicha de LmFib presenta una homología alta con la reportada para Fibrilarina de *S. cerevisiae*. El dominio metil transferasa se encuentra muy bien conservado entre ambas especies.
- Se obtuvieron líneas celulares que expresan a la proteína LmFib fusionada a la etiqueta PTP.
- El ensayo de inmunofluorescencia indirecta de parásitos promastigotes hace constatar que LmFib se restringe a una única región de la célula: el nucléolo.
- El ensayo de purificación por afinidad en tándem nos permitió aislar las dos isoformas de LmFib anotadas en el genoma de *L. major*. Este evento es de interés debido a que nos indica que ambas proteínas se expresan y pueden formar parte de las snoRNPs.
- Más de 130 ortólogos descritos en levadura y humano que participan en alguna etapa de la biogénesis ribosomal fueron identificados en extractos proteicos obtenidos de la línea celular LmFib-PTP.
- De manera interesante se encontraron proteínas nuevas, de las que no han sido descritos ortólogos en otras especies y que pueden representar potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis.
- Fueron co-purificadas varias moléculas con función extra-ribosomal que están implicadas en la síntesis y procesamiento del mRNA, en respuesta a estrés calórico y en replicación. Esto nos sugiere que en *L. major* el nucléolo es un cuerpo nuclear multifuncional, fenómeno que ha sido descrito en otros eucariontes.

8. Referencias bibliográficas

- Ahluwalia, S., D Lawn Stephen., Kanagalingam, J., Grant, H., y Lockwood, DN. (2004). Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. *BMJ*, 329(7470), 842-844.
- Akhoundi M., Kuhls K., Cannet A., Votýpka J., Marty P., Delaunay, P., y Sereno, D. (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 43-49.
- Alemayehu, B., y Alemayehu M. (2017). Leishmaniasis: A review on parasite, vector and reservoir Host. *Health Sci J*, 1(4), 519.
- Aris, J. P., y Blobel, G. (1991). cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), 931–935.
- Ayub, M. J., Atwood, J., Nuccio, A., Tarleton, R., y Levin, M. J. (2009). Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(1), 30–34.
- Bañuls, A., Hide, M., y Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniasis: parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 455-458.
- Barth, S., Shalem, B., Hury, A., Tkacz, I. D., Liang, X. H., Uziel, S., Myslyuk, I., Doniger, T., Salmon-Divon, M., Unger, R., y Michaeli, S. (2008). Elucidating the role of C/D snoRNA in rRNA processing and modification in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell*, 7(1), 86–101.
- Bates, P. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097-1106.

- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., y Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), 574–585.
- Brandenburg, J., Schimanski, B., Nogoceke, E., Nguyen, T. N., Padovan, J. C., Chait, B. T., Cross, G. A., y Günzl, A. (2007). Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. *The EMBO journal*, 26(23), 4856–4866.
- Cámara, M., Bouvier, L. A., Canepa, G. E., Miranda, M. R., & Pereira, C. A. (2013). Molecular and functional characterization of a *Trypanosoma cruzi* nuclear adenylate kinase isoform. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(2), e2044.
- Campbell, D. A., Kubo, K., Clark, C. G., y Boothroyd, J. C. (1987). *Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. Journal of Molecular Biology*, 196(1), 113–124.
- Cavalcanti, D. P., y de Souza, W. (2018). The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning*, 9603051.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. Leishmaniasis. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. Leishmaniasis: resources for health professionals. Recuperado de https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2015. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de leishmaniasis. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud%7Ccenaprece/documentos/manual-para-el-diagnostico-tratamiento-y-control-de-las-leishmaniasis-156615>
- Choi, J., y El-Sayed, N. M. (2012). Functional genomics of trypanosomatids. *Parasite Immunology*, 34(2-3), 72–79.
- Córdova-Uscanga, C., Albertos-Alpuche, N., Andrade-Narváez, F., y Canto-Lara, S. (1993). Leishmaniasis: estudio epidemiológico preliminar en una

localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. *Salud Pública de México*, 35(4), 345-350.

