UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de la NICOTINAMIDA/NICOTINATO MONONUCLEÓTIDO ADENILIL TRANSFERASA de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT): Hacia la Caracterización de un potencial blanco quimioterapéutico.

William Alexander Pérez Mancipe

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2023

Estudio de la NICOTINAMIDA/NICOTINATO MONONUCLEÓTIDO ADENILIL TRANSFERASA de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT): Hacia la Caracterización de un potencial blanco quimioterapéutico.

William Alexander Pérez Mancipe

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Directora:
Dr. rer. Nat. Maria Helena Ramírez Hernández

Línea de Investigación:
Bioquímica
Grupo de Investigación:
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica – LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Química.
A la Profesora María Helena Ramírez, por todas sus enseñanzas, su paciencia y por hacerme llega cada vez más lejos de los que pensé que podía.
Al Profesor Luis Ernesto Contreras, excelente profesor, con el que siempre tuve una mano amiga en este proceso de formación.
A la Doctora Magda Elvira Alvarado por sus consejos y enseñanzas.
Mis compañeros del LIBBIQ-UNAL Sharon, Laura, Luisa, Cristian, Valentina, Esteban, Miguel, Cony, Luis David y Brayan. Con los cuales he aprendido y compartido momentos que atesorare el resto de mi vida, gracias. Luchadores todos.
A Rosalba por apoyarme en la gestión administrativa necesaria, para llevar a cabo esta investigación.
A mi esposa, compañera de vida, por hacer parte de esta búsqueda de ser mejores cada día.

Resumen

Estudio de la NICOTINAMIDA/NICOTINATO MONONUCLEÓTIDO ADENILIL TRANSFERASA de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT): Hacia la Caracterización de un potencial blanco quimioterapéutico.

La leishmaniasis es un problema de salud pública en los países donde se presenta de manera endémica [1]. La búsqueda de fármacos de baja toxicidad para el paciente y la identificación de nuevos blancos terapéuticos, han sido unas de las estrategias de lucha en contra de esta parasitemia. El Laboratorio de investigaciones básicas en bioquímica (LIBBIQ), ha concentrado su interés en el metabolismo del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD^+) en *Leishmania braziliensis*, específicamente en la enzima central de su metabolismo, la Nicotinamida Mononucleotido Adenilil Transferasa (LbNMNAT). Resaltando sus características como posible blanco terapéutico por su papel fundamental en el metabolismo del parásito y su supervivencia [2]. Por ello se consideró de relevancia continuar con la caracterización de la LbNMNAT, una enzima central en el metabolismo del NAD+.

En este trabajo se emplearon diversas estrategias metodológicas bioinformáticas y experimentales. Inicialmente se emplearon promastigotes para evaluar el efecto que tendrían algunos derivados imidazolicos sobre su viabilidad, para ello se empleo el método colorimétrico (MTT), hallando efecto con el ketoconazol con un IC50 de 27,9 µM; también se planteó una propuesta metodología utilizando la Proteína verde fluorescente para evaluar estos efectos [3], [4].

Se generaron proteínas recombinantes para analizar el efecto de los derivados imidazolicos sobre la actividad catalítica de la LbNMNAT. Se encontró inhibición con los derivados benzimidazólicos (fenbendazol y el mebendazol) en concentraciones micromolares, lo cual podría estar relacionado con las bajas energías de unión que fueron predichas en el acoplamiento molecular para estos compuestos.

Finalmente, en busca de caracterizar estructuralmente a la LbNMNAT, se analizó el efecto de la fosforilación como mecanismo de regulación enzimática; empleando análisis bioinformáticos, se predijo el residuo serina 210 como el sitio más probable de ser fosforilado.

Para el estudio de la fosforilación de la LbNMNAT se emplearon herramientas de biología molecular; mediante mutagénesis dirigida se generó el mutante fosfomimético LbNMNAT S210D, el cual corresponde a una región especifica de la proteina del parásito. El análisis del efecto de la mutación fosfomimética sobre la actividad adenilil transferasa de la enzima, evaluado por ensayos enzimáticos directos (RP-HPLC), no mostro diferencias respecto a la proteina nativa. Sin embargo, es necesario explorar el efecto que podría tener esta modificación sobre otras posibles funciones de la Lb-NMNAT, que se encuentran en investigación tales como la actividad chaperona.

.

Palabras clave: *Leishmania braziliensis,* nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) y mutantes fosfomiméticos.

Abstract

Study of the NICOTINAMIDE/NICOTINATE MONONUCLEOTIDE ADENYLYLTRANSFERASE of *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT): Towards the Characterization of a potential chemotherapeutic target.

Leishmaniasis is a public health problem in countries where it is endemic [1]. The search for drugs with low toxicity for the patient and the identification of new therapeutic targets have been some of the strategies to combat this parasitemia. The Basic Research Laboratory in Biochemistry (LIBBIQ) has focused its interest on the metabolism of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD+) in *Leishmania braziliensis*, specifically on the central enzyme of its metabolism, Nicotinamide Mononucleotide Adenylyl Transferase (LbNMNAT). Highlighting its characteristics as a possible therapeutic target due to its fundamental role in the metabolism of the parasite and its survival [2]. For this reason, it was considered relevant to continue with the characterization of LbNMNAT, a central enzyme in the metabolism of NAD+.

Various bioinformatics and experimental methodological strategies were used in this work. Initially, promastigotes were used to evaluate the effect that some imidazole derivatives would have on viability. For this, the colorimetric method (MTT) was used, finding an effect with ketoconazole with an IC50 of 27.9 µM; A proposed methodology using Green Fluorescent Protein to assess these effects was also put forward [3], [4].

Recombinant proteins were generated to analyze the effect of imidazolic derivatives on the catalytic activity of LbNMNAT. Inhibition was found with benzimidazole derivatives (fenbendazole and mebendazole) at micromolar concentrations, which could be related to the low binding energies that were predicted in docking molecular for these compounds.

Finally, seeking to structurally characterize LbNMNAT, the effect of phosphorylation as an enzymatic regulation mechanism was analyzed; using bioinformatic analyses, the serine 210 residue was predicted as the most likely site to be phosphorylated.

Molecular biology tools were used to study the phosphorylation of LbNMNAT; through site-directed mutagenesis, the phosphomimetic mutant LbNMNAT S210D was generated, which corresponds to a specific region of the parasite protein. The analysis of the effect of the phosphomimetic mutation on the adenylyl transferase activity of the enzyme, evaluated

by direct enzymatic assays (RP-HPLC), did not show differences with respect to the native protein. However, it is necessary to explore the effect that this modification could have on other possible functions of Lb-NMNAT, which are under investigation, such as chaperone activity.

Key words: *Leishmania braziliensis*, nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT) and phosphomimetic mutants.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IV**

Lista de figuras ..... **X**

Lista de tablas ..... **XII**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XIII**

1. Introducción **1**

2. Marco Teórico **3**
2.1 La leishmaniasis. 3
2.2 El Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida (NAD^+). 5
2.3 Metabolismo del NAD^+. 6
2.4 Tratamiento de la leishmaniasis. 7
2.5 La Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT EC: 2.7.7.1/18). 9
2.6 Metodologías utilizadas para evaluar la acción antileishmania de diferentes compuestos. 9

3. Antecedentes **11**
3.1 Metabolismo del NAD^+ en *Leishmania braziliensis.* 11
3.2 Uso de derivados Imidazolicos para el tratamiento de la leishmaniasis. 12

4. Planteamiento de la problemática y la pregunta de investigación. **14**

5. Justificación **15**

6. Objetivos **16**
6.1 Objetivo general 16
6.2 Objetivos específicos 16

7. Metodología **17**
7.1 Metodología para explorar el potencial citotóxico de algunos inhibidores imidazolicos sobre cultivos de promastigotes de *L. braziliensis* 18
7.1.1 Cultivo de promastigotes de *L. braziliensis.* 18
7.1.2 Optimización del método colorimétrico MTT para la evaluación de la viabilidad celular. 18
7.1.3 Evaluación de la acción de los imidazoles sobre promastigotes de *L. braziliensis*. 19
7.1.4 Análisis estadístico 19
7.1.5 Generación de parásitos transfectados que expresen de manera constitutiva la GFP. 20
7.2 Metodología para evaluar el efecto de los inhibidores imidazólicos sobre la actividad de la LbNMNAT. 21
7.2.1 Análisis bioinformáticos del efecto de los inhibidores imidazolicos sobre la recombinante LbNMNAT. 21

7.2.2 Expresión, extracción y purificación de la enzima recombinante LbNMNAT. .21
7.2.3 Evaluación de la actividad enzimática de la recombinante LbNMNAT y su uso en los ensayos de inhibición. 22
7.2.4 Análisis estadístico 23
7.3 Metodología para estudiar el efecto de la modificación postraducional de la LbNMNAT mediante el análisis de la actividad enzimática empleando mutantes fosfomiméticos. 23
7.3.1 Aproximación bioinformática 24
7.3.2 Exploración experimental de la existencia de fosforilaciones en la enzima LbNMNAT endógena de *Leishmania braziliensis.* 24
7.3.3 Aproximación experimental: Diseño y creación del mutante mimético. 26

8. Resultados y discusión. 28
8.1 Exploración del potencial citotóxico de algunos inhibidores imidazolicos 28
8.1.1 Estandarización del ensayo de MTT 29
8.1.2 Ensayos colorimétricos para la evaluación del efecto de los derivados imidazolicos sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis.* 34
8.1.3 Generación de cepa transfectante de *L. braziliensis* que exprese de manera constitutiva la GFP, con el fin de evaluar el efecto de los medicamentos con una técnica fluorescente. 37
8.2 Evaluación de efecto de los inhibidores imidazólicos (Fenbendazol, Ketoconazol, Mebendazol y Metronidazol) sobre la actividad enzimática de la proteína recombinante LbNMNAT. 39
8.2.1 Estudios bioinformáticos del efecto de los derivados imidazolicos sobre la LbNMNAT. 39
8.2.2 Estudio experimental del efecto de varios derivados imidazolicos sobre la actividad enzimática de la LbNMNAT. 42
8.3 Estudio de la fosforilación de la His-LbNMNAT mediante el análisis de la actividad enzimática empleando mutantes fosfomiméticos. 48
8.3.1 Estudios *in silico* de la fosforilación de la LbNMNAT. 49
8.3.2 Estudio experimental de la fosforilación de la LbNMNAT. 55

9. Conclusiones y recomendaciones. 63
9.1 Conclusiones 63
9.2 Recomendaciones 64

10. Anexos 66

11. Bibliografía 69

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1. Agente etiológico de la leishmaniasis. 3
Figura 2-2: Ciclo de vida de *Leishmania spp*. 4
Figura 2-3 Estructura del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD+) 5
Figura 2-4: Funciones del NAD+ 6
Figura 2-5 Biosíntesis del NAD+. 7
Figura 2-6 Estructura de algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la Leishmaniasis. 8
Figura 3-1:Trece posibles sitios de fostorilación predichos in silico para la LbNMNAT, con la herramienta NetPhos 3.0. 12
Figura 7-1: Esquema general de la estrategia metodológica 17
Figura 7-2: Esquema de las reacciones analizadas en cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa. 22
Figura 8-1: Curva de crecimiento de *L. braziliensis* en medio Schneider 10 % SBF. 30
Figura 8-2: El SDS presenta los mejores coeficientes de correlación lineal 32
Figura 8-3: Absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de MTT. 33
Figura 8-4: Efecto del ketoconazol sobre promastigotes de *L. braziliensis* en medio Schneider 10% SBF. 35
Figura 8-5: Efecto de derivados imidazolicos sobre promastigotes de *L. braziliensis* en medio Schneider 10% SBF. 36
Figura 8-6: Digestión del plasmido pSP72Rαneoα-GFP, con *HindIII* y *BamHI* 38
Figura 8-7: Moléculas a las cuales se les analizo el efecto sobre la actividad de la LbNMNAT. 40
Figura 8-8: Acoplamiento molecular entre el modelo de la estructura terciaria de la LbNMNAT y los compuestos evaluados. 41
Figura 8-9: Purificación parcial de la Lb-NMNAT por IMAC. 43
Figura 8-10: El sistema heterólogo *E. coli* M15, no exhibe actividad adenilil transferasa. 44
Figura 8-11: Efecto de derivados imidazolicos sobre la actividad adenilil transferasa de la recombinante LbNMNAT. 46
Figura 8-12: Alineamiento de secuencias de la NMNAT de diferentes especies de *Leishmania* y las tres isoformas de la enzima humana. 51
Figura 8-13: Superposición de los modelos de la estructura terciaria de la His-LbNMNAT predichos con el software Robetta. 52
Figura 8-14: Posición de los sitios de fosforilación predichos S210 (rojo) y S256 (azul) en el modelo de la estructura terciaria de la Lb-NMNAT generado con el software Robetta. 53
Figura 8-15: Acoplamiento molecular entre la His-LbNMNAT (Nativa y su versión mutada) con sus sustratos. 54

Figura 8-16: Interacciones moleculares del acoplamiento molecular entre el NMN y la LbNMNAT. 55
Figura 8-17: Inmunoprecipitación de la His-LbNMNAT endógena, empleando anticuerpos aviares Anti His-LbNMNAT. 56
Figura 8-18: Reconocimiento de la LbNMNAT endógena, obtenida de la inmunoprecipitación, con anticuerpos aviares Anti His-LbNMNAT. 57
Figura 8-19: Reconocimiento de la LbNMNAT endógena inmunoprecipitada con anticuerpos anti-fosfoserina. 1: Extracto totales parásitos; 2: fracción soluble lisis parásitos; M: marcador de peso molecular; 3: Proteina Inmunoprecipitada; 4: LbNMNAT recombinante; 5: BSA. Primario anti- αS-fosforilada (ON, 1:1000); secundario anti mouse biotina (1:8000) estreptavidina (1:5000) Fosfatasa alcalina, sustrato NTB 58
Figura 8-20: Generación de la enzima LbNMNAT S210D.....59
Figura 8-21: Purificación de la Lb-NMNAT S210D (37.7 kDa); **por IMAC.**.....60
Figura 8-22: Evaluación de la actividad enzimática del mutante Lb-NMNAT S210D por ensayos directos. 60

Lista de tablas

Pág.

Tabla 8-1: Concentraciones de parásitos obtenidas en curva de crecimiento de *Leishmania braziliensis*, medio Schneider 10% de SBF. 29
Tabla 8-2. Evaluación del isopropanol como disolvente de los cristales de formazan, en ensayo de MTT. 30
Tabla 8-3. Evaluación del DMSO, como disolvente de los cristales de formazan. ... 31
Tabla 8-4. **Evaluación del SDS, como disolvente de los cristales de formazan, en ensayo de MTT**. 31
Tabla 8-5. Coeficiente de correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de parásitos. 31
Tabla 8-6: Absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de MTT, para encontrar la concentración optima de trabajo. 32
Tabla 8-7: Coeficiente de correlación lineal entre las lecturas de absorbancia y concentración de parásitos, a diferentes concentraciones de MTT 33
Tabla 8-8: Comparación del rendimiento en la purificación de la LbNMNAT, de dos protocolos de purificación. 43
Tabla 8-9: Sitios de fosforilación de la His-LbNMNAT, predichos por los servidores NetPhos y Phostryp 49
Tabla 8-10: Validación de los modelos de estructura terciaria de la His-LbNMNAT nativa y su versión His-LbNMNAT S210D. 52
Tabla 8-11: Diferencias en la actividad adenilil transferasa de la LbNMNAT nativa y LbNMNAT S210D. 61

Lista de Símbolos y abreviaturas

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
GFP	Proteína verde fluorescente
IC50	Concentración inhibitoria 50%
L. braziliensis-GFP	*L. braziliensis* que expresa GFP
LbNMNAT	NMNAT de *L. braziliensis*
LC	Leishmaniasis cutánea
LM	leishmaniasis mucosa
LV	Leishmaniasis visceral
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MPT	Modificaciones Postraduccionales
NAAD	Dinucleótido de adenina y ácido nicotínico
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
NMNAT	Nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa
PARPs	poli ADP ribosa polimerasas
PPi	Pirofosfato inorgánico
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa
SDS,	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes

1. Introducción

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos del género Leishmania, tiene tres manifestaciones clínicas principales, la forma cutánea, mucocutanea y la visceral. En 2020, se reportaron en las Américas 39.750 casos de leishmaniasis cutánea (LC) y de leishmaniasis mucosa (LM); y 1.988 casos de leishmaniasis visceral (LV). En Colombia, para el mismo año, se reportaron 6.161 casos entre LC y LM; y 8 casos de LV [5].

Entre los medicamentos más comunes para el tratamiento de esta enfermedad están los antimoniales pentavalentes, pentamidina, ketoconazol y la anfotericina B, a todos ellos se les ha conocido efectos secundarios y mecanismos de resistencia [6]–[8]. La búsqueda de nuevos medicamentos y blancos quimioterapéuticos han sido unas de las estrategias para la lucha en contra de esta enfermedad. En este sentido el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica LIBBIQ, ha centrado su interés en el metabolismo energético de estos parásitos específicamente en el Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD^+), y la enzima central de su metabolismo, la Nicotinamida Mononucleotido Adenilil Transferasa (LbNMNAT), ya que es fundamental para la supervivencia del parásito. Nuestro grupo de investigación ha logrado identificar esa enzima, generarla de manera recombinanante y confirmar su actividad adenilil transferasa, se encontraron inserciones exclusivas en la secuencia que no en encuentran en las ortologas humanas y una localización citosólica; iniciándose así, el proceso de caracterización de la enzima [2], [9]. Adicionalmente en los procesos de purificación enzimática se observó que existía una posible inhibición de la actividad adenilil transferasa de la enzima por el imidazol, que se debían confirmar [10]. Los anteriores antecedentes junto con estudios que manifiestan el potencial uso de los compuesto azolicos para el tratamiento de este tipo de patologías [11], [12], nos llevaron a plantea la pregunta de si el imidazol y otros derivados pudiera tener algún efecto sobre la enzima recombinante y si esto podría llevar a un efecto sobre la viabilidad de los parásitos; para ellos se realizaron ensayo de inhibición de la enzima con estos compuestos y sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis* cultivados en medio Schneider 10%SBF.

Aunque nuestro grupo ha iniciado el estudio de la LbNMNAT, aún es necesario continuar con la caracterización de esta enzima y sus mecanismos de regulación, incluidas las modificaciones postraduccionales (MPT), de las cuales se cuenta con poca información. En relación a la LbNMNAT, un estudio realizado previamente mediante análisis

bioinformático predijo 13 sitios de fosforilación con posible función reguladora que debían ser confirmados de manera experimental [13]. En este trabajo se plantea una continuación de estos estudios, analizando bioinformática y experimentalmente la fosforilación como mecanismo de regulación enzimática, por medio de la generación de mutantes fosfomiméticos en la proteína recombinante y evaluación de la actividad catalítica.

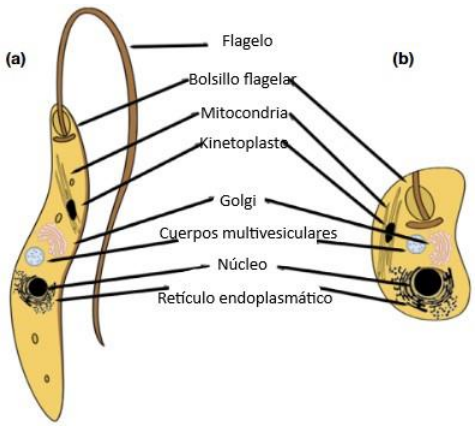
2. Marco Teórico

2.1 La leishmaniasis.

La leishmaniasis es causada por un grupo de parásitos del género *Leishmania* y es transmitida a los seres humanos a través de mosquitos del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo [14]. Los parásitos recientemente se han agrupado en tres subgéneros; sin embargo, solo dos están relacionados con la leishmaniasis humana, los subgéneros *Leishmania y Viannia* [15]; estando su distribución relacionada con las especies vectoras presentes en el ciclo de transmisión [16].

El ciclo de vida del parásito se puede dar en un escenario antroponótico y otro zoonótico más significativo desde el punto de vista de número de casos; en ambas situaciones dos formas parasitarias son observadas; una flagelada extracelular de 15-20 µm que se desarrolla en el intestino del vector llamada promastigotes y una forma intracelular de 3-5 µm, no flagelada, llamada amastigotes presente en el interior de las células fagocíticas del sistema inmune del reservorio o huésped (Fig. 2-1).

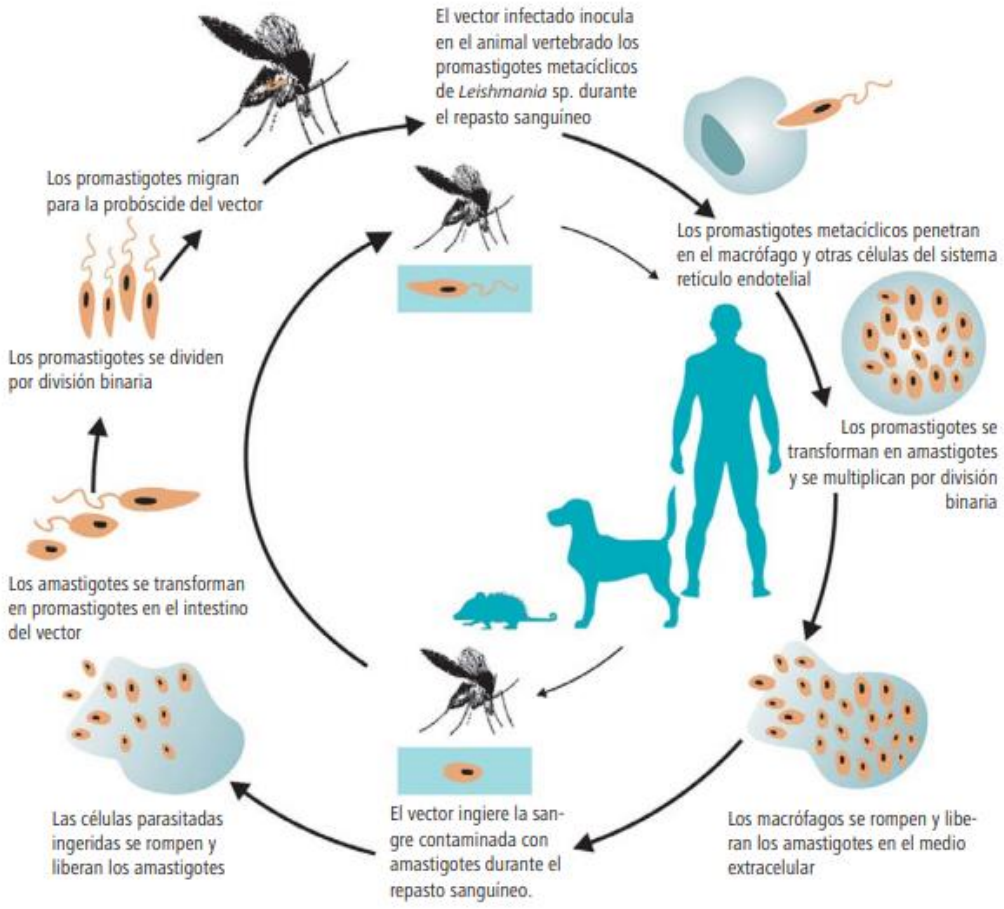
Figura 2-1. Agente etiológico de la leishmaniasis. En (a) la forma extracelular elongada y flagelada de promastigote y en (b) la forma intracelular redondeada sin flagelo de amastigote, se indican las estructuras intracelulares, adaptado de Zulfiqar et al., 2017 [17].



La infección comienza cuando un vector infectado transmite por su picadura los promastigotes al huésped susceptible, entonces los parásitos invaden los macrófagos y

otras células de sistema retículo-endotelial transformándose en amastigotes que se multiplican por división binaria hasta que los macrófagos se rompen, liberando los parásitos para infecta a otras células fagocíticas y ser una fuente de infección para los vectores que se alimentan de la sangre del huésped o reservorio con parásitos circulantes [18], [19] (Fig. 2-2).

Figura 2-2: Ciclo de vida de *Leishmania spp*. Se indica el paso de los parásitos a través del huésped vertebrado y los vectores, con las distintas formas que adquieren dentro de cada etapa del ciclo [19].



La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida y extendida por varios territorios del mundo donde existen las condiciones propicias para su transmisión, se ha estimado que ocurren entre 700.000 y un millón de casos nuevos al año [20]. En 2020, se reportaron en las Américas 39.750 casos de leishmaniasis cutánea (LC) y de leishmaniasis mucosa (LM);

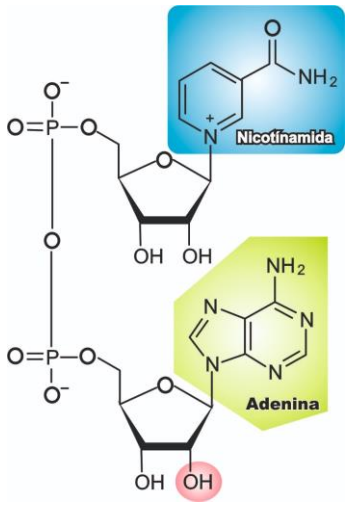
y 1.988 casos de leishmaniasis visceral (LV). En Colombia, para el mismo año, se reportaron 6.161 casos entre LC y LM; y 8 casos de LV [5].

2.2 El Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida (NAD^+).

La molécula de NAD^+ está formada por Adenosina Monofosfato (AMP) y el Mononucleotido de Nicotinamida (NMN), unidos por un enlace fosfoanhídrido (Fig. 2-3) [21].

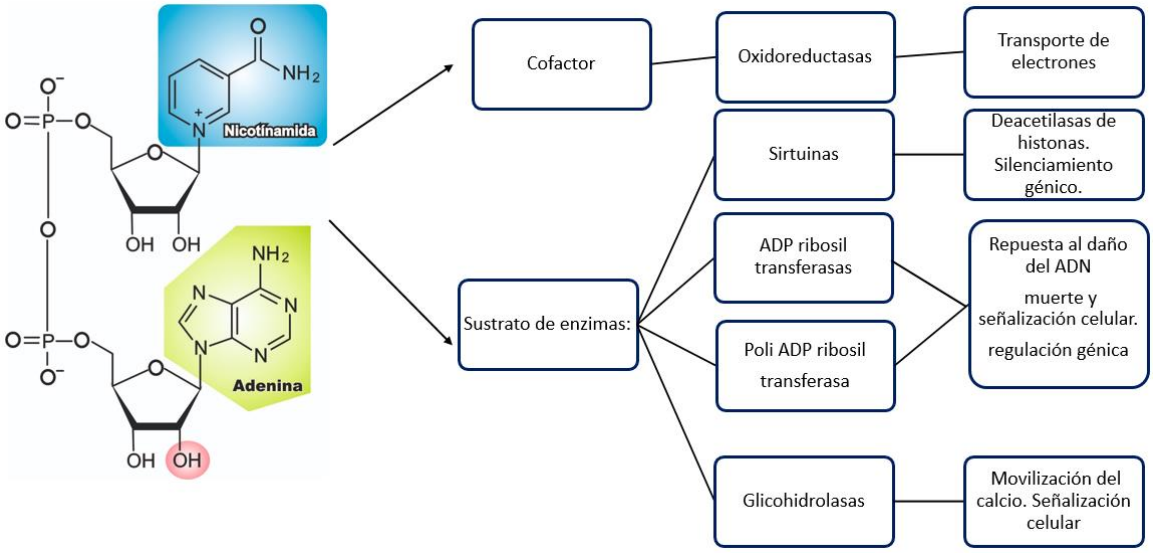
La molécula es un cofactor con un papel primordial en las reacciones de óxido-reducción del metabolismo energético celular; sin embargo, recientemente se han revelado nuevas funciones del NAD^+ como sustrato de varias enzimas que regulan procesos biológicos importantes, destacándose las sirtuinas, poli ADP ribosa polimerasas (PARPs) y las NAD^+ Glicohidrolasas (Fig. 2-4) [22].

Figura 2-3 Estructura del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD+) formada por Adenosina Monofosfato (AMP) y el Mononucleotido de Nicotinamida (NMN), unidos por un enlace fosfoanhídrido.



Las sirtuinas son deacetilasas de histonas involucradas en la regulación transcripcional, reparación del ADN, metabolismo, resistencia al estrés oxidativo, longevidad y regulación del ritmo circadiano; las PARP, regulan la reparación del daño del ADN, la oncogénesis, la diferenciación celular y el metabolismo; y las NAD^+ Glicohidrolasas catalizar la producción de segundos mensajeros que actúan como potentes agentes movilizadores del calcio intracelular [22]–[24].

Figura 2-4: Funciones del NAD+ como cofactor de reacciones enzimáticas y también como sustrato de enzimas que regulan procesos celulares importantes.

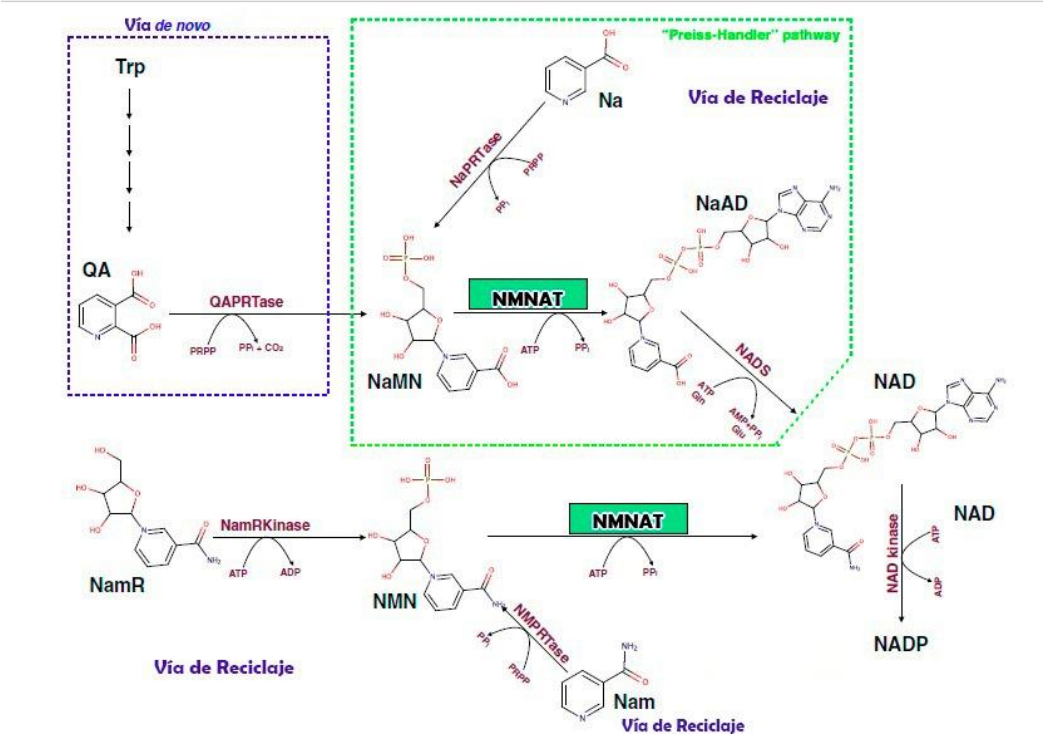


2.3 Metabolismo del NAD$^+$.

La síntesis del NAD$^+$ se lleva a cabo por dos vías, la vía de *novo* y la vía de reciclaje. En eucariotas se utilizan como precursores del NAD el triptófano en la vía de *novo* y en la vía de reciclaje el ácido nicotínico, nicotinamida y nicotinamida ribósido, que mediante reacciones llevadas a cabo por fosforribosiltransferasa especificas se convierten en mononucleótido de ácido nicotínico y mononucleótido de nicotinamida. Los mononucleótido producidos por ambas vías convergen en el siguiente paso, llevado a cabo por la enzima Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT), la cual convierte estos sustratos en el Dinucleótido de adenina y nicotinamida/ácido nicotínico NAD/NAAD respectivamente [24], [25] (Fig. 2-5).

Alteraciones en la homeostasis del NAD$^+$ son características de algunas enfermedades, por ello las enzimas del metabolismo de este dinucleótido son objeto de investigación como potenciales blancos terapéuticos [22].

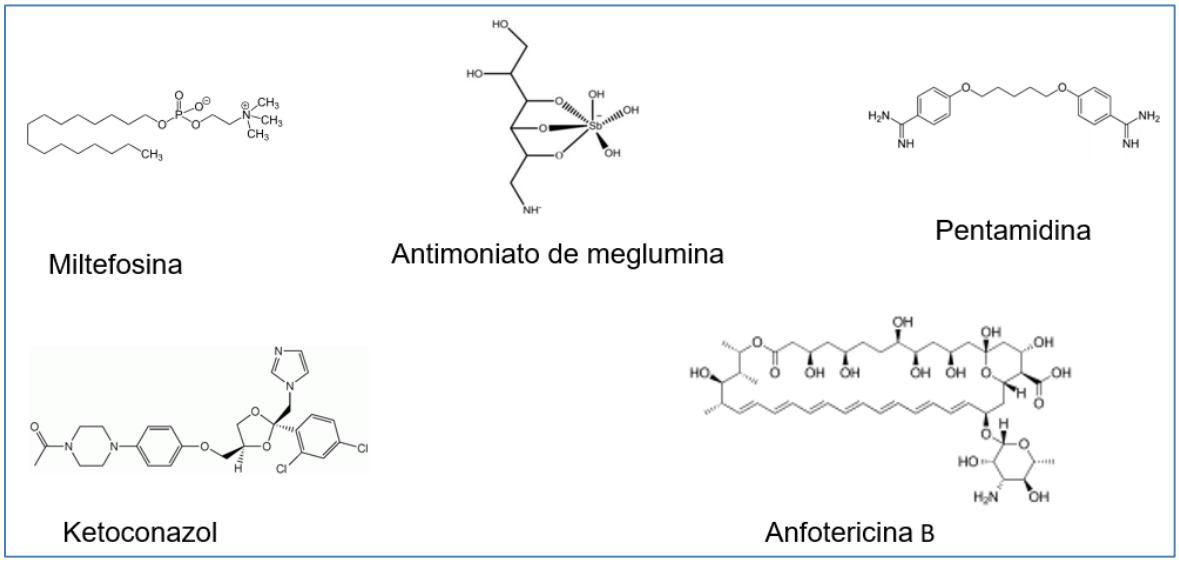
Figura 2-5 Biosíntesis del NAD+. Puede sintetizarse de *novo* a partir del triptófano (Trp) y por la vía de reciclaje desde el ácido nicotínico (Na), nicotinamida (Nam) y ribósido de nicotinamida (NamR). Fosforibosil transferasas específicas actúan sobre estas moléculas para generar el Mononucleotido de ácido nicotínico (NaMN) o mononucleótido de nicotinamida (NMN), sustratos que la NMNAT utiliza junto con el ATP para generar el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) o el dinucleótido de ácido nicotínico y adenina (NaAD), este último es sustrato de la NAD Sintasa (NADS) para generar el NAD^+ [26].



2.4 Tratamiento de la leishmaniasis.

En la leishmaniasis cutánea del viejo mundo las lesiones pueden llegar a curarse por sí solas, a diferencia de lo que sucede en el nuevo mundo donde la enfermedad suele ser más severa y con pocas probabilidades de curarse sin tratamiento [18] Entre los medicamentos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis están los antimoniales pentavalentes, Miltefosina , Isetionato de pentamidina, Ketoconazol y la anfotericina B (Fig. 2-6), sus usos y efectividad varían dependiendo de la forma clínica de la enfermedad y de la cepa de *Leishmania* infectante [19].

Figura 2-6 Estructura de algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la Leishmaniasis.



Los antimoniales pentavalentes fueron el tratamiento estándar para la leishmaniasis en todo el mundo; sin embargo, en los últimos años los parásitos han presentado resistencia al medicamento reduciendo su eficiencia y las drogas de segunda línea para el tratamiento de la enfermedad comienzan a tener problemas de resistencia y toxicidad, por ello el uso de nuevas drogas para la leishmaniasis están bajo investigación [27].

Los compuestos azólicos también se han utilizado para el tratamiento de infecciones tropicales por protozoos, incluyendo la leishmaniasis [28].

Los azoles, una clase de compuestos heterocíclico que contiene uno o más átomos de nitrógeno con o sin algún otro heteroátomo, se han considerado como la estructura base para el diseño de nuevos fármacos [29]. Se clasifican como imidazoles o triazoles cuando tienen 2 y 3 átomos de nitrógeno en sus anillos respectivamente [30] . Estos medicamentos que se utilizaron primeramente como antifúngicos, actúan sobre la enzima lanosterol 14-alfa-desmetilasa involucrada en la síntesis del ergosterol, un esterol que compone la membrana celular de los hongos y algunos tripanosomátidos como la *Leishmania* [31]. Estudios recientes resaltan el potencial de estos medicamentos para el tratamiento de enfermedades parasitarias. En el tripanosomátido *Trypanosoma cruzi* se ha descrito la actividad de los derivados imidazolicos como prometedora para el tratamiento de esta enfermedad [32].

Sin embargo, el mecanismo de acción y uso de los compuestos azolicos varía dependiendo de su estructura molecular; por ejemplo, los benzimidazoles poseen un núcleo benzimidazólico y su mecanismo de acción es sobre la tubulina beta de los parásitos, se utilizan principalmente como antihelmínticos pero sus acciones van más allá, algunos como el fenbendazol tiene actividad sobre *Trichomona vaginalis* y *Giardia intestinalis*; también, se ha reportado su acción bactericida, anticancerígena, insecticida y antimicótica, [33]. Los 5-Nitroimidazoles contienen un grupo nitro en el anillo de imidazol y son usados en parásitos protozoarios como *Trichomona vaginalis* y *Giardia intestinalis*, el mecanismo de acción se basa en su reducción por la enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, formándose un radical nitro tóxico para los parásitos, que rompe los puentes disulfuro de proteínas y daña el ADN [33].

2.5 La Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT EC: 2.7.7.1/18).

La NMNAT es una enzima central en el metabolismo del NAD, ya que en ella confluyen las dos vías se utilizan para la síntesis de este dinucleótido. La NMNAT condensa el ATP (trifosfato de adenosina) al mononucleótido de ácido nicotínico o al mononucleótido de Nicotinamida.

Aunque las NMNATs de diferentes especies no se caracterizan por presentan un alto grado de identidad de secuencia, si comparten una arquitectura estructural común y altamente conservada, tiene un motivo estructural de plegamiento de Rossmann, característico de proteínas de unión a nucleótidos [34]. La NMNAT ha sido reconocida como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de distintas patologías como el cáncer [34], [35].

2.6 Metodologías utilizadas para evaluar la acción antileishmania de diferentes compuestos.

Los parásitos de *Leishmania* pueden ser cultivados en su forma móvil de promastigotes en medios de cultivo líquido o en su forma intracelular de amastigotes en el interior de cultivos

de macrófagos. Entre las técnicas más utilizadas para la evaluación del efecto de los medicamentos sobre el parásito tenemos:

El conteo directo bajo el microscopio, es un método sencillo pero la movilidad de los promastigotes y la presencia de rosetas (grupos de promastigotes que crecen en racimos) complican el procedimiento, es propenso al sesgo del usuario ya que hay interpretación subjetiva; los métodos que utilizan ADN radio marcado, son rápidos y simples pero tienen el inconveniente de requerir la manipulación de componentes radioactivos peligroso para los operarios y el medio ambiente; la citometría de flujo, proporciona resultados muy precisos pero tiene el inconveniente de ser una técnica costosa en materiales, reactivos y equipamiento especializado [17], [36].

La técnica colorimétrica más utilizada es el ensayo de la reducción de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), en este ensayo el MTT es reducido a un compuesto de color azul (formazan) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la cantidad de células vivas es proporcional al formazan formado [37]

Recientes aproximaciones para la evaluación del efecto de los medicamentos sobre los parásitos de *Leishmania* utilizando el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de viabilidad y proliferación celular, han brindado nuevas posibilidades para el desarrollo de modelos de detección de fármacos, ya que estos ensayos tienen la posibilidad de ser automatizados y mejorados hasta el punto de métodos de alto rendimiento [3], [4], [38].

3. Antecedentes

3.1 Metabolismo del NAD^+ en *Leishmania braziliensis.*

La importancia del NAD^+ en el parásito se evidencia por su uso como cofactor en varias reacciones celulares vitales, como el catabolismo de carbohidratos [39], y su uso como sustrato por las sirtuinas [40] y ADP-ribosiltransferasas [41]; sin embargo, no se conocen por completo los mecanismos utilizados en la regulación y biosíntesis del NAD^+ en este parasito y solo unas pocas enzimas involucradas en su metabolismo han sido caracterizadas. Una de ellas, la NMNAT *de Leishmania braziliensis,* fue estudiada en el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, (LIBBIQ), donde fue predicha por medios bioinformáticos y confirmada por métodos experimentales empleando la generación de una enzima recombinante; lo que constituyó un importante avance para dilucidar el metabolismo del NAD^+ en esta especie [42].