- Craig, E. A., Gambill, B. D., y Nelson, R. J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiological reviews*, 57(2), 402-414.
- Dieci, G., Preti, M., y Montanini, B. (2009). Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*, 94(2), 83–88.
- Doniger, T., Michaeli, S., y Unger, R. (2009). Families of H/ACA ncRNA molecules in trypanosomatids. *RNA biology*, 6(4), 370–374.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F., y Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967–970.
- Droll, D., Archer, S., Fenn, K., Delhi, P., Matthews, K., & Clayton, C. (2010). The trypanosome Pumilio-domain protein PUF7 associates with a nuclear cyclophilin and is involved in ribosomal RNA maturation. *FEBS letters*, 584(6), 1156–1162.
- Dubois M.L., y Boisvert F.M. (2016). The Nucleolus: Structure and Function. En D. Bazett-Jones y G. Dellaire, *The Functional Nucleus* (pp. 29-49). Springer, Cham.
- Dunbar, D. A., Wormsley, S., Lowe, T. M., y Baserga, S. J. (2000). Fibrillarin-associated box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. Sequence conservation and implications for 2'-O-ribose methylation of rRNA. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), 14767–14776.
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M., y Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4), 430–442.
- Faktorová, D., Bär, A., Hashimi, H., McKenney, K., Horák, A., Schnauffer, A., Rubio, M., Alfonzo, J. D., y Lukeš, J. (2018). TbUTP10, a protein involved in

early stages of pre-18S rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 225, 84–93.

- Farley, K. I., Surovtseva, Y., Merkel, J., y Baserga, S. J. (2015). Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma*, 124(3), 323–331.
- Fernandes, J., Prado, J., y de Souza. (2014). Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. En A, Santos., M, Branquinha., C, Avila-Levy., y L, Kneipp. (Eds.), *Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer.
- Florencio-Martínez, L. E., Cano-Santiago, A., Mondragón-Rosas, F., Gómez-García, M., Flores-Pérez, C., Román-Carraro, F. C., Barocio-Rodríguez, L. A., Manning-Cela, R. G., Nepomuceno-Mejía, T., & Martínez-Calvillo, S. (2021). Participation of TFIIIB Subunit Brf1 in Transcription Regulation in the Human Pathogen *Leishmania major*. *Genes*, 12(2), 280.
- Goodfellow, S. J., y Zomerdijk, J. C. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Sub-cellular biochemistry*, 61, 211–236.
- Goto, H., y Lauletta Lindoso, J. A. (2012). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious disease clinics of North America*, 26(2), 293–307.
- Granneman, S., Nandineni, M. R., y Baserga, S. J. (2005). The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Molecular and cellular biology*, 25(23), 10352–10364.
- Guerrero-Sánchez, E., Cevallos, A. M., Martínez-Calvillo, S., López-Villaseñor, I., y Hernández, R. (2015). Relocation of nucleolar fibrillarin in *Trypanosoma cruzi* during stationary phase. *Parasitology Open*, 1, 1-8.
- Günzl, A., y Schimanski, B. (2009). Tandem affinity purification of proteins. *Current protocols in protein science*, 55(1), 19-19.
- Gutierrez, Y. (2000). *Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations*. Nueva York, Estados Unidos de América, Oxford University Press.

- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O' Donohue, M.F., Chakraborty, A., y Gleizes, P.E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *WIREs RNA*, 6, 225-242.
- Hernández, R., y Cevallos, A. M. (2014). Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitology research*, 113(7), 2415–2424.
- 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., Borzým, K., Bothe, G., ... Myler, P. J. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 436–442.
- Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W., y Taliansky, M. (2007). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 11115–11120.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J. P., Caizergues-Ferrer, M., y Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, 85(7), 1077–1088.
- Klinge, S., y Woolford, J. L., Jr (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(2), 116–131.
- Kopp, K., Gasiorowski, J. Z., Chen, D., Gilmore, R., Norton, J. T., Wang, C., Leary, D. J., Chan, E. K., Dean, D. A., y Huang, S. (2007). Pol I transcription and pre-rRNA processing are coordinated in a transcription-dependent manner in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 18(2), 394–403.
- Kressler, D., Hurt, E., y Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(6), 673–683.
- Li Y. (2011). The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnology letters*, 33(8), 1487–1499.

- Liang, J., Wen, J., Huang, Z., Chen, X. P., Zhang, B. X., y Chu, L. (2019). Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 587.
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., y Michaeli, S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic cell*, 2(5), 830–840.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., y Martin, K. (2016). *Biología celular y molecular* (7a ed). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lopes, H., Souto-Padróni, T., Díaz, A., Gomez, T., Rodríguez, C., Zimmermann, T., Alves, L., y Vermelho, B. (2010). Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *The open parasitology Journal*, 4, 40-59.
- López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M., y Jiménez-García, L. F. (2005). Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 11(4), 293–299.
- Lukeš, D., Guilbride, L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R. y Paul T. (2002). Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell*, 1 (4), 495-502.
- Martin, R., Straub, A. U., Doebele, C., y Bohnsack, M. T. (2013). DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. *RNA biology*, 10(1), 4–18.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E. y Nepomuceno-Mejía, T. (2019). Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa. *Cells*, 8(5), 421.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J., Padilla-Mejía, N. E., Román-Carraro, F. C., Flores-Pérez, C., Manning-Cela, R. G., y Figueroa-Angulo, E. E. (2012). Estructura genómica y regulación de la expresión genética en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara,

Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia (pp. 47 – 79). Editorial Académica Española.

- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., y Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 525241.
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., y Myler, P. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular cell*, 11(5), 1291-1299.
- Massenet, S., Bertrand, E., y Verheggen, C. (2017). Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA biology*, 14(6), 680–692.
- Mauricio, L. (2018). *Leishmania* Taxonomy. En F, Bruschi. y L, Gradoni (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer.
- Michels, P., Bringaud, F., Herman, M., y Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta (BBA)- Molecular cell research*, 1763 (12), 1463-1477.
- Monnerat, S., Martinez-Calvillo, S., Worthey, E., Myler, P. J., Stuart, K. D., y Fasel, N. (2004). Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Molecular and biochemical parasitology*, 134(2), 233–243.
- Myler, P. J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A., y Stuart, K. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2902–2906.
- Nepomuceno-Mejia, T., Lara-Martinez, R., Cevallos, A.M., Lopez-Villasenor, I., Jimenez-Garcia, L.F., y Hernandez, R. 2010. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: A morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol. Lett*, 313, 41–46.

- Nepomuceno-Mejía, T., Lara-Martínez, R., Hernández, R., Segura-Valdez, M., y Jiménez-García, L. F. (2016). Nucleogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 22(3), 621–629.
- Nguyen, T. N., Müller, L. S., Park, S. H., Siegel, T. N., y Günzl, A. (2014). Promoter occupancy of the basal class I transcription factor A differs strongly between active and silent VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research*, 42(5), 3164–3176.
- Nguyen, T. N., Schimanski, B., y Günzl, A. (2007). Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Molecular and cellular biology*, 27(17), 6254–6263.
- Núñez-Villacís, L., Wong, M. S., Ferguson, L. L., Hein, N., George, A. J., y Hannan, K. M. (2018). New roles for the nucleolus in health and disease. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 40(5), e1700233.
- Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H., y Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the cell*, 54(2), 123–133.
- Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T., y Gull, K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, 108(8), 501–513.
- Ojha, S., Malla, S., y Lyons, S. M. (2020). snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *Biomolecules*, 10(5), 783.
- Padilla-Mejía, N.E., Gómez-Hurtado, C.M., Sánchez-Santamaría, I. I., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G., y Martínez-Calvillo, S. 2013. Comparative genomics of *Leishmania* parasites. En C. López-Camarillo y L.A. Marchat, Comparative genomics in neglected human parasites (pp. 59-80). Nova Biomedical.
- Pan American Health Organization (PAHO). 2012. Leishmaniasis visceral. Recuperado de

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=es

- Pandey, S. C., Pande, V., y Samant, M. (2020). DDX3 DEAD-box RNA helicase (Hel67) gene disruption impairs infectivity of *Leishmania donovani* and induces protective immunity against visceral leishmaniasis. *Scientific reports*, 10(1), 18218.
- Pereira, D., Da Rocha, M. y Utsch, D. (2011). Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 77(3), 380-384.
- Pérez-Arellano, J., Carranza-Rodríguez, C., Cordero-Sánchez, M., y Muro, A. (2010). Infecciones por protozoos hemoflagelados I: leishmaniosis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10 (54), pp. 3621-3631.
- Quinternet, M., Chagot, M. E., Rothé, B., Tiotiu, D., Charpentier, B., y Manival, X. (2016). Structural Features of the Box C/D snoRNP Pre-assembly Process Are Conserved through Species. *Structure*, 24(10), 1693–1706.
- Raska, I., Ochs, R. L., Andrade, L. E., Chan, E. K., Burlingame, R., Peebles, C., Gruol, D. y Tan, E. M. (1990). Association between the nucleolus and the coiled body. *Journal of structural biology*, 104(1-3), 120–127.
- Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., Pérez-Pertejo, Y., Fernández, F. J., García-Estrada, C., Cubría, J. C., Ordóñez, C., y Ordóñez, D. (2002). Cloning expression and characterization of methionine adenosyltransferase in *Leishmania infantum* promastigotes. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), 3158–3167.
- Rodríguez-Corona, U., Sobol, M., Rodríguez-Zapata, L.C., Hozak, P., y Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the Cell*, 107 (6), 159-174.
- Rohmoser, M., Hölzel, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., y Eick, D. (2007). Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization

and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Molecular and cellular biology*, 27(10), 3682–3694.