La LbNMNAT tiene un peso molecular de 33,7 kDa y una localización citosólica [9]. Esta enzima utiliza como sustrato el mononucleótido de ácido nicotínico y mononucleótido de nicotinamida sin alguna preferencia, como sucede en la NMNAT humana y aunque predicciones bioinformáticas de la estructura de la LbNMNAT sugieren que puede formar oligomeros, hasta el momento no se ha podido corroborar esta información por métodos experimentales [43] quedando la opción de que esta NMNAT no forme estructuras cuaternarias.

Se ha demostrado experimentalmente la interacción de la LbNMNAT con proteínas relacionadas con diversos tipos de actividades como el plegamiento de proteínas, la homeostasis redox, traducción e indudablemente la síntesis del NAD^+ [44].

Las NMNATs del género *Leishmania* presentan secuencias de aminoácidos altamente conservadas entre el género y al compáralas con su ortóloga humana se encuentran inserciones que son exclusivas, una de ellas en la región amino terminal [9] que al ser abolida hace que la enzima recombinante pierda su actividad catalítica, sugiriendo esta región como un posible blanco terapéutico [2].

Adicional a las inserciones exclusivas, con el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la LbNMNAT se han encontrado motivos conservados de unión a ATP. También, por

medio de herramientas bioinformáticas se han predicho 13 sitios de fosforilación con posible función reguladora [13] lo cual está por verificarse experimentalmente (Figura 3-1).

Figura 3-1:Trece posibles sitios de fostorilación predichos in silico para la LbNMNAT, con la herramienta NetPhos 3.0. Se indican la posición de cada residuo la secuencia. Puntajes más cercanos a 1 indican mayor probabilidad ser sitios de fosforilación[13]

Residuo	Secuencia	Puntaje/0,500
S4	MLSSTAAP	0.663
T13	YALRTDKLK	0.865
S29	SCPTSTAEA	0,975
S35	AEAASQVTP	0,603
S69	AAKRSIEGV	0,946
Y90	VGDAYGKPG	0.807
S158	EWLTSHGRH	0,884
S210	RGNISDSDD	0,991
S212	NISDSDDFA	0,923
T245	RYTFTFAAF	0.892
S250	FAAFSVPDD	0,987
T255	VPDDTSSTA	0,665
T287	SRLRTMLPE	0,632

3.2 Uso de derivados Imidazolicos para el tratamiento de la leishmaniasis.

La eficacia de los azoles para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, la principal forma clínica de la enfermedad en Colombia [45], tiene una eficacia general del 64%, frente al 76.5% de los antimoniales pentavalentes y aunque esta última no supera el 80%, es el tratamiento de primera línea para la leishmaniasis cutánea en muchos países; además de una eficiencia subóptima presentan efectos adversos graves como cardiotoxicidad, insuficiencia renal y la necesidad de inyecciones diarias por periodos de 20 a 30 días, por lo que se hace necesario nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis [46].

Los azoles se utilizan con como antifúngicos debido a que actúan sobre la lanosterol 14-alfa-desmetilasa involucrada en la síntesis del ergosterol, un esterol que compone la

membrana celular de los hongos; ya que algunos tripanosomátidos como la *Leishmania* también poseen este esterol, se realizó un reposicionamiento de estos medicamentos, siendo ahora utilizados también para la leishmaniasis; esta estrategia permite de una forma rentable y rápida obtener nuevas alternativas terapéuticas ya se conocen los perfiles de farmacocinética y seguridad toxicológica de estas moléculas [31]. Por lo tanto, los antifúngicos son candidatos en la búsqueda de nuevos medicamentos para la leishmaniasis por reposicionamiento [47], [48]. Este reposicionamiento se dio porque los azoles actúan sobre el mismo blanco terapéutico tanto en hongos como en el parásito *Leishmania*; aunque es importante conocer si estos medicamentos actúan también en otros sitios blancos en los parásitos.

En estudios del Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ-UNAL), se observó en los procesos de purificación de la enzima recombinante LbNMNAT un efecto inhibitorio del imidazol sobre su actividad catalítica [10], por ello y a el potencial uso de los compuesto azolicos para el tratamiento de este tipo de patologías [11], [12], se ha querido investigar los posibles efectos inhibitorios del imidazol y otros de sus derivados sobre las NMNATs de parásitos protozoarios y su posible uso terapéutico.

4. Planteamiento de la problemática y la pregunta de investigación.

La identificación y el estudio de la LbNMNAT en el LIBBIQ han brindado información importante sobre la enzima a nivel estructural y funcional, señalando su potencial como posible blanco quimioterapéutico. Los imidazoles y sus derivados han sido ampliamente utilizados como medicamentos en una gran variedad de patologías [49] Adicionalmente, estudios del grupo señalan un efecto inhibitorio del imidazol sobre la LbNMNAT [10]. En aras de evaluar e integrar estos antecedentes se formulan las siguientes preguntas de investigación:

¿Tiene los derivados imidazolicos disponibles comercialmente: ¿Ketoconazol, Mebendazol y Metronidazol un efecto leishmanisida?

¿Existen en el parásito otras enzimas posibles blanco de inhibición por los derivados imidazolicos diferentes a la Lanosterol 14-alfa-desmetilasa?

¿Existen un efecto inhibitorio de los derivados Imidazolicos evaluados sobre la actividad enzimática de la recombinante LbNMNAT?

¿Podrían modificaciones estructurales en la LbNMNAT inducidas por su fosforilación generar cambios en su actividad enzimática?

5. Justificación

La Leishmaniasis es una enfermedad que afecta principalmente la población rural de países subdesarrollados, no tiene vacuna y la mayoría de los medicamentos utilizados para combatirá presentan efectos secundarios y tienen o empiezan a tener resistencia por parte de los parásitos causantes de la enfermedad, por ello la búsqueda de fármacos que sean menos tóxicos para el ser humano y nuevos blancos terapéuticos han sido una de las principales estrategias de lucha en contra de esta parasitosis.

El descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis depende de las vías metabólicas y las enzimas implicadas en la supervivencia del parasito, particularmente enzimas que estén presentes en el parásito o ausentes en las células del huésped o aquellas que tienen poca homología pueden ser material de estudio para la búsqueda de nuevos efectos terapéuticos [50]. Es este sentido, la molecular de NAD^+ es de vital importancia para la sobrevida de los parásitos por su uso como cofactor en varias reacciones celulares vitales y como sustrato de enzimas que desempeñan actividades reguladoras importantes.

El Laboratorio de investigaciones básicas en bioquímica, (LIBBIQ) ha concentrado su interés en el metabolismo del NAD^+ en *Leishmania braziliensis*, específicamente en la enzima central de su metabolismo, la LbNMNAT. Conocer la regulación de la función de esta enzima por modificaciones postraduccionales como la fosforilación y su posible interacción y/o inhibición con fármacos Imidazolicos, brindaría información valiosa para caracterizar la enzima. Así también, evaluar metodologías alternativas para estudiar la actividad antileishmania, haría el proceso de búsqueda y validación de nuevos medicamentos más eficiente.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de compuestos imidazolicos y modificaciones postraduccionales sobre la actividad catalítica de la NICOTINAMIDA/NICOTINATO MONONUCLEÓTIDO ADENILIL TRANSFERASA de Leishmania braziliensis (LbNMNAT), un potencial blanco de agentes quimioterapéuticos.

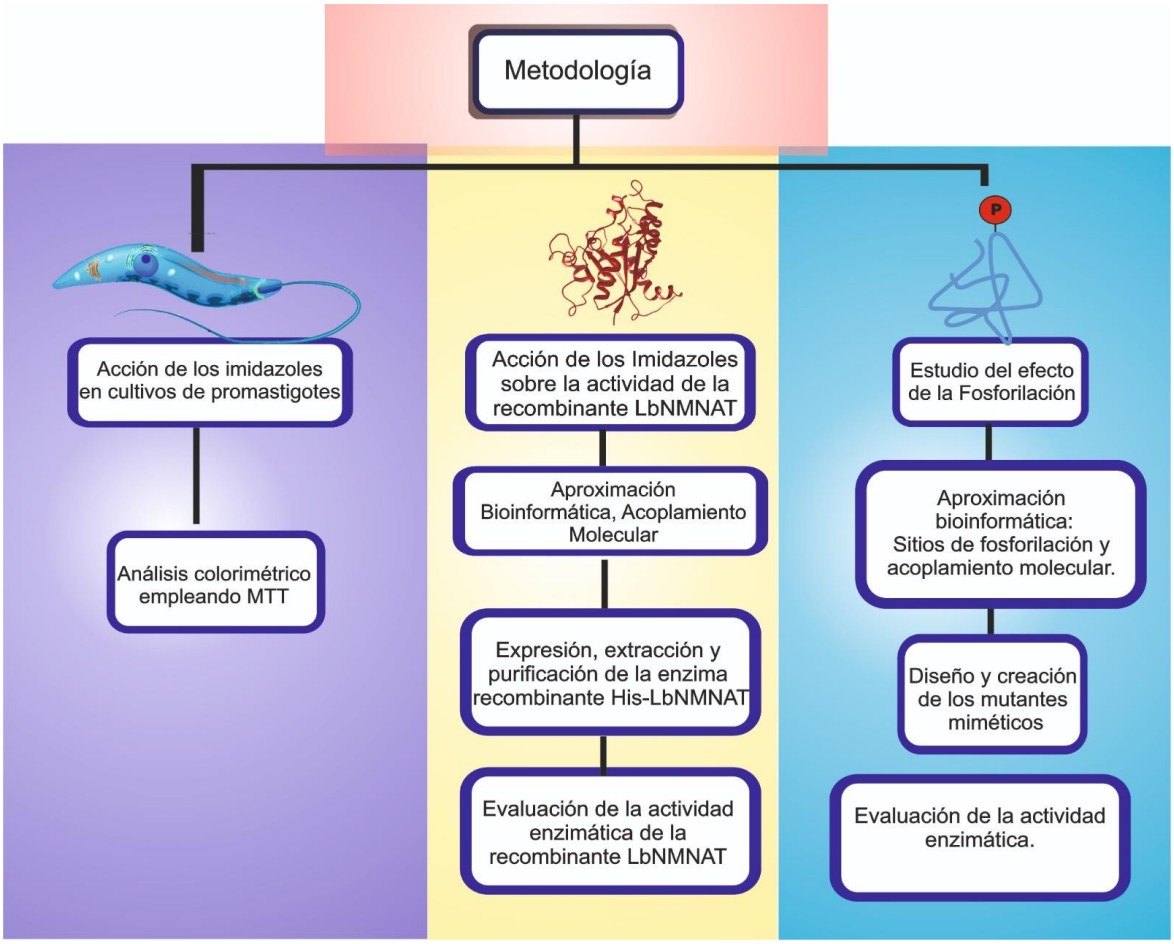
6.2 Objetivos específicos

1. Explorar el potencial citotóxico de algunos inhibidores imidazolicos sobre cultivos de promastigotes de *L. braziliensis* evaluando la viabilidad celular (por métodos colorimétrico o fluorescentes).
2. Evaluar el efecto de los inhibidores imidazólicos (Fenbendazol, Ketoconazol, Mebendazol y Metronidazol) sobre la actividad enzimática de la proteína recombinante LbNMNAT.
3. Estudiar el efecto de la modificación postraducional de la LbNMNAT mediante el análisis de la actividad enzimática empleando mutantes fosfomiméticos.

7. Metodología

Se usó la siguiente estrategia metodología (Fig. 8-1) para desarrollar cada uno de los objetivos propuestos como se describe a continuación:

Figura 7-1: Esquema general de la estrategia metodológica



7.1 Metodología para explorar el potencial citotóxico de algunos inhibidores imidazolicos sobre cultivos de promastigotes de *L. braziliensis* evaluando la viabilidad celular (por métodos colorimétrico o fluorescentes).

7.1.1 Cultivo de promastigotes de *L. braziliensis.*

Promastigotes de *L. braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904), se mantuvieron en medio Schneider pH 7.4 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (V/V) a una temperatura de 26°C, en frascos de 25cm (T25), sin agitación. Cada vez que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento realizo un repique (pase) a medio fresco [51], [52]

7.1.2 Optimización del método colorimétrico MTT para la evaluación de la viabilidad celular.

Para llevar a cabo esta optimización primero se realizaron curvas de crecimiento de los parásitos para conocer su comportamiento en las condiciones de cultivo utilizadas. Posteriormente se estandarizo el método colorimétrico de MTT.

Curvas de crecimiento de Promastigotes de *L. braziliensis*.

Las curvas de crecimiento se realizaron cultivando promastigotes de *L. braziliensis* en medio Schneider, suplementado con SBF (Suero Bovino Fetal) inactivado al 10%, a una temperatura de 26°C, en frascos de 25cm. Se partió de una concentración inicial de 500.000 parásitos/ml a un volumen final de 8ml. El número de parásitos se monitoreo por conteo con hemocitómetro, hasta el día 7 de cultivo [53].

Selección del mejor disolvente de los cristales de formazan y la concentración optima del reactivo MTT.

En placas de 96 pozos se realizaron diluciones de parásitos de 1 $x10^7$ a 19.531 parásitos/ml, en un volumen final de 100 µl, posteriormente se adicionaron 10 µl de una solución de MTT 5mg/ml, se dejó incubar 4 horas a 37 °C. Para disolver los cristales de formazan se adicionaron 100 µl de cada uno de los solventes evaluados, el isopropanol 0.04N HCL [54], DMSO [55] y SDS 0,01N HCL [56]. Se homogenizo y realizo lectura de la

placa a 540nm. Como blanco se utilizaron 100µl de parásitos a una concentración de 1 x10^7 parásitos/ml más 100 µl del respectivo disolvente, se homogenizo y adicionaron 10 µl de la solución de MTT 5mg/ml. El valor de absorbancia de las muestras les fue restado el valor del blanco. Se realizaron los cálculos de la correlación lineal entre la concentración de parásitos y las absorbancias obtenidas.

Una vez se determinó el mejor disolvente, se realizó el mismo diseño experimental previamente explicado, pero con distintas concentraciones finales de MTT en la placa (0,9, 0,68, 0,45 y 0,22 mg/ml); y así, evaluar cuál es la concentración optima, bajo los criterios de valores más altos de absorbancia y correlación lineal entre esta y el número de parásitos.

7.1.3 Evaluación de la acción de los imidazoles sobre promastigotes de *L. braziliensis*.

Para estas evaluaciones se usó la información que se logró con la optimización del método de MTT del apartado anterior.

Se preparó una suspensión promastigotes en fase de crecimiento exponencial, con la ayuda de un hemocitómetro [57] . Se realizaron diluciones seriadas de los medicamentos a evaluar y dispensaron en placas de 96 pozos, luego se adicionaron los parásitos en cada uno de los pozos a una concentración de 1x10^5 parásitos/ml, se dejó incubar por 72 horas a 26 ˚C [58], luego adiciono MTT en la concentración que indico el proceso de optimización; se incubo 4 horas a 37˚C y adiciono el mejor disolvente para los cristales de formazan encontrado en este estudio. Se realizó lectura de absorbancia a 540nm en un lector de microplacas[54], [58].

7.1.4 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y las comparaciones entre múltiples grupos con respecto al control se realizaron utilizando un ANOVA unidireccional seguido de Dunnett's test [59], con el software de GraphPad Prism 8.0.2. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Para aquellos medicamentos que tuvieron un

efecto de inhibición, se calculó la concentración media inhibitoria (IC50) utilizando regresión no lineal con ayuda del programa GraphPad Prism 8.0.2.

7.1.5 Generación de parásitos transfectados que expresen de manera constitutiva la GFP.

Para la generación de parásitos que expresaran de manera constitutiva la proteina verde fluorescente (GFP) se partió del vector de expresión pSP72Rαneoα-GFP que contiene la secuencia del promotor del ARN ribosomal de *L. braziliensis* y de la proteina verde fluorescente (GFP) [60] . Se evaluó la integridad del plásmido con las enzimas de restricción (*HindIII* y *BamHI*).

Procedimiento de electroporación: Para este experimento se obtuvieron los parásitos de 10ml de cultivo en fase exponencial, se centrifugaron a 1000g por 10 minutos a 4°C; se descartó el sobrenadante y adiciono 3ml de Cytomix (120 mM KCl, 25 mM Hepes pH7.6, 10 mM K_2HPO_4, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 0.15 mM $CaCl_2$) recién filtrado. Se homogenizo y centrifugo nuevamente a 1000g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y adiciono la cantidad de Cytomix necesaria para que los parásitos alcanzaran a una concentración de $5x10^8$ parásitos/µl, de los cuales se tomaron 200µl para adicionar a una celda de electroporación de 2mm con 50µg del vector previamente esterilizado a 80°C por 10 minutos. La solución anterior se incubo por 10 minutos sobre hielo y electroporó con tres pulsos de 1,6 Kv 25µF con intervalos de 20 segundos de reposo. El contenido de la celda se transfirió a una caja de cultivo celular con 5ml de medio Schneider 20% SBF. A las 24 horas se adiciono G418 (geneticina) a una concentración de 30 µg/ml. Se esperó una semana para hacer recambio de medio, centrifugando el contenido de la caja de cultivo celular a 1000g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y suspendió el pellet en 5ml de medio Schneider con 20% SBF y 30 µg/ml de G418, el cultivo se tuvo en observación por 30 días. Nota, el procedimiento se realizó por duplicado. También se realizaron experimentos cambiando la electroporación a un pulso de 0,45 kV y 500 µF.

7.2 Metodología para evaluar el efecto de los inhibidores imidazólicos sobre la actividad de la LbNMNAT.

7.2.1 Análisis bioinformáticos del efecto de los inhibidores imidazolicos sobre la recombinante LbNMNAT.

Se realizaron acoplamientos moleculares entre el modelo de la estructura terciaria la proteina generado con el predictor *AlphaFold* (base de datos Uniprot, con el número de acceso A0A3P3Z325) y los medicamentos evaluados, así como con los sustratos de la enzima. Para ello se utilizó la herramienta Autodok Vina 1.1.2 [61] ; la proteina y el ligando se prepararon con el paquete de AutoDockTools (ADT, v1.5.6) [62], y visualizaron con el software UCSF Chimera [63] y Maestro 10.3.

7.2.2 Expresión, extracción y purificación de la enzima recombinante LbNMNAT.

Se siguieron los procedimientos descritos por Contreras Rodríguez et al., 2020, con modificaciones en la resina utilizada y composición de los buffers. Se utilizaron células de *Escherichia coli* (*E. coli*) M15 transformadas con el plásmido pQE30-LbNMNAT en un inoculo de 100 ml en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina, fueron inducidas con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 0,5 mM e incubabas a 26 ˚C durante la noche. Las células de los ensayos de inducción se centrifugaron 8000 rpm por 10 min a 4ºC, los precipitados se resuspendendieron en buffer de lisis (1 mg/ml lisozima, 300 mM NaCl, 25 mM NaH_2PO_4 pH 8.0/NaOH, 10 mM imidazol, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM β-mercaptoetanol, 1% V/V glicerol, coctel de inhibidores de proteasas Sigma P8340 en relación volumétrica 1:300). Se incubo 1 hora a 4ºC, en agitación. Posteriormente las muestras se sometieron a ultrasonido (pulsos de 15 segundos con 50 % de amplitud y 45 segundos de reposo, para un tiempo total de sonicación de 3 minutos) y se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min a 4ºC; se separaron las fracciones solubles de las insolubles. Ya que el vector pQE30 le adiciona a la enzima recombinante una etiqueta de histidinas, como método de purificación se usó cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). Los extractos solubles de la LbNMNAT se incubaron con la resina de cobalto (Cobalt Agarose Beads, Gold Biotechnology) equilibrada con buffer de unión, (300 mM NaCl, 25 mM NaH_2PO_4 pH 8.0/NaOH, 10 mM imidazol, 2 mM MgCl2, 1% V/V glicerol), se dejó incubar durante 1 h sobre hielo en agitación constante. La mezcla se centrifugo y retiro el

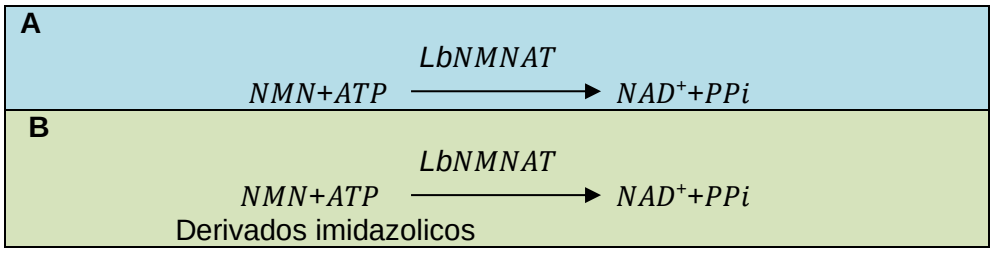
sobrenadante. El precipitado fue lavado 3 veces con los buffers de lavado que contenían concentraciones crecientes de imidazol (300 mM NaCl, 25 mM NaH_2PO_4 pH 8.0/NaOH, 2 mM $MgCl_2$, 1% V/V glicerol y concentraciones de 10, 20, 35 mM de imidazol para las soluciones de lavado 1, 2 y 3, respectivamente). Como último paso se realizaron 4 eluciones con 0.5 ml de buffer de elución (300 mM NaCl, 25 mM NaH_2PO_4 pH 8.0/NaOH, 2 mM $MgCl_2$, 1% V/V glicerol, 300 mM imidazol). Los eludido se dializaron con 1000 ml de buffer de diálisis (300 mM NaCl, 25 mM NaH_2PO_4 pH 8.0/NaOH) [43] y se suplementaron con 1 mM DTT y 10 % V/V de glicerol. Se almacenaron alícuotas a -80 °C. Se cuantifico la cantidad de proteina por el método Bradford [64] y la purificación se evalúo por electroforesis SDS-PAGE en geles discontinuos [57] y tinciones con azul Coomassie coloidal (G-250).

El procedimiento de purificación antes mencionado fue optimizado, modificando algunas de las condiciones que se hará mención en el apartado de resultados y discusión.

7.2.3 Evaluación de la actividad enzimática de la recombinante LbNMNAT y su uso en los ensayos de inhibición.

Se determino la actividad enzimática de la recombinante LbNMNAT por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC), cuantificando los productos de la reacción de la LbNMNAT sobre sus sustratos [43]. Para los ensayos de inhibición, se adicionaron los derivados imidazolicos en concentraciones crecientes para determinar la capacidad inhibitoria que estos tienen sobre la actividad enzimática, *in vitro* (Figura 7-2).

Figura 7-2: Esquema de las reacciones analizadas en cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa. En **A** se presenta el esquema de las reacciones para verificar la actividad de la LbNMNAT y en **B**, el esquema de su aplicación en los ensayos de inhibición.



Los ensayos fuero realizados por triplicado, adaptando el protocolo descrito por Emanuelli et al., 1996 [65] a 37 °C. Se permitió la reacción por 10 minutos en buffer HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 1.25 mM ATP, 1.25 mM NMN y 5 µg de la enzima en un volumen final

de 100 µl. La reacción fue detenida con 100 µl de $HClO_4$ 1.2 M, incubada por 15 minutos en hielo y centrifugada a 12.000g por 10 minutos. 150µl de la reacción anterior fue neutralizada con 40µl de K_2CO_3 1M, se incubo por 15 minutos en hielo y centrifugo a 12.000g por 10 minutos. 100 µl de sobrenadante fue analizado por RP-HPLC en una columna C18 de 25 cm de largo y 4.6mm de diámetro, con un tamaño de partícula de 5 µm, utilizando un cromatógrafo AGILENT 1260, bajo las condiciones indicadas por Contreras *et al.* [43], con algunas modificaciones: un flujo de 1ml por minutos y con las soluciones A: 0.1 mM de buffer fosfato de potasio, pH 6.0 y B: Metanol; se llevó a cabo el siguiente gradiente de elución: 2 minutos 100% de solución A, 1,5 minutos 20% de B, 3 minutos 25% de B y 3,5 minutos 100% de A. Los analitos fueron detectados a 254 nm y la concentración de NAD^+ fue determinada utilizando el área de los picos y una curva de calibración construida con patrones conocidos de NAD^+.

7.2.4 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, las comparaciones entre múltiples grupos con respecto al control se realizaron utilizando un ANOVA unidireccional seguido de Dunnett's test [59], con el software de GraphPad Prism 8.0.2. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

7.3 Metodología para estudiar el efecto de la modificación postraducional de la LbNMNAT mediante el análisis de la actividad enzimática empleando mutantes fosfomiméticos.

Para estudiar el efecto de la fosforilación en la estructura y función la LbNMNAT, se realizaron análisis bioinformáticos de la predicción de los sitios de fosforilación; así como de sus posibles efectos. También se llevaron a la fase experimenta metodologías que buscaron confirmar los hallazgos *in silico*; como la presencia de fosforilaciones en la LbNMNAT endógena con herramientas inmunológicas; y la sustitución de aminoácidos en la LbNMNAT recombinante, que se predicen pueden estar fosforilados, por aminoácidos que los mimetizan en su forma fosforilada, como se ha reportado para otras proteínas, serina/treonina por acido aspártico o glutámico y tirosina por acido glutámico [66] **.**

7.3.1 Aproximación bioinformática

Con la secuencia de la proteina LbNMNAT, se confirmaron las predicciones bioinformáticas previas de los sitios de fosforilación, usando la herramienta NetPhos - 3.1 [67] y Phostryp [68], la cual es específica para tripanosomátidos. Una vez analizados estos datos, se comparó el sitio de fosforilación más probable en la estructura primaria de la proteina con las NMNAT de otras especies de *Leishmania* y las ortologas humanas, por medio de un alineamiento con el software CLC Sequence Viewer Version 8.0. A continuación, se generaron los modelos de las estructuras terciarias de las proteínas con los predictores ROBETTA [69] y ALFAFOLD2 [70]. Las estructuras se validaron con el plot de Ramachandran generado en el servidor Ramachandran plot server Ramachandran plot server [71]. El acoplamiento molecular entre la enzima y los sustratos adenosín trifosfato (ATP) y mononucleótido de nicotinamida (NMN) se realizaron con la herramienta Autodok Vina 1.1.2 [61] ; la proteina y el ligando se prepararon con el paquete de AutoDockTools (ADT, v1.5.6) [62], y visualizaron con el software UCSF Chimera [63].

7.3.2 Exploración experimental de la existencia de fosforilaciones en la enzima LbNMNAT endógena de *Leishmania braziliensis.*

Para llevar a cabo esta aproximación se realizó la inmunoprecipitación de la LbNMNAT endógena utilizando Anti His-LbNMNAT generados en investigaciones previas. [9]

Protocolo inmunoprecipitación de la LbNMNAT endógena

Se siguieron los protocolos descritos por Contreras Rodríguez, 2016 y Villamil Silva, 2021 con modificaciones. Utilizando anticuerpos anti-Lb-NMNAT-IgY purificados por afinidad, generados en estudios previos

Lisis de los parásitos: Se Centrifugaron Aproximadamente $7.5x10^8$ parásitos en fase exponencial por 10 min a 5000 rpm, se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se adiciono buffer de lisis (0.1% Tritón X100, cóctel inhibidor de proteasas Sigma a una dilución final de 1:250; coctel inhibidor de fosfatasas sigma I, a una dilución 1:100 y coctel inhibidor de fosfatasas sigma II, a una dilución 1:100). Se dejo en agitación 30 min a 4°C. Se realizaron 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento y centrifugaron a 12000 rpm 20 min 4°C. Se recolecto y cuantifico la fracción soluble por el método de Bradford.

Preparación de la resina: Se uso la resina tiofílica (Pierce® Thiophilic Adsorbent–Thermo Scientific). Se equilibran 400µL de ella con tres lavados de 300 µl de buffer IP 2X (Tris-HCL 50Mm pH 7.5, NaCl 150Mm, MgCl2 5mM y Glicerol 5% v/v). Dejando interactuar la resina con el buffer por 10min a 4°C y luego centrifugo a 2.000 rpm por 3 minutos a 4°C, en cada caso. La resina se distribuyó en dos eppendorf de 1,5ml con 200µL de resina en cada uno.

Aclarado: Se permitió la interacción de 2mg de fracción proteica soluble de promastigotes de *L. braziliensis* mezclada en relación 1:1 con buffer IP 2x, con 200µL de la resina durante 3h a 4°C en agitación constante, luego, se centrifuga a 2000rpm durante 3min a 4°C. se Tomaron 50 µl del sobrenadante para SDS-PAGE (aclarado). El sobrenadante fue transferido a un eppendorf nuevo de 1,5mL, adicionando 4mg de anti-Lb-NMNAT-IgY (4mg de Ig-Y por cada 200 µl de resina), se permitió la interacción toda la noche en agitación constante a 4°C. Se adicionaron los 200µL de resina restante. Aclarado, anticuerpo y resina se incubaron 2h a 4°C en agitación constante. Se centrifugo a 2.000rpm durante 3min a 4°C y tomo el sobrenadante como (no unidas). Con el precipitado se realizaron 3 lavados con 500µL de buffer IP 2x cada uno de 10min a 4°C en agitación y centrifugaciones de 2.000 rpm a 4°C, conservando parte del sobrenadante para seguimiento.

Para liberar la proteina inmunoprecipitada: se resuspende el precipitado en 200µL de buffer de carga para SDS-PAGE1X, calentado a 96°C durante 10min y se centrifuga a 3000rpm durante 3min a 4 °C. El sobrenadante se conserva como Inmunoprecipitado (IP). Se monitoreo el proceso mediante SDS-PAGE 10% con tinción de plata.

Análisis de la inmunoprecipitación de la LbNMNAT endógena mediante Western blot.

Las muestras de la inmunoprecipitación se separaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos y se transfirieron hacia membranas PVDF (Millipore) aplicando una corriente de 200 mA por 2 horas en buffer de transferencia (0.2 M glicina, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10% (V/V) metanol). Se evaluó la transferencia con solución de tinción reversible Ponceau S. Luego las membranas se bloquearon 2 horas con TBST-Leche 2% (P/V) en TBS-Tween (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1% (V/V) Tween 20). La inmunodetección de la proteína recombinante se realizó con el anticuerpo primario 6XHisLbNMNAT IgYs y el anticuerpo secundario Anti IgYs Fosfatasa alcalina (1:10000). Se detecto con streptavidina

A conjugada a fosfatasa alcalina (1:3000) (Promega) y los sustratos nitro-azul de tetrazolio (NBT) (50mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3'-indoilfosfato (BCIP) (50mg/ml) (Promega) en buffer sustrato (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 9.0, 1 mM MgCl2). Se detuvo la reacción con agua destilada al evidenciar la detección. Se realizaron lavados sobre las membranas entre los cambios de anticuerpos y después de adicionar la fosfatasa alcalina [9]

Inmunodetección de la fosforilación en los residuos de serina de la LbNMNAT endógena mediante anticuerpos αS-fosforilada (anti-fosfoserina).

En el caso de la inmunodetección de la proteina fosforilada usando los anticuerpos antifosfoserina (Sigma), se usó en mismo procedimiento para el análisis de la inmunoprecipitación descrito en el apartado anterior con los siguientes cambios: se realizó bloqueo con TBST-BSA 2%, anticuerpo primario αS-fosforilada (1:1000) y secundario anti-mouse biotina (1:8000) estreptavidina-Fosfatasa (1:5000), sustrato NTB [72]

7.3.3 Aproximación experimental: Diseño y creación del mutante mimético.

A partir del vector de expresión pQE30-LbNMNAT obtenido previamente [73], el cual adiciona una etiqueta de histidinas a la LbNMNAT, se generó mediante mutagénesis dirigida el mutante miméticos, como se describe a continuación.

- Extracción de ADN plasmídico por hidrolisis alcalina: Se dejó crecer un inoculo de bacterias que contienen el plásmido a extraer, en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante 12 h a 37°C, en agitación constante; esta suspensión de células se centrifugo 6000 rpm por 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 300 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25mM, EDTA 10 mM pH 8.0), luego se liso con 300 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se neutralizo con 300 µl solución III (acetato de potasio 3 M pH 4.8). La mezcla obtenida se centrifugo a 10000 rpm por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y adiciono RNAsa e incubo por 30 min a 37°C [74]. Después, se realizó la purificación del ADN plasmídico por el método de fenol cloroformo y se precipita el ADN con etanol [57] .

- **Generación de la versión mutada de la enzima LbNMNAT:** A partir del vector de expresión pQE30-LbNMNAT obtenido previamente [75] y mediante mutagénesis

dirigida, se generó el cambio del aminoácido serina 210, que se predice es blanco de fosforilación, por un ácido aspártico; el cual, por su carga negativa, mimetiza el efecto del primero en estado fosforilado. Para este objetivo se utilizó el kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis de Agilent, con los primers directo 5'- GCT CGA GGC AAC ATC GAC GAC TCC GAT GAC TTC -3' y reverso 5'- GAA GTC ATC GGA GTC GTC GAT GTT GCC TCG AGC -3' diseñados con la herramienta QuikChange Primer Design de Agilent. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenían 10 mM KCl, 10 mM $(NH4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM $MgSO_4$, 0,1% Triton® X-100, 0,1 mg/ml de albumina de suero Bovino libre de nucleasas, la concentración de dNTPs indicada por la casa comercial y 1 µl de ADN polimerasa *PfuTurbo* (2.5 U/µl). Se utilizó el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial de 95°C, 30 segundos (s) y 16 ciclos de desnaturalización a 95°C, 30s; anillaje a 55°C, 1minuto (min) y extensión a 68°C 4 min con 30s. Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V) utilizando buffer TBE 0.5 X (44.5mM Tris, 44.5 mM Borato, 0.025 mM EDTA), revelando los geles con tinción de bromuro de etidio 0.05% (V/V).

Al producto PCR se le adiciono 1 µl de la enzima *Dpn* I (10 µl U/µl) Thermo Scientific, para digerir el ADN platilla metilado. Posteriormente este ADN fue utilizado para transformar células *E. coli* competentes XL-1 Blue, mediante choque térmico [57]. Los clones resultantes se inocularon en placas de medio LB suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina, dejando incubar por 24 horas a 37°C. Las colonias resultantes fueron evaluadas por PCR de colonia que identificaba la LbNMNAT en el plásmido, bajo las condiciones ya estandarizadas [9]. Se extrajo el plásmido que contenía la versión mutada de la enzima (LbNMNAT S210D) de las células XL-1 blue por medio de lisis alcalina [57]; el producto fue secuenciado para confirmar la mutación y utilizado para transformar células *E. coli* M15 competentes mediante choque térmico. Los clones resultantes se sembraron medio LB suplementados con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina. La transformación se verifico con el procedimiento de PCR de colonia ya descrito.

La expresión purificación y evaluación catalítica de las LbNMNAT con mimetismos de fosforilación, se llevarán a cabo tomando como guía las condiciones utilizadas para la enzima silvestre, como se explicó previamente. Los procedimientos de expresión y purificación también se realizaron con la LbNMNAT nativa, como control experimental.

8. Resultados y discusión.

Los resultados y discusión se presentan considerando los objetivos planteados, como se describe a continuación.

8.1 Exploración del potencial citotóxico de algunos inhibidores imidazolicos sobre cultivos de promastigotes de *L. braziliensis* evaluando la viabilidad celular (por métodos colorimétricos o fluorescentes).

En la búsqueda de medicamentos que sean más eficaces y menos tóxicos para el tratamiento de la leishmaniasis; también es importante implementar metodologías para la evaluación de los medicamentos. La técnica colorimetría de MTT se ha utilizado para evaluar la viabilidad celular, gracias a que puede ser metabolizado, por enzimas mitocondriales, a un compuesto purpura llamado formazan que absorber luz en el espectro visible, aunque insoluble [76]. Existen reportes de diferentes solventes para los cristales de formazan; esta metodología ya ha sido utilizada para evaluar el efecto de compuestos sobre parásitos del género *Leishmania* [58]. Para esta investigación se eligió el reactivo MTT genérico y se procedió a estandarizar las condiciones de concentración del reactivo a utilizar, el método para solubilizar los cristales de formazan y adecuarlos al comportamiento biológico que tienen los promastigotes *L. braziliensis* en medio Schneider 10% SBF. Igualmente, se evaluó la posibilidad de utilizar parásitos transfectados con un vector que les permita expresar de manera constitutiva la GFP y utilizar la fluorescencia que emitan para cuantificar el efecto que tienen los medicamentos sobre los parásitos.

Una vez se estandarizo el método para evaluar el efecto de los medicamentos, se inició con la evaluación de los derivados imidazolicos sobre los cultivos celulares.

8.1.1 Estandarización del ensayo de MTT para la evaluación del efecto de los inhibidores imidazolicos sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis.*

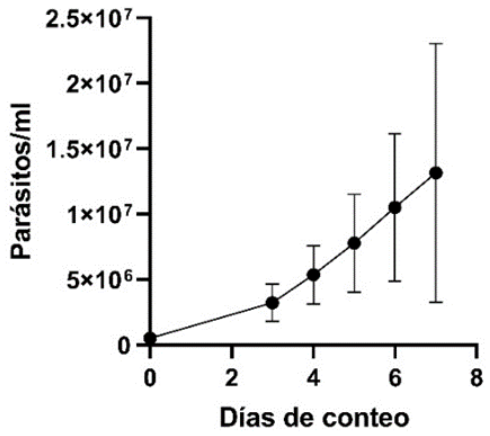
Para poder estandarizar el método colorimétrico del MTT, primero se realizaron curvas de crecimiento de *L. braziliensis* cultivada en medio Schneider 10 % SBF, para conocer su comportamiento en las condiciones de cultivo utilizadas, sus densidades parasitarias máximas y la duración de su fase exponencial (ver tabla 8-1 y gráfico 8-1).

Tabla 8-1: Concentraciones de parásitos obtenidas en curva de crecimiento de *Leishmania braziliensis*, medio Schneider 10% de SBF. Se presentan los datos de 3 réplicas independientes, la concentración está dada en parásitos/ml.

Día	Replica #1	Replica #2	Replica #3	Promedio	Desviación estándar
0	500.000	500.000	500.000	500.000	0
3	2.756.666	2.095.000	4.820.000	3.223.889	1.421.312
4	4.653.333	3.576.000	7.853.333	5.360.889	2.224.718
5	5.966.666	5.296.000	12.080.000	7.780.889	3.738.210
6	7.413.333	7.106.666	17.040.000	10.520.000	5.648.567
7	6.680.000	8.200.000	24.560.000	13.146.667	9.913.412

Partiendo de un inoculo de 500.000 parásitos/ml la densidad parasitaria máxima obtenida fue de 24.560.000 parásitos/ml en el día 7; no se prosiguió con el conteo de parásitos en días posteriores, debido a que se estaba iniciando la fase estacionaria. Se encontró un tiempo de doblaje poblacional de 1.81 días, usando el software GraphPad Prism versión 8.0.2, modelo de curva “Y=Y0*exp(k*x)” [77]. Los datos de la curva de crecimiento nos proporcionan una información valiosa para adaptar el método colorímetro MTT a nuestras condiciones de cultivo, ya que podemos definir que partiendo de un inoculo inicial de 500.000 parásitos/ml, hasta el día 6 aún estamos en fase exponencial de crecimiento, en donde debemos evaluar los medicamento para evitar los efectos en su viabilidad por la falta de nutrientes en el medio de cultivo. Las desviaciones estándar observadas en las réplicas son similares a las registradas por otros investigadores [53].

Figura 8-1: Curva de crecimiento de *L. braziliensis* en medio Schneider 10 % SBF. Las líneas verticales representan la desviación estándar para cada día de conteo.



Como se mencionó anteriormente, el método de MTT requiere de la solubilización de los cristales de formazan generados por células metabólicamente activas; para este fin, existen varios disolventes reportados, se probaron tres de ellos, el isopropanol 0.04N HCL [54], DMSO [55] y SDS 0,01N HCL [56]. Se realizaron replicas independientes para la evaluación cuantitativa de los disolventes, ver tablas 8-2 a 8-4. Con estos datos se pudo conocer que para el protocolo de MTT, el mejor disolvente de los cristales de formazan fue el SDS 0,01N HCL, que gracias a sus propiedades como detergente aniónico permite solubilizar los cristales de formazan sin generar emulsiones con los restos celulares que interfieren con la lectura de absorbancia, como sucedió notablemente con el isopropanol, donde se formaban las mayores emulsiones. Estas interferencias se evidenciaron en los coeficientes de correlación lineal, donde el SDS tuvo los mejores valores (Tabla 8-5) y también los valores de absorbancia más altos (Figura 8-2).

Tabla 8-2. Evaluación del isopropanol como disolvente de los cristales de formazan, en ensayo de MTT. Las columnas 1-2-3, representan réplicas de experimentos independientes.