- Russell, J., y Zomerdijk, J. C. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends in biochemical sciences*, 30(2), 87–96.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N., y Günzl, A. (2005). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryotic cell*, 4(11), 1942-1950.
- Schöfer, C., y Weipoltshammer, K. (2018). Nucleolus and chromatin. *Histochemistry and Cell Biology*, 150, 209-225.
- Schumann Burkard, G., Käser, S., de Araújo, P. R., Schimanski, B., Naguleswaran, A., Knüsel, S., Heller, M., y Roditi, I. (2013). Nucleolar proteins regulate stage-specific gene expression and ribosomal RNA maturation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology*, 88(4), 827–840.
- Secretaria de Salud. (2016). Leishmaniasis, Acciones y programas. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis>
- Shalev-Benami, M., Zhang, Y., Matzov, D., Halfon, Y., Zackay, A., Rozenberg, H., Zimmerman, E., Bashan, A., Jaffe, C. L., Yonath, A., y Skiniotis, G. (2016). 2.8-Å Cryo-EM structure of the large ribosomal subunit from the eukaryotic parasite *Leishmania*. *Cell reports*, 16(2), 288–294.
- Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., y Sheval, E. V. (2016). Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin: Evolution of Structure and Functions. *Biochemistry. Biokhimiia*, 81(9), 941–950.
- Sloan, K. E., Warda, A. S., Sharma, S., Entian, K. D., Lafontaine, D., y Bohnsack, M. T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA biology*, 14(9), 1138–1152.
- Snaar, S., Wiesmeijer, K., Jochemsen, A. G., Tanke, H. J., y Dirks, R. W. (2000). Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells. *The Journal of cell biology*, 151(3), 653–662.

- Stępiński, D. (2018). The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 150, 607-629.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., y Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1301–1310.
- Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., An, W., Lan, P., Tan, D., Chen, R., Wang, B., Zheng, S., Zhang, C., Chen, X., Zhang, W., Chen, J., Dong, M. Q., y Ye, K. (2017). Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *eLife*, 6, e22086.
- Sundar S. (2015). Visceral leishmaniasis. *Tropical parasitology*, 5(2), 83–85.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S. C., Sylvestersen, K. B., Nelson, C. J., Nielsen, M. L., y Kouzarides, T. (2014). Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature*, 505(7484), 564–568.
- Thiry, M., Lamaye, F., y Lafontaine, D. L. (2011). The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus*, 2(4), 289–293.
- Timsit, Y., Sergeant-Perthuis, G., y Bennequin, D. (2021). Evolution of ribosomal protein network architectures. *Scientific reports*, 11(1), 625.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., y Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72(3), 443–457.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., y Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72(3), 443–457.
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, MR., Ruiz-Esmenjaud, J., y Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 6(F1000 Faculty Rev),750.

- Tsekrekou, M., Stratigi, K., y Chatzinikolaou, G. (2017). The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1411.
- Valero, N.N., y Uriarte, M. (2019). Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology Research*, 119, 365–384.
- Vargas, F., Torres, E., Arenas, R., y Quintanilla, M. (2011). Leishmaniasis en México. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 39(4), 163-183.
- Vera-Izaguirre, D., Vega-Memije, E., Quintanilla-Cedillo, M., y Arenas, R. (2006). Leishmaniasis: revisión. *Dermatología CMQ*, 4(4), 252-260.
- Vidal, J., y de Souza, W. (2017). Morphological and Functional Aspects of Cytoskeleton of Trypanosomatids, Cytoskeleton. En J. C. Jimenez-Lopez (Ed.), *Structure, Dynamics, Function and Disease*. Londres, Inglaterra: IntechOpen.
- World Health Organization (WHO). (2010). Control of the leishmaniasis, technical report series, 949.
- World Health Organization (WHO). 2019. Leishmaniasis. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Yao, N. Y., y O'Donnell, M. (2012). The RFC clamp loader: structure and function. *Sub-cellular biochemistry*, 62, 259–279.
- Ye, K., Jia, R., Lin, J., Ju, M., Peng, J., Xu, A., y Zhang, L. (2009). Structural organization of box C/D RNA-guided RNA methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13808–13813.
- Zea, D., Prager, M., Figueroa, R.A., y Miranda, M.C. (2009). Complicación mucosa de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica*, 29, 9-11.
- Zhang, X., Lai, M., Chang, W., Yu, I., Ding, K., Mrazek, J., Ng, H. L., Yang, O. O., Maslov, D. A., y Zhou, Z. H. (2016). Structures and stabilization of kinetoplastid-specific split rRNAs revealed by comparing leishmanial and human ribosomes. *Nature communications*, 7, 13223.