Número de parásitos / ml	Valores de absorbancia			Promedio	Desviación estándar.
	#1	#2	#3		
10000000	0,076	0,265	0,246	0,196	0,104
5000000	-0,029	0,257	0,2855	0,171	0,174
2500000	-0,066	0,185	0,296	0,138	0,185
1250000	-0,088	0,073	0,1765	0,054	0,133

625000	-0,148	0,225	0,2275	0,102	0,216
312500	-0,186	0,173	0,093	0,027	0,188
156250	-0,123	0,213	0,187	0,092	0,186
78125	-0,195	0,052	0,1225	-0,007	0,166
39063	-0,056	0,151	0,267	0,121	0,164
19531	-0,193	0,068	0,078	-0,016	0,154

Tabla 8-3. Evaluación del DMSO, como disolvente de los cristales de formazan. En ensayo de MTT, las columnas 1-2-3, representan réplicas de experimentos independientes.

Número de parásitos / ml	Valores de absorbancia			Promedio	Desviación estándar.
	#1	#2	#3		
10000000	0,225	0,138	0,188	0,184	0,043
5000000	0,158	0,098	0,131	0,129	0,030
2500000	0,091	0,068	0,107	0,089	0,020
1250000	0,076	0,048	0,107	0,077	0,029
625000	0,059	0,043	0,078	0,060	0,018
312500	0,063	0,022	0,074	0,053	0,027
156250	0,062	0,032	0,051	0,048	0,015
78125	0,066	0,015	0,060	0,047	0,028
39063	0,036	0,022	0,059	0,039	0,019
19531	0,053	0,011	0,064	0,042	0,028

Tabla 8-4. **Evaluación del SDS, como disolvente de los cristales de formazan, en ensayo de MTT**. Las columnas 1-2-3, representan réplicas de experimentos independientes.

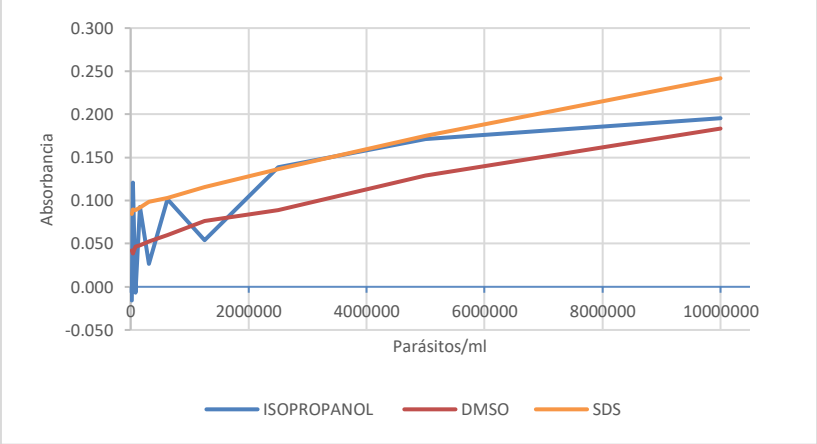
Número de parásitos / ml	Valores de absorbancia			Promedio	Desviación estándar.
	#1	#2	#3		
10000000	0,298	0,186	0,242	0,242	0,056
5000000	0,187	0,154	0,186	0,175	0,019
2500000	0,149	0,114	0,148	0,137	0,020
1250000	0,124	0,101	0,123	0,116	0,013
625000	0,105	0,094	0,111	0,103	0,009
312500	0,097	0,088	0,111	0,098	0,012
156250	0,091	0,084	0,103	0,092	0,010
78125	0,091	0,079	0,097	0,089	0,009
39063	0,086	0,081	0,103	0,090	0,012
19531	0,083	0,076	0,096	0,085	0,010

Tabla 8-5. Coeficiente de correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de parásitos. Se indica la correlación lineal en el rango de concentraciones de parásitos que se utiliza.

Rango de datos de absorbancia utilizado para el cálculo, según concentración de parásitos	ISOPROPANOL	DMSO	SDS

19.531 a 10.000.000 parásitos/ml.	0,745	0,989	0,995
2.500.000 a 10.000.000 parásitos/ml.	0,963	0,995	0,999
19.531 a 2.500.000 parásitos/ml.	0,177	0,983	0,978

Figura 8-2: El SDS presenta los mejores coeficientes de correlación lineal entre los datos de absorbancia obtenidos del ensayo de MTT y numero de parásitos, al compáralo con los otros dos disolventes evaluados. Se promediaron los datos de absorbancias obtenidas de las tres replicas presentadas en la tabla 8-4.



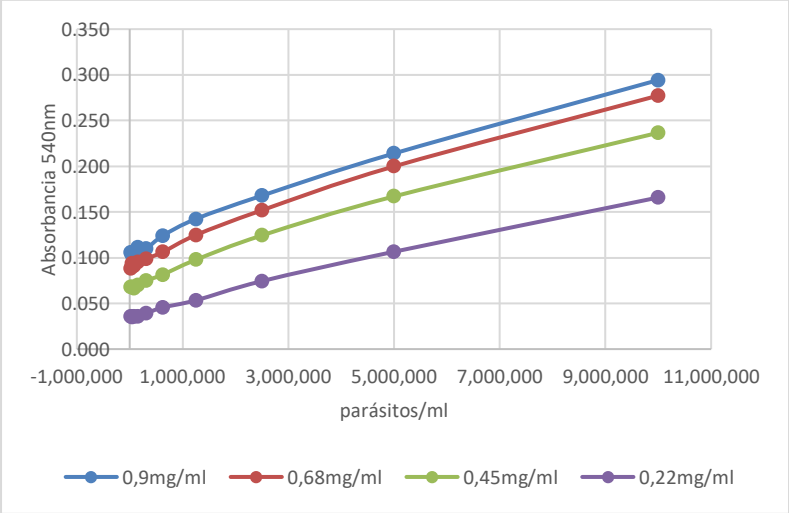
Una vez definido el SDS como el disolvente más adecuado de los cristales de formazan, Se optimizo la concentración ideal de trabajo del reactivo MTT. Usualmente se prepara una solución stock de 5mg/ml [56], de la cual se adicionan 10µl por cada 100µl de suspensión celular [54], lo que nos daría una concentración final de MTT en la muestra de 0,45mg/ml; se evaluaron concentraciones superiores e inferiores de esta referencia para encontrar la ideal, ver tabla 8-6. y grafico 8-3.

Tabla 8-6: Absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de MTT, para encontrar la concentración optima de trabajo. Ẋ, promedio de tres replicas independientes. SD, desviación estándar.

Número de parásitos / ml	0.9mg/ml		0,68mg/ml		0,45mg/ml		0.22mg/ml	
	Ẋ, tres replicas	SD	Ẋ, tres replicas	SD	Ẋ, tres replicas	SD	Ẋ, tres replicas	SD
10.000.000	0,294	0,042	0,277	0,055	0,237	0,038	0,166	0,066
5.000.000	0,214	0,039	0,200	0,051	0,167	0,032	0,107	0,022
2.500.000	0,168	0,041	0,152	0,050	0,124	0,036	0,074	0,011
1.250.000	0,142	0,043	0,125	0,045	0,098	0,035	0,053	0,007

625.000	0,124	0,036	0,106	0,042	0,082	0,028	0,046	0,008
312.500	0,110	0,034	0,099	0,042	0,075	0,028	0,039	0,006
156.250	0,111	0,037	0,095	0,041	0,070	0,026	0,036	0,006
78.125	0,106	0,032	0,091	0,038	0,067	0,029	0,036	0,005
39.063	0,103	0,028	0,094	0,038	0,068	0,026	0,035	0,007
19.531	0,106	0,037	0,089	0,038	0,068	0,026	0,035	0,004

Figura 8-3: Absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de MTT. Se utilizaron el promedio de las absorbancias obtenidas para cada concentración de MTT, presentadas en la tabla 8-6.



La concentración ideal de MTT fue de 0,68 mg/ml, ya que tiene buena correlación lineal con la concentración de parásitos (ver tabla 8-7) y valores superiores de absorbancia en comparación con los de 0,45 mg/ml (figura 8-3). No se empleó la concentración de 0,9 mg/ml ya que no aumenta considerablemente los valores absorbancia, ni mejora sustancialmente la correlación lineal al compáralo con la concentración de 0,68 mg/ml; concentraciones de 2,5 mg/ml tienen bajos valores de absorbancia y mala correlación lineal (tabla 8-7).

Tabla 8-7: Coeficiente de correlación lineal entre las lecturas de absorbancia y concentración de parásitos, a diferentes concentraciones de MTT. Para cada una de las concentraciones de MTT, se calcula la correlación lineal en el rango de concentraciones de parásitos que se indica.

Rango de datos de absorbancia utilizado para el cálculo, según concentración de parásitos	Concentraciones de MMT evaluadas			
	0,9mg/ml	0,68mg/ml	0,45mg/ml	0,22mg/ml
19.531 a 10.000.000 parásitos/ml.	0,982	0,987	0,980	0,941
1.250.000 a 10.000.000 parásitos/ml.	1,000	0,995	0,995	0,927
19.531 a 1.250.000 parásitos/ml.	0,806	0,963	0,989	0,996

Considerando los resultados anteriores, las condiciones estandarizadas del ensayo de MTT para el cultivo de promastigotes axénicos emplean una concentración de MTT de 0.68mg/ml y para disolver los cristales de formazan se usa SDS 0,01N HCL.

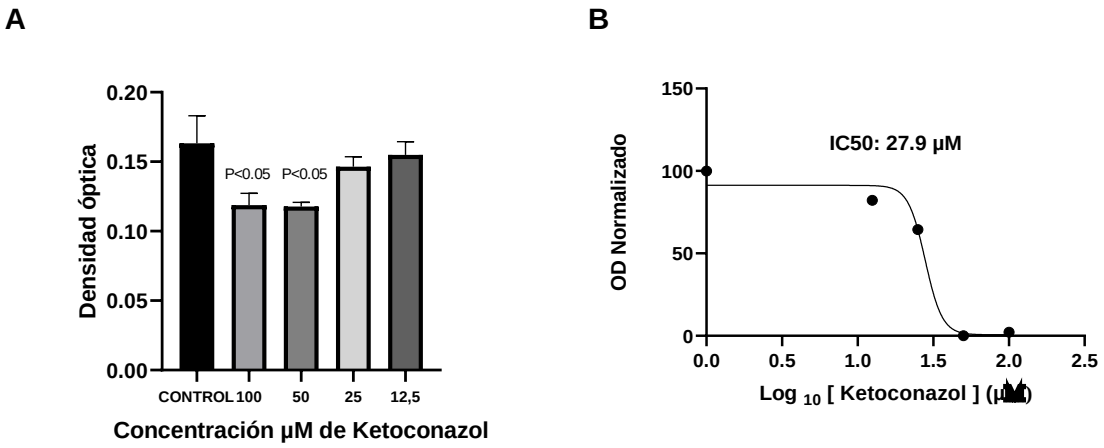
8.1.2 Ensayos colorimétricos para la evaluación del efecto de los derivados imidazolicos sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis.*

Con el método colorimétrico de MTT estandarizado (anexo 1), se evaluó el efecto del imidazol y tres derivados imidazolicos (ketoconazol, metronidazol y mebendazol), sobre promastigotes de *L. braziliensis*.

Bhandari *et al*., 2010 en la evaluacion de diferentes compuestos, sobre promastigotes de *Leishmania*, tomaron como criterio aquellos con IC50 menores a 15 µg/ml como activos (15 µg/ml equivale en concentraciones micromolar de los compuestos evaluados a: 28,2µM ketoconazol, 220,3 µM imidazol, 87,6µM metronidazol, y 50,7µM mebendazol). En el presente estudio se utilizaron concentraciones en el rango micromolar superiores e inferiores a este criterio.

Para determinar el efecto de los compuestos sobre promastigotes a distintas concentraciones, se realizaron los experimentos por triplicado. Los resultados fueron valorados al comparar los datos para cada una de las concentraciones de los compuestos, respecto al control (parásitos sin medicamento o con DMSO, en el caso del ketoconazol y el mebendazol, que se disuelven en este solvente), en análisis de varianza de una vía (*One-Way ANOVA*) seguido de Dunnett's test. Se encontró un efecto de inhibición de significancia estadística en el tratamiento con el ketoconazol y de estímulo con el mebendazol. No se hallaron efectos de significancia estadística para el metronidazol ni el imidazol (figura 8-4 A y 8-5).

Figura 8-4: Efecto del ketoconazol sobre promastigotes de *L. braziliensis* en medio Schneider 10% SBF. A: grafico donde comparan las absorbancias obtenidas para distintas concentraciones del medicamento y el control (se realizaron ensayos por triplicado), con el método de MTT. Se indican las desviaciones estándar y el valor p para las concentraciones con efectos de significancia estadística <0.05, al ser comparados con el control. B: cálculo del IC 50 para el ketoconazol.



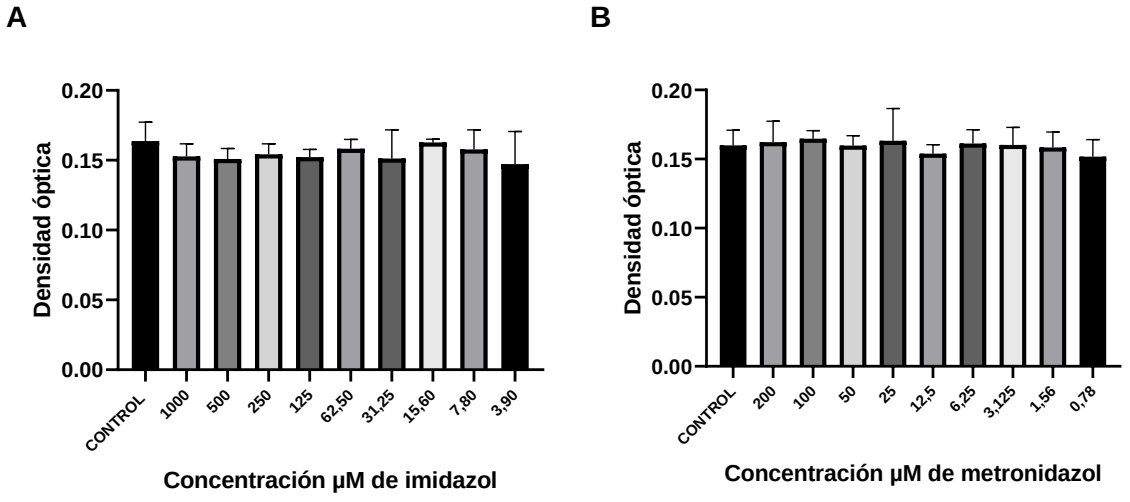
El ketoconazol fue inicialmente utilizado como antifúngico y reposicionado para el tratamiento de la leishmaniasis por su efecto sobre la enzima lanosterol 14-alfa-desmetilasa [78]. Se obtuvo un IC50 de 27.9 µM (figura 8-4 B), aunque el efecto del ketoconazol en los parásitos ha sido reportado, es variable y dependiente de la especie de *Leishmania* estudiada y el diseño experimental utilizado. Por ejemplo, se reportan con este medicamento IC50 de 135 µM para *Leishmania major* cultivada en RPMI 10% SBF [79] y otro estudio encontró un IC50 de 11.71µM para *Leishmania amazonensis*, cultivada en medio Schneider 10% SBF [80]. En el caso de *L. braziliensis,* previamente se ha reportado su efecto *in vitro* con un IC50 de 66µM [81]. En estudios sobre el efecto del ketoconazol para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea hay investigaciones que reportan una eficacia del 76% para curar la forma cutánea de la enfermedad, aunque también hay efectos secundarios en el 27 % de ellos [82].

El mebendazol es un medicamento utilizado como antihelmíntico, debido a su capacidad de inhibir el ensamblaje de los microtúbulos. Actualmente se está investigando como un posible medicamento que actúa de manera sinérgica con el docetaxel, para el tratamiento

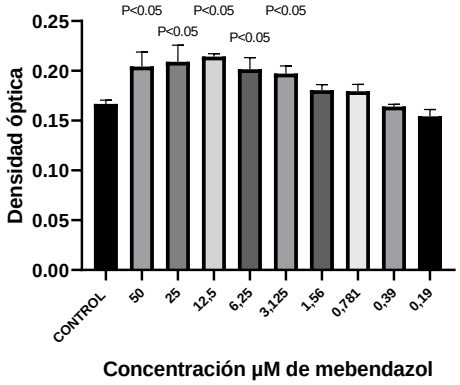
del cáncer de próstata [83]. Existe un reporte, del año 1989, de un caso clínico donde es posible que el mebendazol haya tenido un efecto inhibitorio sobre los parásitos del género *Leishmania* [84], pero esto no se ha podido confirmar hasta el momento. Nuestros hallazgos sobre el efecto estimulante del mebendazol sobre el crecimiento de los promastigotes de *L. braziliensis* no había sido reportado y se requiere de análisis adicionales que incluyan el estudio de cambios morfológicos y metabólicos que puedan profundizar estos resultados.

El imidazol es una molécula pequeña y muy hidrofílica, lo que podría explicar su escaso efecto a nivel celular, debido a su limitada capacidad para atravesar la membrana celular. Con relación al metronidazol, no se observó efectos en la viabilidad de los parásitos, esto debido posiblemente a que este derivado imidazolico, es una prodroga que requiere ser reducida para que se genere la molécula activa. Se ha reportado que tiene su acción sobre parásitos como *Tricomonas vaginalis* [85]. Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que este medicamento no tiene efecto apreciable en el tratamiento de esta enfermedad [86], [87].

Figura 8-5: Efecto de derivados imidazolicos sobre promastigotes de *L. braziliensis* en medio Schneider 10% SBF. A: imidazol. B: metronidazol. C: Mebendazol. Gráficos donde comparan las absorbancias obtenidas para distintas concentraciones del medicamento y control (se realizaron ensayos por triplicado), con el método de MTT. Se indican las desviaciones estándar y el valor p para los efectos con significancia estadística <0.05, al ser comparados con el control.



C



De los cuatro derivados imidazolicos evaluados por el método colorimétrico del MTT, el efecto más apreciable se obtuvo con el ketoconazol.

Con el propósito de generar parásitos que expresen constitutivamente la GFP y que puedan ser empleados en un ensayo de viabilidad adicional, se procedió a la obtención de los parásitos transfectantes.

8.1.3 Generación de cepa transfectante de *L. braziliensis* que exprese de manera constitutiva la GFP, con el fin de evaluar el efecto de los medicamentos con una técnica fluorescente.

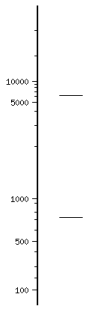
Para la creación de las líneas transfectantes de *Leishmania braziliensis,* que expresen de manera constitutiva la proteina verde fluorescente (GFP), se utilizó el vector de expresión pSP72Rαneoα-GFP que contiene la secuencia del promotor del ARN ribosomal de *L. braziliensis* y de la proteina verde fluorescente (GFP) [60] .

Inicialmente se evaluó la integridad del plásmido pSP72Rαneoα-GFP con enzimas de restricción donde concuerda el perfil de digestión de *HindIII* y *BamHI* obtenido con el teórico esperado (figura 8-6).

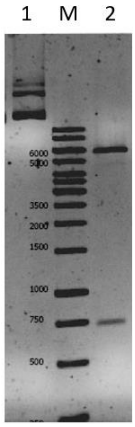
Figura 8-6: Digestión del plasmido pSP72Rαneoα-GFP, con *HindIII* y *BamHI* : A, simulación de la digestión, generada con el programa NEBcutter V2.0. **B**, Digestión del plásmido, M marcador de peso molecular, carril 1 plásmido sin digerir y carril 2 plásmido digerido; visualización en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

A

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	HindIII-BamHI	4443-3710	6102
2	BamHI-HindIII	3711-4442	732



B



Se emplearon dos estrategias de electroporación: 1) tres pulsos de 1.6 kV y 25 µF [60]; 2) un pulso de 0,45 kV y 500 µF, empleando para ambos procedimientos 50µg plásmido, en buffer Cytomix (120 mM KCl/0.15 mM CaCl2/10 mM K2HPO4/25 mM HEPES (pH 7.6) /2 mM EDTA/5 mM MgCl2) y una cubeta de 0.2cm. Con los cuales a la fecha no se han obtenido transformantes.

8.2 Evaluación de efecto de los inhibidores imidazólicos (Fenbendazol, Ketoconazol, Mebendazol y Metronidazol) sobre la actividad enzimática de la proteína recombinante LbNMNAT.

Se valoró el efecto del imidazol y 4 derivados sobre la LbNMNAT (ver figura 8-7), con análisis bioinformáticos y experimentales.

8.2.1 Estudios bioinformáticos del efecto de los derivados imidazolicos sobre la LbNMNAT.

Para llevar a cabo estos análisis *in silico,* se realizaron acoplamientos moleculares, entre el modelo de la estructura terciaria de la proteina generado con el predictor *AlphaFold*, y los medicamentos evaluados.

En la figura 8-8, se indican los resultados del acoplamiento molecular entre modelo de la LbNMNAT y sus sustratos ATP y NMN, con energías de unión de -8.2 kcal/mol y -7.1 kcal/mol respectivamente. También se observa que las conformaciones predichas para los compuestos evaluados se ubican en el sitio catalítico de la enzima.

Al comparar las energías de unión del acoplamiento entre la enzima y sus sustratos, con las que se obtiene al utilizar los derivados imidazolicos, se encuentra que las moléculas de ketoconazol y mebendazol, superan las del sustrato NMN (-7.7 y -7.6 kcal/mol, respectivamente), los que las hace buenos candidatos para el estudio experimental (ver figura 8-8).

Figura 8-7: Moléculas a las cuales se les analizo el efecto sobre la actividad de la LbNMNAT.
A: Fenbendazol, **B:** Imidazol, **C:** Ketoconazol, **D:** Mebendazol, **E**: Metronidazol (1), se identifican 4 formas reducidas del mismo (2-5) [88].

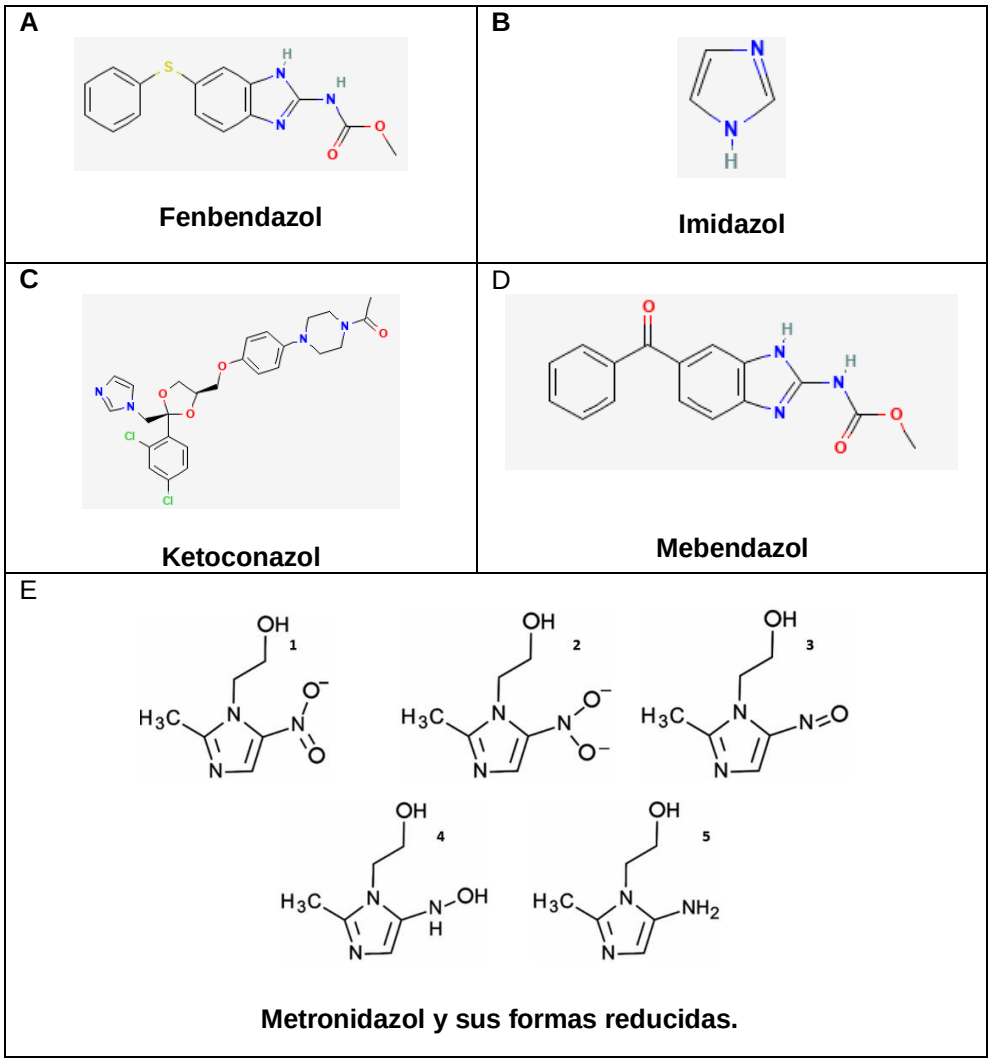
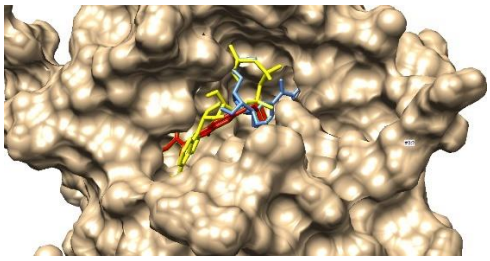


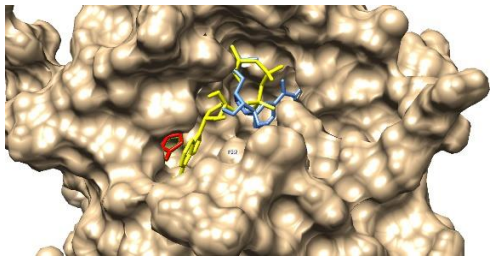
Figura 8-8: Acoplamiento molecular entre el modelo de la estructura terciaria de la LbNMNAT y los compuestos evaluados. A: fenbendazol, **B:** imidazol, **C:** ketoconazol y **D:** mebendazol. **E:** metronidazol, se presentan los acoplamientos de las 5 formas reducidas del medicamento, como se indican en la figura 8-7 E. En cada imagen se indica la posición del sustrato de la enzima ATP en amarillo y el NMN en azul. Las moléculas de color rojo representan cada uno de los compuestos evaluados. (se presentan las conformaciones con mejor score). La energía para el sustrato ATP, fue de -8.2 kcal/mol y para el NMN de -7.1 kcal/mol.

A



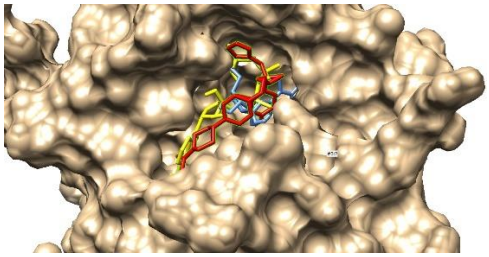
(Fenbendazol: -7.0 kcal/mol)

B



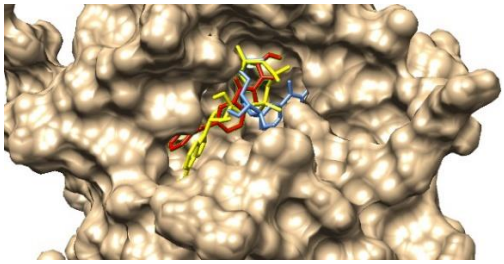
(Imidazol-3.2 kcal/mol)

C



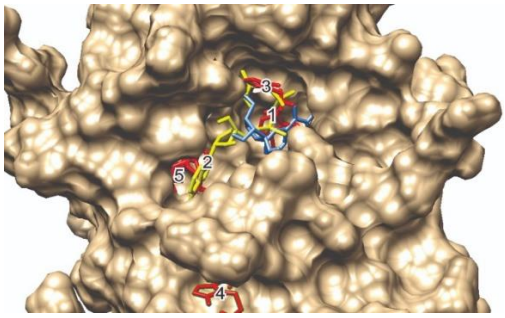
(Ketoconazol: -7.7 kcal/mol)

D



(Mebendazol-7.6 kcal/mol)

E



(Metronidazol: -4.7 kcal/mol y con sus formas reducidas 1: -5.0, **2**: -5.5, **3**: -5.0 y **4**: -4.6 kcal/mol)

Estas predicciones señalan a los derivados imidazolicos como potenciales candidatos para conseguir un efecto inhibitorio sobre a LbNMNAT, debido a que las conformaciones obtenidas se ubican en el sitio catalítico, especialmente para el Ketoconazol y Mebendazol donde las energías de unión superaron a las del sustrato NMN.

8.2.2 Estudio experimental del efecto de varios derivados imidazolicos sobre la actividad enzimática de la LbNMNAT.

Expresión y purificación de la LbNMNAT:

Empleando el vector pQE30-LbNMNAT en *E. coli* M15 se logró la expresión y purificación de la proteina LbNMNAT, la cual contiene en el extremo amino terminal una etiqueta de histidinas (6xHis) [9]. La LbNMNAT fue parcialmente purificada por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) (ver figura 8-9, A). Los eludidos de esta purificación fueron dializados (en buffer fosfatos y cloruro de sodio) y suplementados con 1mM de DTT. Posteriormente se verifico la actividad adenilil transferasa con ensayos enzimáticos directos, los cuales se analizaron con RP-HPLC. Para determinar la cantidad de NAD^+ producido por la enzima se realizó una curva de calibración, usando patrones conocidos de esta molécula y el valor del área del pico correspondiente en el cromatograma (Anexo 2). Se evaluó la fracción soluble del lisado antes de la purificación y los eludidos de la proteina purificada, con el objeto de establecer el rendimiento de la purificación (tabla 8-8). Al analizar el rendimiento de la purificación se observó que la enzima perdía actividad en el proceso, con un rendimiento del 1.44%.

La pérdida de actividad de una enzima en un proceso de purificación, puede ser causado por múltiples factores, entre ellos se puede mencionar la perdida de algún componente en el proceso de purificación requerido para la actividad y también se puede presentar un proceso de desnaturalización de la proteina [89]. En el caso de la LbNMNAT existen 10 residuos de cisteínas que hacen posible que se generen interacciones entre estos residuos, no adecuadas a la conformación de la enzima; para lo cual es recomendado la adición de un agente reductor como el DTT [90]. Aunque el protocolo utilizado usa 2 mM de β-mercaptoetanol en el buffer de lisis y la enzima se suplementa con DTT 1 mM, posterior a la diálisis; se estableció la importancia de mantener las condiciones reductoras

durante todo el proceso de purificación. Así, se incluyó β-mercaptoetanol 5mM en los buffers de lavado y elución del IMAC; se adiciono DTT al 0.5mM en el buffer de diálisis como indicó Contreras Rodríguez *et al.,* 2020; y se aumentó la fuera iónica del buffer de diálisis (50mM), para mejorar su capacidad amortiguadora a pH 8.0, donde el DTT mejora su potencial como agente reductor [91].

Figura 8-9: Purificación parcial de la Lb-NMNAT por IMAC. A Purificación de LbNMNAT (37.8 kDa) condiciones iniciales de purificación se describen en la metodología (7.2.1) **B.** Purificación Lb-NMNAT en condiciones reductoras (β-mercaptoetanol 5mM en los buffers de lavado y elución del IMAC, así como aumentó de la fuerza iónica y adición de DTT 0.5mM al buffer de diálisis. **M**: marcador de peso molecular en kDa, SOL: fracción soluble de la lisis, NU: proteínas no retenidas por la resina de cobalto, **L1-L3**: lavados con concentraciones crecientes de imidazol (10, 20, 35 mM, respectivamente), **E1-E4**: eludidos con imidazol al 300mM. SDS-PAGE acrilamida 12 %, teñido con azul de Coomassie.

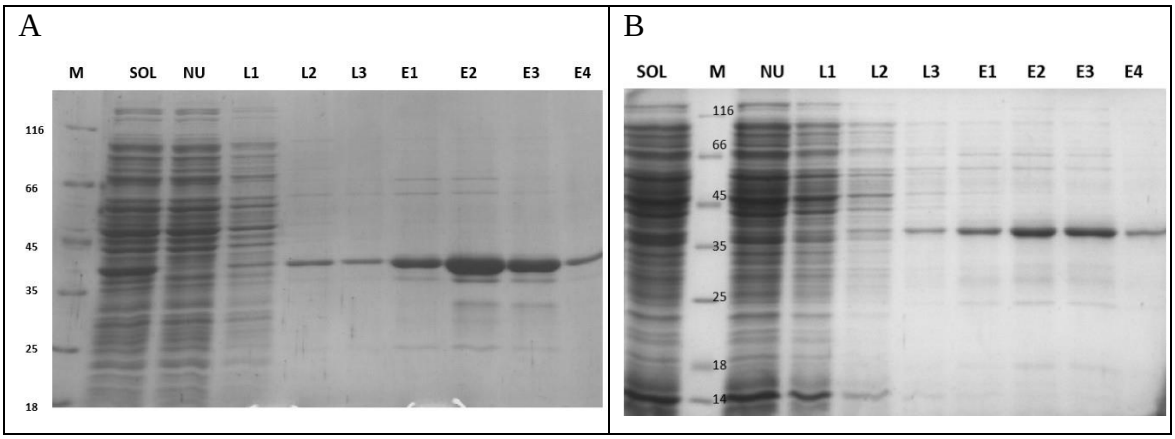


Tabla 8-8: Comparación del rendimiento en la purificación de la LbNMNAT, de dos protocolos de purificación. Las condiciones iniciales de purificación se describen en la metodología (7.2.2) y las condiciones modificadas señalan el uso de β-mercaptoetanol al 5mM en los buffers de lavado y de elución del IMAC, así como también el aumento de la fuerza iónica del buffer de diálisis y adición de DTT 0.5mM.

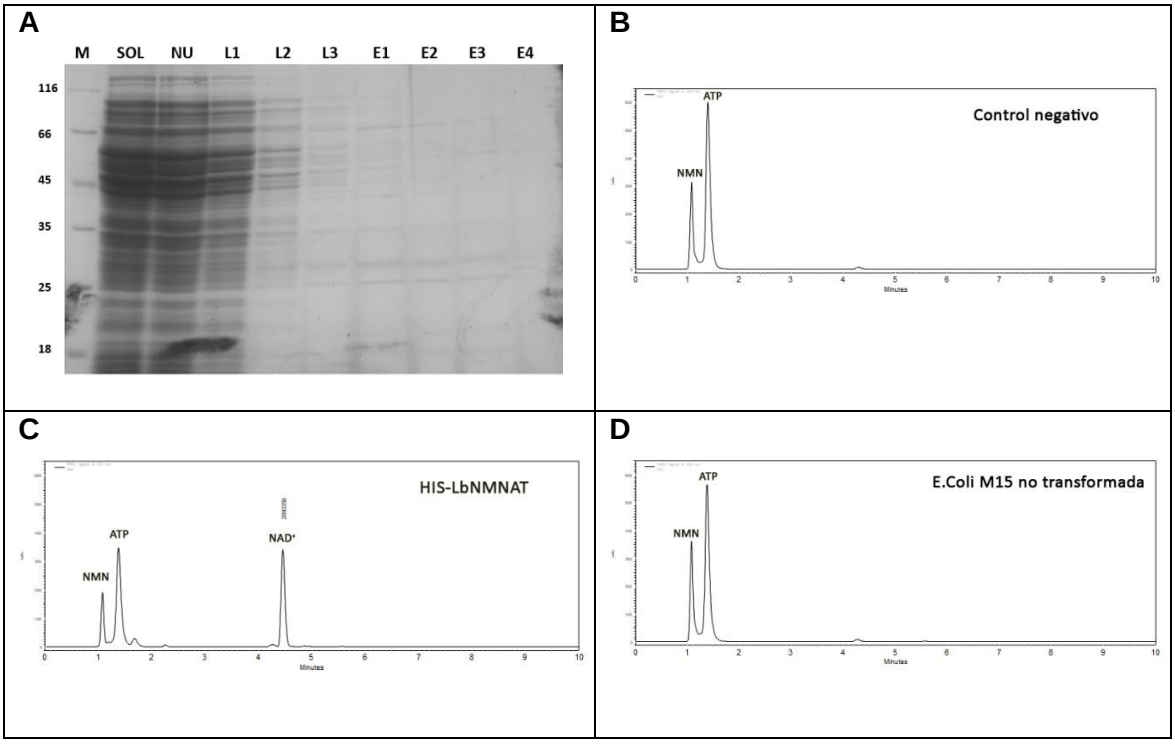
	Fracción	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)	Proteina total (mg)	Actividad total (U)	Actividad especifica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Condiciones iniciales	Lisado	6,65	6,00	39,91	19,28	0,48	100,00	
	Eluido	0,50	1,20	0,59	0,28	0,47	1,44	0,97
Condiciones reductoras.	Lisado	5,12	12,00	61,44	23,07	0,38	100,00	

	Eluido	0,29	3,25	0,95	0,84	0,88	3,62	2,34

Con el proceso de purificación modificado se logró el incremento en el rendimiento de la purificación, pasando de un 1.44 a 3.62 % (tabla 8-8, figura 8-9, B).

En la purificación parcial de la proteina recombinante LbNMNAT (figura 8-9), se observan algunas bandas que no corresponden al tamaño esperado de His-LbNMNAT (37.8 kDa). Estas proteínas podrían ser contaminantes que se encuentran en el sistema de expresión usado (*E. coli*) y que tienen afinidad con la resina debido posiblemente a tener motivos de unión a metales, proteínas que tienen grupos de histidinas en su superficie, proteínas que se unen a la heteróloga expresada como las chaperonas moleculares; y otras que tienen afinidad por el soporte utilizado en la cromatografía, como se ha reportado previamente [92]. Igualmente, bandas de menor peso molecular podrían corresponder a productos de degradación de la proteina recombinante [9]. El sistema de purificación empleado, permite purificar la proteina heteróloga expresada empleando la etiqueta de histidinas; sin embargo, las proteínas co-purificadas son un efecto usual que debe considerarse. En este estudio se tuvieron en cuenta estos contaminantes de la purificación, evaluando la posibilidad que estos pudieran tener un efecto en la actividad adenilil transferasa de la enzima. Así que; se planteó un experimento control, donde se sometió el extracto celular de células *E. coli* M15 no transformadas, al procedimiento de purificación antes descrito y llevar el producto obtenido a análisis de actividad enzimática (figura 8-10).

Figura 8-10: El sistema heterólogo *E. coli* M15, no exhibe actividad adenilil transferasa. A: Gel del proceso de purificación en extracto celular de *E. coli* M15 no transformada. M: marcador de peso molecular en kDa, SOL: fracción soluble de la lisis, NU: proteínas no retenidas por la resina de cobalto, L1-L3: lavados con concentraciones crecientes de imidazol (10, 20 y 35 mM, respectivamente), E1-E4: eludidos con imidazol al 300mM. SDS-PAGE acrilamida 12 %, teñido con azul de Coomassie. Cromatogramas de ensayos enzimáticos directos, evaluados por RP-HPLC, utilizando en **B:** control negativo (buffer de diálisis); **C**: control positivo de actividad, con 17 µl del producto de purificación desde *E. coli* M15 transformada con el vector pQE30-LbNMNAT e igualmente un volumen de 17 µl para el producto de purificación de las *E. coli* M15 no transformadas en **D**.



La proteina parcialmente purificada se utilizó para evaluar el efecto de los derivados imidazolicos como se describe a continuación.

Evaluación del efecto de los derivados imidazolicos sobre la actividad enzimática de His-LbNMNAT, por medio de ensayos enzimáticos directos acoplados a RP-HPLC.

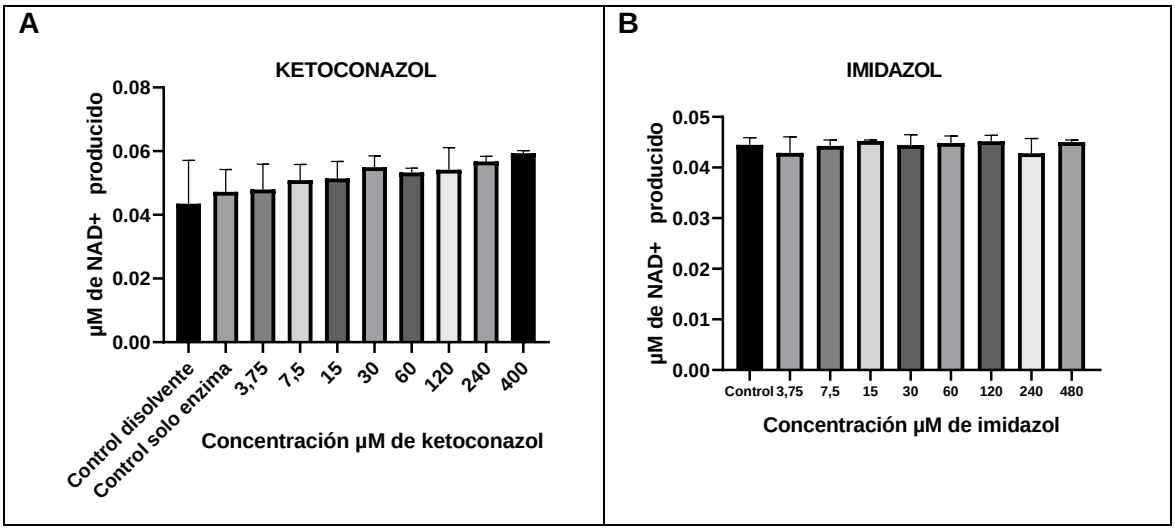
Para determinar el efecto que tenían los compuestos imidazolicos sobre la recombinante LbNMNAT, se compararon los ensayos enzimáticos directos en presencia y ausencia de los mismos.

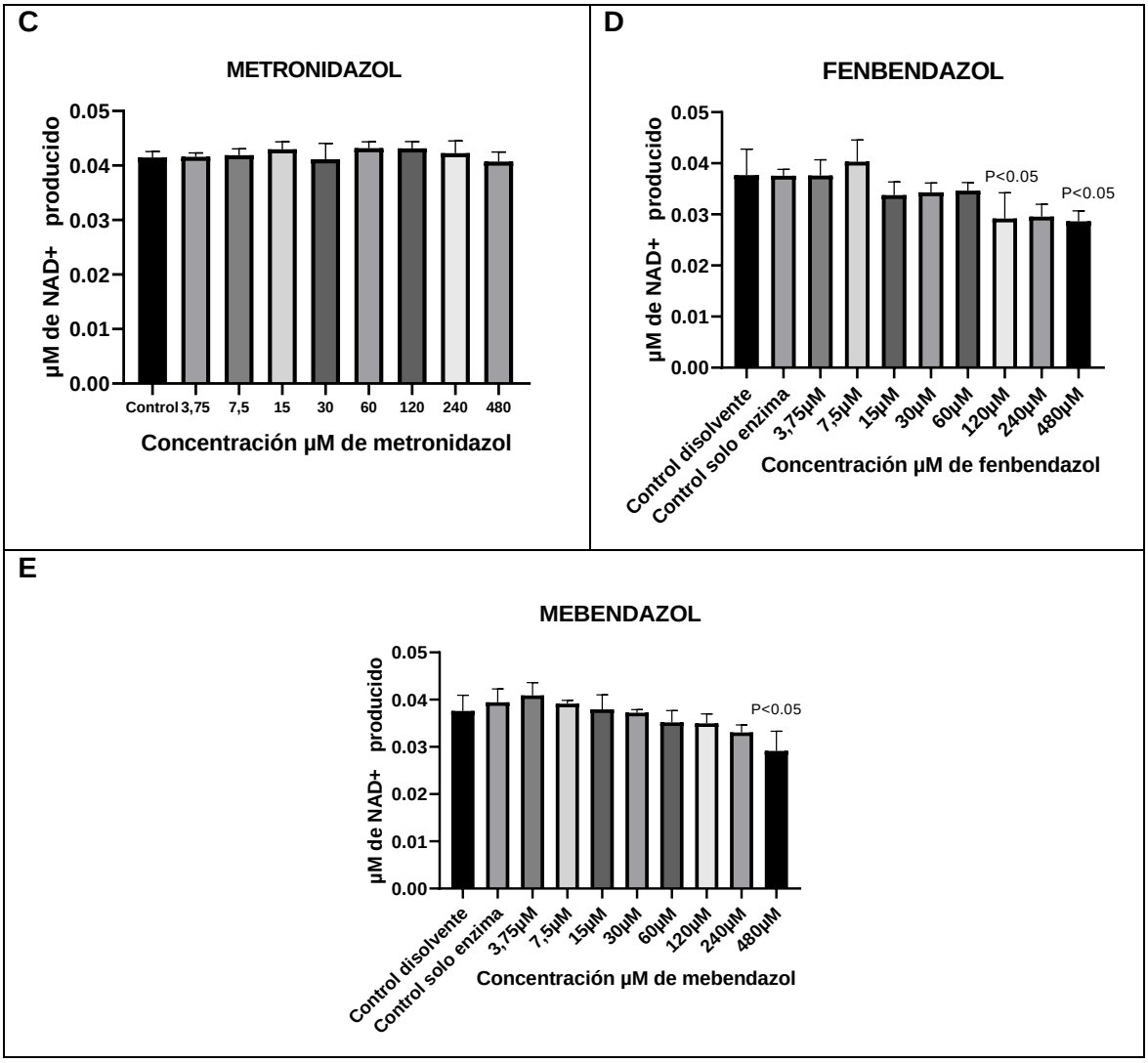
El rango de concentración de los medicamentos utilizados, se definió considerando aquellas, que pudieran tener un posible uso terapéutico; en relación con esto, Bhandari *et al.,* 2010 en sus evaluaciones de compuestos, sobre promastigotes de *Leishmania*, tomaron como criterio aquellos con IC50 menores a 15 µg/ml como activos (15 µg/ml equivale en concentraciones micromolar de los compuestos de este estudio a 28,2µM ketoconazol, 220,3 µM imidazol, 87,6µM metronidazol, 50.1µM fenbendazol y 50,7µM

mebendazol); por esta razón y a que moléculas reportadas con franco efecto inhibidor sobre la NMNAT tienen *Ki* en el rango micromolar [93], se evaluaron los medicamentos del presente estudio en concentraciones que van del 3 al 480 micromolar.

Los efectos de los compuestos se analizaron comparando la cantidad de NAD^+ producido en los controles (enzima sin medicamento o con solvente en el caso del ketoconazol, mebendazol y el fenbendazol, que se disuelven en DMSO), con el producido por la enzima a distintas concentraciones de los compuestos, para lo cual se utilizó un análisis de varianza de una vía ANOVA seguido de Dunnett's test, usando el software GraphPad Prism versión 8.0.2. No se encontraron cambios significativos en la actividad enzimática de la His-LbNMNAT (valor $p < 0.05$) con el ketoconazol, imidazol y metronidazol. Se evidenciaron efectos significativos para el fenbendazol en concentraciones 120µM y 480µM; y para el mebendazol a 480µM (figura 8-11).

Figura 8-11: Efecto de derivados imidazolicos sobre la actividad adenilil transferasa de la recombinante LbNMNAT. A: ketoconazol, B: imidazol, C: metronidazol, D: fenbendazol y E: mebendazol. Gráficos donde comparan el NAD+ producido por los controles (enzima sin medicamento o con el solvente del medicamento utilizado) y la enzima con las distintas concentraciones del medicamento, se indican las desviaciones estándar y el valor *p* para los efectos con significancia estadística <0.05.





Teniendo en cuenta los análisis bioinformáticos, todos los compuestos evaluados eran promisorios para un efecto inhibidor, por su afinidad por el sitio activo de la enzima; sin embargo, en las concentraciones evaluadas y bajo las condiciones del ensayo de actividad enzimática, solo dos, el fenbendazol y el mebendazol, mostraron un efecto sobre la actividad enzimática, estadísticamente significativo.

Los porcentajes de inhibición con relación a los controles, para los medicamentos que tuvieron efecto sobre la enzima fueron de 23,93 % para el fenbendazol a una concentración de 480µM (la máxima evaluada) que, bajo las condiciones experimentales establecidas, nos da un efecto poco apreciable para este medicamento. Estimación similar ocurre con el mebendazol, donde se encontró un porcentaje de inhibición del 22,58% a 480µM.

No se procedió a realizar los cálculos de IC50 para los medicamentos ya que solo se observó un efecto inhibitorio estadísticamente significativo, para dos de ellos, en las concentraciones máximas evaluadas, y se requeriría hacer experimentos adicionales con concentraciones más altas de los medicamentos para poder encontrar el IC50 usando el análisis de regresión logística de 4 parámetros, utilizado para este cálculo. Además, es poco probable que estas concentraciones tengan un efecto terapéutico [94]. No obstante, los resultados en un ensayo de inhibición de una enzima por una molécula, son afectados por las concentraciones de sus sustratos, sobre todo cuando se quiere calcular el valor de IC50 [95]. Las concentraciones de los sustratos en el ensayo de inhibición de este estudio, están aparentemente elevadas (1.25 mM ATP y 1.25 mM NMN), si se compara con los Km de los mismos, reportados para esta enzima (3,5 µM para el ATP y 178,7µM para el NMN), [9];sin embargo, previamente se habían experimentado condiciones similares (1.5mM de NMN y 1.25 de ATP)[96], para evaluar el efecto inhibitorio de la galotanina, un inhibidor reportado de las NMNATs humanas [93], demostrando su capacidad de inhibir también la LbNMNAT. Lo anterior nos indica que el ensayo tiene la capacidad de detectar inhibidores, y que los evaluados no tienen tal efecto, de una manera que sea apreciable.

Los imidazoles y sus derivados han sido ampliamente utilizados como medicamentos en una gran variedad de patologías, afectando la actividad de diferentes proteínas, gracias a su capacidad de aceptar y donar hidrógenos y afinidad por metales [49]. En nuestro grupo, observa el efecto inhibidor del imidazol sobre la recombinante LbNMNAT durante la purificación enzimática IMAC, [10] . Observaciones que no se confirmar en este trabajo. Los derivados imidazolicos evaluados experimentalmente presentan escaso efecto inhibitorio de la enzima incluso en las altas concentraciones usadas, debido a ello se creen de poca relevancia para la inhibición de la His-LbNMNAT. Así los efectos de estos medicamentos a nivel celular, podrían atribuirse a la inhibición de otras enzimas como la lanosterol 14-alfa-desmetilasa [78].

8.3 Estudio de la fosforilación de la His-LbNMNAT mediante el análisis de la actividad enzimática empleando mutantes fosfomiméticos.

Para continuar con la caracterización de la LbNMNAT se planteó el análisis de la fosforilación en una región específica de la enzima del parasito, con el propósito de evaluar

la relevancia de esta modificación postraducional sobre la actividad de la enzima y su potencial regulador.

8.3.1 Estudios *in silico* de la fosforilación de la LbNMNAT.

Se realizó la búsqueda bioinformática de los posibles sitios de fosforilación de la His-LbNMNAT, con el propósito de seleccionar aquellos que se llevarían a la fase experimental. El servidor NetPhos - 3.1 muestran que la serina 210 (S210) en la LbNMNAT, es el sitio de fosforilación más probable, dato que se corrobora con el servidor Phostryp, el cual es específico para tripanosomátidos, encontrando que ambos servidores concordaron al predecir el sitio de fosforilación con el score más alto. No obstante, existen diferencias con respecto a los aminoácidos predichos en otros sitios (Tabla 8-9). Al integrar las predicciones de los servidores en un alineamiento múltiple, con las secuencias de 6 especies de *Leishmania* y las tres ortologas humanas, se observa que la serina 210 se predice fosforilada para la LbNMNAT de especies del subgénero *Viania* en tanto que en el subgénero *Leishmania* esta sustituida por una arginina, lo que puede representar una diferencia molecular más de las ya reportadas, tales como las del ARN de interferencia, debido a presiones evolutivas [97]; este residuo se localiza en una de las cinco regiones no presentes en las ortólogas humanas. Resaltan también, la serina 250 (*score* de 0,988) usando el servidor NetPhos y la serina 256 (*score* de 0,78) con Phostryp ubicada en el motivo de unión a ATP, sitios comunes al género *Leishmania*. Estas diferencias en los resultados arrojados por los dos predictores utilizados, nos señalan la importancia de utilizar herramientas que sean lo más específicas a las especies estudiadas, ya que podríamos dejar de identificar sitios potenciales de fosforilación (figura 8-12).

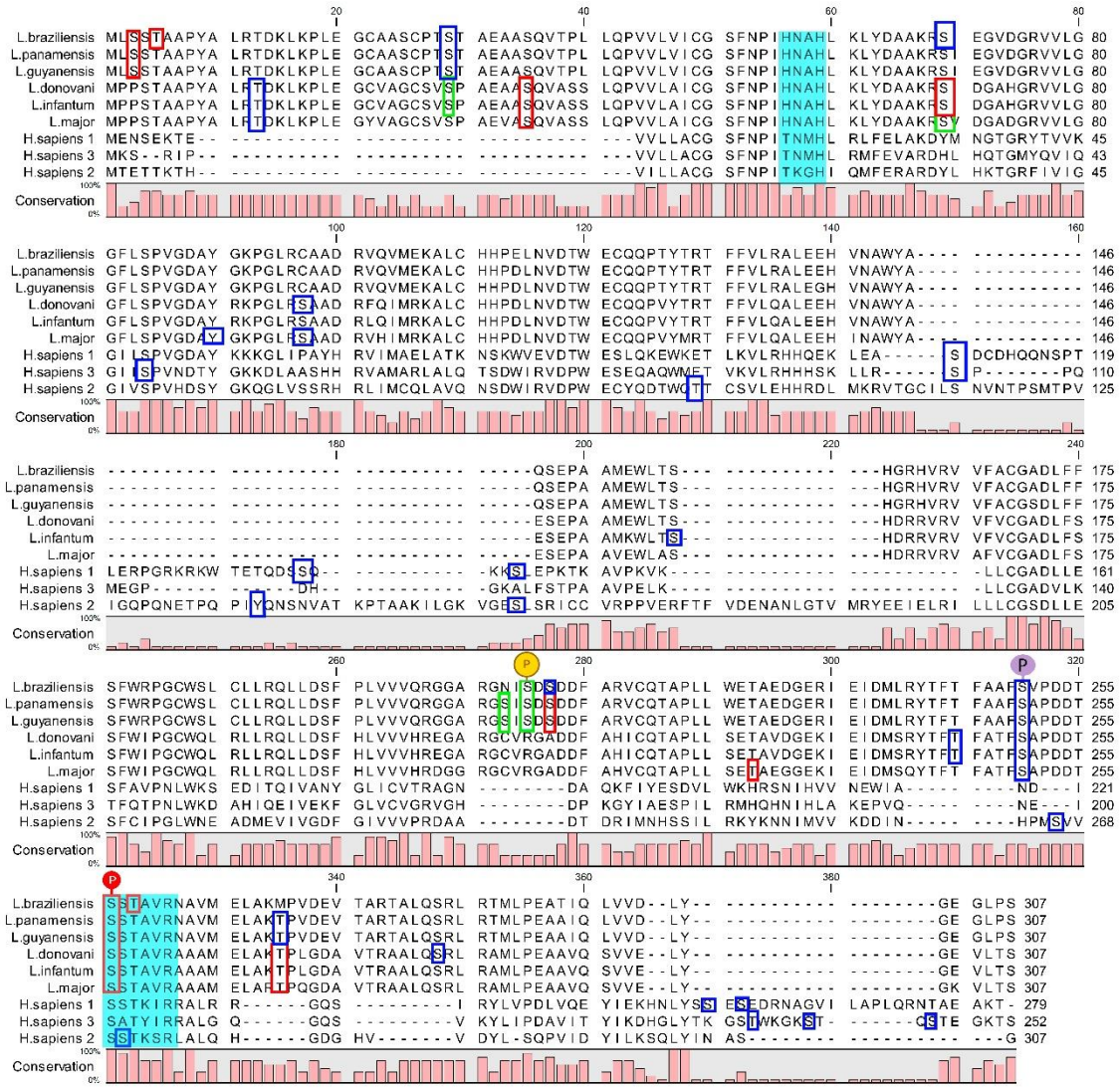
Tabla 8-9: Sitios de fosforilación de la His-LbNMNAT, predichos por los servidores NetPhos y Phostryp , con sus respectivos scores. Puntajes más cercanos a 1 indican mayor probabilidad ser sitios de fosforilación

Servidor	Sitio	Contexto	Score	Quinasa
NetPhos	S210	RGNI**S**DSDD	0.991	No se especifica
NetPhos	S250	FAAF**S**VPDD	0.988	No se especifica
NetPhos	S29	SCPT**S**TAEA	0.975	No se especifica
NetPhos	S69	AAKR**S**IEGV	0.946	No se especifica

NetPhos	S212	NISD**S**DDFA	0.923	No se especifica
NetPhos	S256*	PDDT**S**STAV	0.442	GSK3
Phostryp	S210	ARGNI**S**DSDDF	0.916	No se especifica
Phostryp	S256	VPDDT**S**STAVR	0.786	No se especifica
Phostryp	S3	---ML**S**STAAP	0.699	No se especifica
Phostryp	T258	DDTSS**T**AVRNA	0.654	No se especifica
Phostryp	T5	-MLSS**T**AAPYA	0.627	No se especifica
* Aunque no es uno de los sitios con mayor *score*, indicados por NetPhos; nos predice una quinasa para uno de los sitios de mayor *score* del servidor Phostryp.				

Con respecto al sitio S210 y S250 en *L. braziliensis,* no se predice la quinasa que podría estar fosforilando estos sitios; y para la serina 256 se predice la acción de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) la cual ha sido estudiada en *Trypanosoma brucei* y *L. major* [98], [99]. La GSK-3 ha sido objetivo de varias investigaciones por estar involucrada en el control del ciclo celular y apoptosis; además, se ha reportado que el uso de inhibidores de la enzima puede afectar la sobrevida de los parásitos [100], [101]. En *L.braziliensis* se reporta una proteina putativa para la GSK-3 (número de acceso en Genbank XP_001563953.1) aun no explorada.

Figura 8-12: Alineamiento de secuencias de la NMNAT de diferentes especies de *Leishmania* y las tres isoformas de la enzima humana. En recuadros rojos se muestras los sitios de fosforilación predichos con la herramienta Phostryp, en azul con NetPhos y en verde los sitios que conjuntamente predicen estos servidores. En transparencia celeste se muestra los motivos de unión a ATP. La “P amarilla” indica el sitio de fosforilación S210; “P morada”, el 250 y la “P roja”, el sitio 256.



Considerando lo anterior, se decidió continuar los análisis bioinformáticos y experimentales con la fosforilación en el sitio S210 (Figura 8-12 “P” amarilla), tomando como criterio el mayor *score* dado por los servidores bioinformáticos y su posición en una inserción exclusiva de la LbNMNAT respecto a las NMNAT humanas. Sin desestimar el potencial que tendría el estudio de otros sitios como la S256 para regular el funcionamiento de la

enzima, no obstante, en esta última, al presentarse también en las enzimas humanas su funcionalidad como posible blanco quimioterapéutico seria limitada.

Se realizaron los modelos de la estructura terciaria de la His-LbNMNAT nativa y su versión mutada His-LbNMNAT S210D (Figura 8-13,). La validación de los modelos realizada con el criterio de plot de Ramachandran y QMEAN, indico que los mejores modelos fueron predichos por el software Robetta, con más del 99 % de los ángulos de los residuos en las regiones permitidas; por esta razón, se utilizaron estos modelos para el acoplamiento molecular con los sustratos de la enzima (Tabla 8-10).

Figura 8-13: Superposición de los modelos de la estructura terciaria de la His-LbNMNAT predichos con el software Robetta. En rosado la enzima nativa y en azul su versión mutada His-LbNMNAT S210D. Se indica en verde el sitio de mutación S210D. Se encuentra un RMSD de 0.686 en 264 átomos.

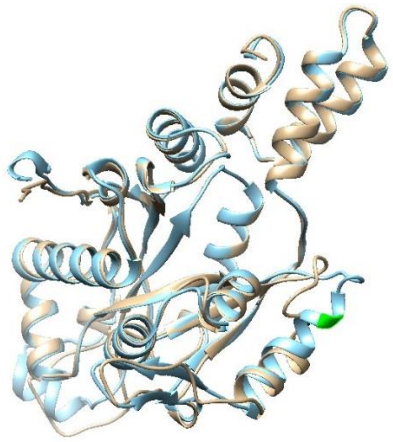
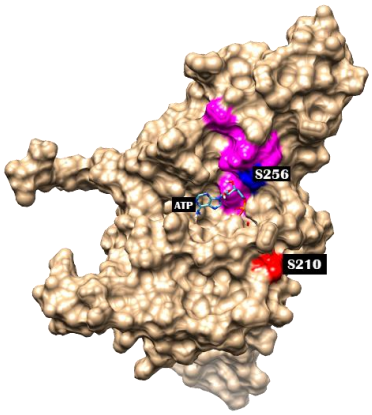


Tabla 8-10: Validación de los modelos de estructura terciaria de la His-LbNMNAT nativa y su versión His-LbNMNAT S210D.

	Ramachadran plot y QMEAN	Robetta	Alfafold2
Nativa	% Regiones Favorecidas	96,654	93.68
	% Regiones permitidas	2,974	2.230
	% Regiones no favorecidas	0,372	4.089
	QMEAN	0,010	-2.09
S210D	% Regiones Favorecidas	98,141	94.796
	% Regiones permitidas	1,115	1.115
	% Regiones no favorecidas	0,743	4.089
	QMEAN	1,090	-1.64

El análisis de acoplamiento molecular mostro que el sitio de fosforilación S210, no se encuentra dentro del sitio activo de la enzima (figura 8-14); Sin embargo, no es necesario que la fosforilación ocurra directamente en el sitio catalítico de una enzima para que puedan tener un efecto en su actividad, ya que algunas las modificaciones postraduccionales (MPT) pueden actuar alostericamente [102], [103].

Figura 8-14: Posición de los sitios de fosforilación predichos S210 (rojo) y S256 (azul) en el modelo de la estructura terciaria de la Lb-NMNAT generado con el software Robetta. En purpura se muestra el motivo de unión a ATP. Se observa la molecular de ATP interactuando en el sitio catalítico en la conformación predicha por el acoplamiento molecular.



Al comparar los resultados del acoplamiento molecular de las dos enzimas (figura 8-15), se observa que las energías de unión no se modifican en la interacción con el sustrato ATP (energías de los tres mejores acoplamientos para la enzima nativa -8.2, -7,8 y -7.7 kcal/mol; y para la enzima mutada -8.2, -7,6 y -7.6 kcal/mol). Con relación al sustrato NMN, se disminuyen para el mutante (energías de los tres mejores acoplamientos para la enzima nativa -7.3, -7,1 y -7.0 kcal/mol; y en la mutada -6,6, -6.6 y -6.4 kcal/mol). Lo anterior puede deberse a modificaciones en los modos de interacción con este sustrato, como los puentes de hidrogeno con la Arginina 202 entre otros (figura 8-16). También, se observa que la mutación fosfomimética genera un cambio en la estructura de un *random coil* por una hélice α, en el sitio de fosforilación (figura 8-4). Cambios en la estructura de las regiones intrínsecamente desordenadas causadas por las fosforilaciones de serinas, treoninas y tirosinas se han visto en otras proteínas [38], como ocurre con la amelogenina, proteina de la matriz extracelular involucrada en la generación del esmalte dental, la cual, cambian *random coil*, por estructuras organizadas, debido a la fosforilación en la serina 16 [39].

Figura 8-15: Acoplamiento molecular entre la His-LbNMNAT (Nativa y su versión mutada) con sus sustratos. Fuerzas de interacción entre la Lb-NMNAT con**: A**, ATP y **B**, NMN. Fuerzas de interacción entre la Lb-NMNAT S210D con**: C**, ATP y **D**, NMN. Las energías de unión se muestran entre paréntesis para cada acoplamiento. El sitio de fosforilación S210 (verde). Se muestran las tres mejores conformaciones moleculares.

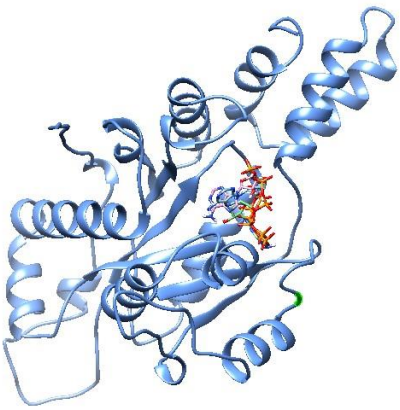
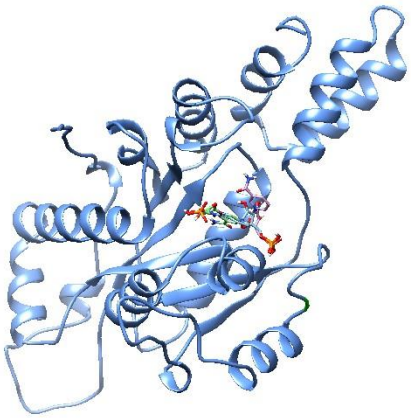
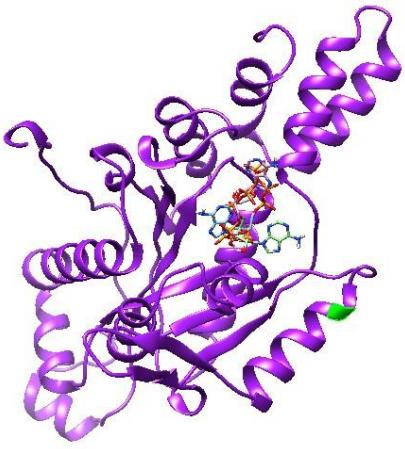
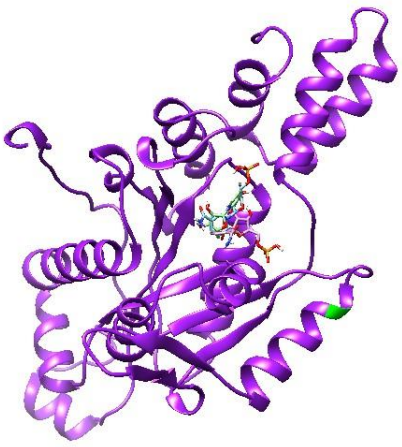
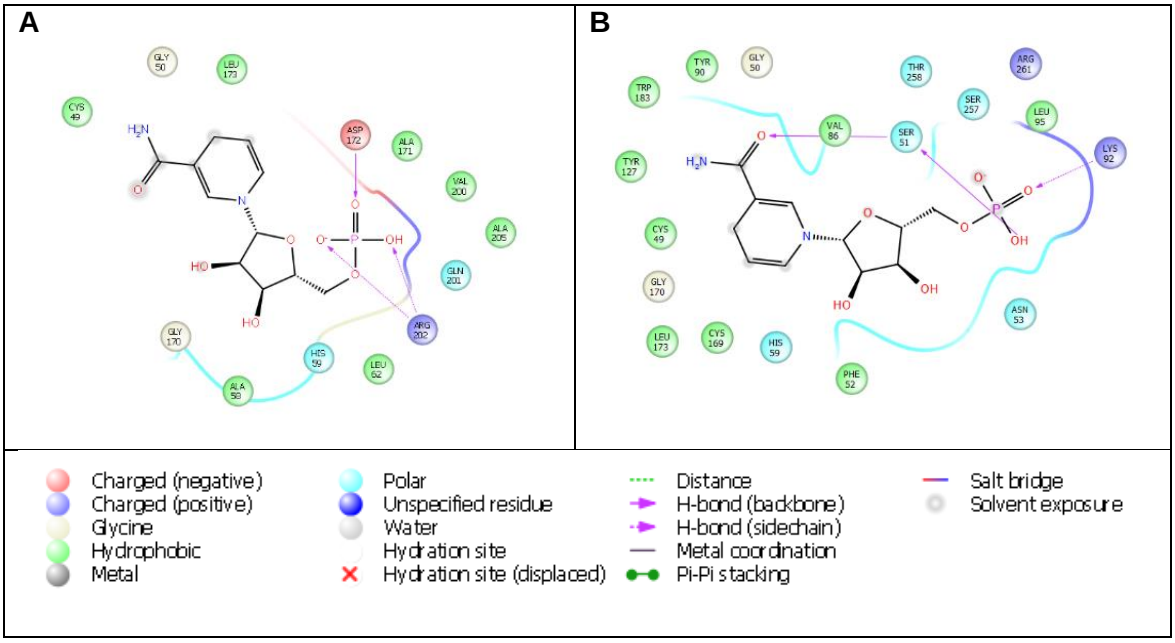
<table>
<tr>
<td>A
 
(-8.2, -7,8 y -7.7 kcal/mol)</td>
<td>B
 
(-7.3, -7,1 y -7.0 kcal/mol)</td>
</tr>
<tr>
<td>C
 
(-8.2, -7,6 y -7.6 kcal/mol)</td>
<td>D
 
(-6,6, -6.6 y -6.4 kcal/mol).</td>
</tr>
</table>

Figura 8-16: Interacciones moleculares del acoplamiento molecular entre el NMN y la LbNMNAT. **A** Interacciones LbNMNAT nativa con NMN. **B** Interacciones LbNMNAT S210D con NMN. En la parte inferior del grafico se muestran las representaciones que tiene cada tipo de interacción. Imágenes elaboradas con el software Maestro 10.3.



8.3.2 Estudio experimental de la fosforilación de la LbNMNAT.

En el estudio de la fosforilación de la LbNMNAT, se realizaron aproximaciones experimentales para corroborar la presencia de fosforilaciones en esta enzima por medio de herramientas inmunológicas y posteriormente se generó un mutante fosfomimético para así poder evaluar el efecto de la fosforilación en la S210 que se analizó bioinformaticamente.

Exploración experimental de la existencia de fosforilaciones en la enzima LbNMNAT endógena de *Leishmania braziliensis.*

Con el propósito de explorar la fosforilación de la proteina endógena en el parásito y considerando la baja concentración de la LbNMNAT en extractos celulares [13], se empleó como un primer acercamiento la inmunoprecipitación, para enriquecer el extracto celular.

Anticuerpos aviares (IgYs), Anti His-LbNMNAT generados previamente en nuestro grupo, fueron purificados por afinidad y utilizados para realizar la inmunoprecipitación (IP) de la NMNAT endógena de *Leishmania braziliensis*, a partir de la lisis de $1x10^7$ promastigotes en fase exponencial de crecimiento. El análisis del perfil electroforético del inmunoprecipitado mediante tinción con plata, revela una banda en el peso molecular esperado para la proteína LbNMNAT endógena (33.7 kDa), figura 8-17. La identidad de la banda inmunoprecipitada se confirmó con western blot (figura 8-18), empleando Anti His-LbNMNAT (IgYs). Se observan otras bandas en la inmunoprecipitación que pueden corresponder a proteínas que se asocian con la NMNAT y que indirectamente fueron co-inmunoprecipitadas.

Figura 8-1: Inmunoprecipitación de la His-LbNMNAT endógena, empleando anticuerpos aviares Anti His-LbNMNAT. 1: control positivo con His-LbNMNAT recombinante; M: marcador de peso molecular; 2: proteínas totales de lisis parásitos; 3: fracción insoluble de lisis parásitos; 4: fracción soluble lisis parásitos; 5: aclarado de IP; 6: no unidas de IP; 7-8: lavado 1-3 de IP, respectivamente; 9: Inmunoprecipitación de la His-LbNMNAT. SDS-PAGE discontinuo T15, tinción con plata.

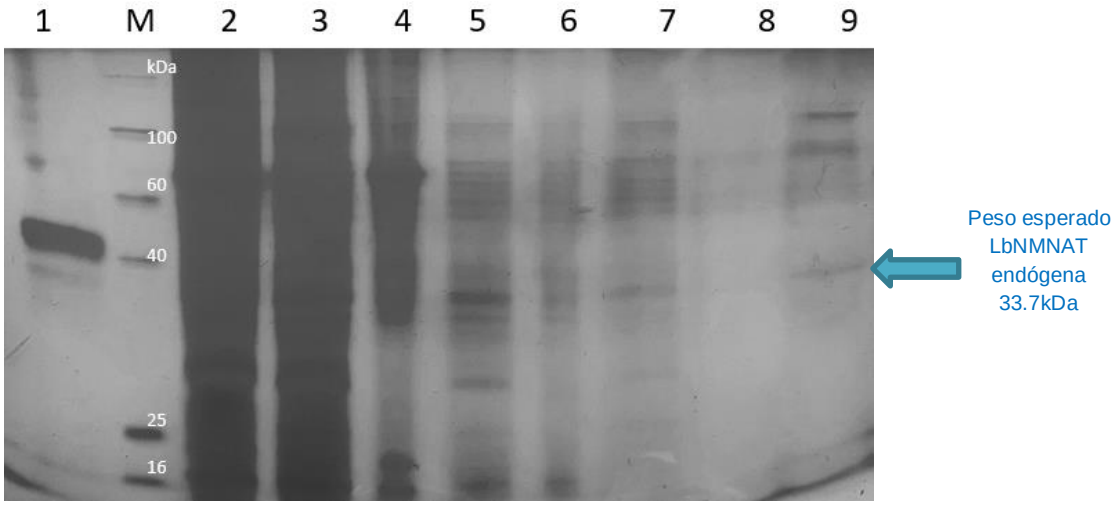
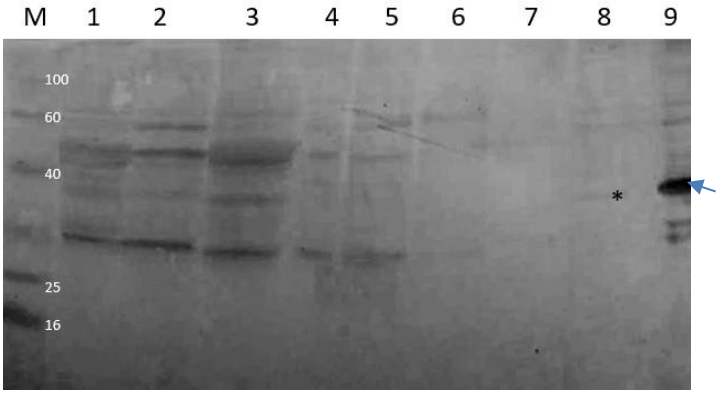


Figura 8-2: Reconocimiento de la LbNMNAT endógena, obtenida de la inmunoprecipitación, con anticuerpos aviares Anti His-LbNMNAT. M: marcador de peso molecular; 1: proteínas totales de Lisis parásitos; 2: fracción insoluble; 3: fracción soluble; 4: aclarado de IP; 5: no unidas de IP; 6-7-: lavado 1-3 de IP, respectivamente; 8: Inmunoprecipitación de la LbNMNAT 33.7 kDa, (*) indica la ubicación de la proteina. 9: control positivo con LbNMNAT recombinante 37.7kDa (←). Primario 6XHisLbNMNAT IgYs (1:5000), secundario Anti IgYs Fosfatasa alcalina (1:10000).



En el *western blot*, se reconoce una banda de baja intensidad en el peso esperado para la LbNMNAT nativa 33.7kDa, la cual es de menor tamaño en relación a la recombinante 37.7kD debido a la presencia en esta última de una etiqueta de histidinas. Al realizar la inmunodetección de la fosforilación con el anticuerpo αS-fosforilada (específico para serinas fosforiladas), dilución 1:1000 (Figura 8-19), no se detecta la fosforilación de la enzima His-LbNMNAT endógena. Esto puede atribuirse a la ausencia de fosforilación de la enzima bajo las condiciones analizadas o a la baja concentración de proteina inmunoprecipitada (figura 8-17). Por ello, para optimizar el ensayo es necesario enriquecer el inmunoprecipitado y también es posible variar las condiciones de cultivo con el objetivo de inducir la expresión de la proteina endógena.

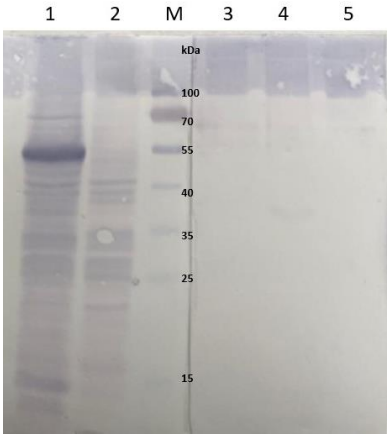
Resultados similares se obtuvieron en un trabajo anterior donde se analizó la interacción de la LbNMNAT con otras proteínas mediante inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas [13] y en un estudio de la NMNAT de un parásito relacionado, *T.cruzi*, donde se obtienen de forma similar bandas tenues en el inmunoprecipitado [72] . Lo anterior corrobora la baja expresión de esta enzima. No obstante, hay reportes de su sobreexpresión bajo condiciones de estrés como el choque térmico [104]. Condición que podría evaluarse para aumentar la concentración de la proteina en la muestra; igualmente podría mejorase la concentración de la proteina inmunoprecipitada al transfectar los

parásitos con un plásmido que contenga la secuencia codificante de la LbNMNAT, como se logró con éxito en el estudio de *T. cruzi*.

El reconocimiento de las fosforilaciones empleando el anticuerpo antifosfoserina dio una clara señal con la proteina recombínate, lo cual es de extrañar; aunque no hay reconocimiento inespecífico del control con BSA que pudiera estas asociado con un exceso de anticuerpo, es importante verificar este ensayo empleando bajas concentraciones del anticuerpo.

En relación al resultado anterior; recientes estudios han revelado el fosfoproteoma de *E. coli* con más 2000 sitios de fosforilación de relevancia en la regulación enzimática de estos organismos, con considerable conservación evolutiva. Aunque las quinasas y fosfatasas de estos procesos han sido poco estudiadas [105], [106] . Considerando lo anterior, dada la importancia de *E. coli* como plataforma de producción de proteínas es necesario estudiar el efecto de posibles fosforilaciones de proteínas heterologamente expresadas en este sistema.

Figura 8-3: Reconocimiento de la LbNMNAT endógena inmunoprecipitada con anticuerpos anti-fosfoserina. 1: Extracto totales parásitos; 2: fracción soluble lisis parásitos; M: marcador de peso molecular; 3: Proteina Inmunoprecipitada; 4: LbNMNAT recombinante; 5: BSA. Primario anti-αS-fosforilada (ON, 1:1000); secundario anti mouse biotina (1:8000) estreptavidina (1:5000) Fosfatasa alcalina, sustrato NTB



Finalmente se propone recolectar la banda obtenida de la inmunoprecipitación y realizar análisis de secuencia de proteínas, por medio de espectrometría de masas y confirmar nuestros hallazgos sobre la fosforilación de las serinas en la His-LbNMNAT.

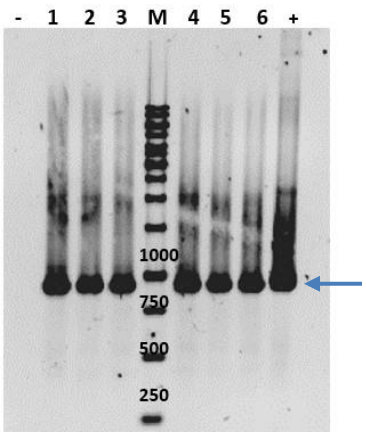
Generación del mutante fosfomimético S210D, mediante mutagénesis de sitio dirigido y evaluación de su actividad adenilil transferasa.

Se generó el mutante LbNMNAT S210D a partir del vector pQE30-LbNMNAT, mediante mutagénesis de sitio dirigido, la mutación fue confirmada por secuenciación (Anexo 2). Con este plásmido se obtuvo la enzima recombinante por medio de la transformación de bacterias en *E. coli* M15, que produjeron la enzima después inducir con IPTG (figura 8-20).

Se logró obtener la enzima LbNMNAT S210 parcialmente purificada por IMAC y para tener un control de los experimentos, también se purifico la enzima nativa, empleando las condiciones previamente estandarizadas. (figura 8-21).

Figura 8-4: Generación de la enzima LbNMNAT S210D. **A**. 1-6: PCR de colonias de *E. coli* M15 transformada con el plásmido His-LbNMNAT S210D obtenido de mutagénesis con kit de Agilent: - control negativo, +: control positivo, M: marcador de peso molecular en pb. Producto esperado de 936 pb. Gel de agarosa 1% (P/V) tratado con bromuro de etidio. **B.** Expresión de la His-LbNMNAT S210D (37.7 kDa); Control no transformado de células M15 no inducido en 1 e inducido en 2; Células transformadas con el plásmido LbNMNAT S210D no inducida en 3 e inducida en 4., SDS-PAGE acrilamida 12 %, teñido con azul de Coomassie. Las flechas indican los productos esperados.

A



B

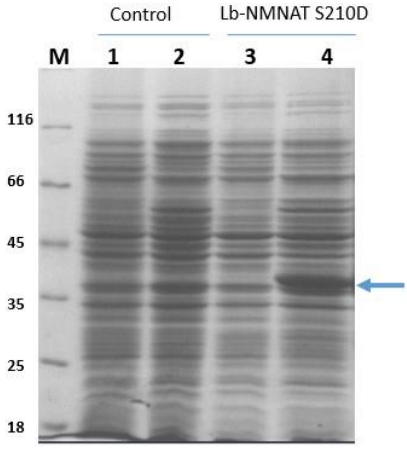
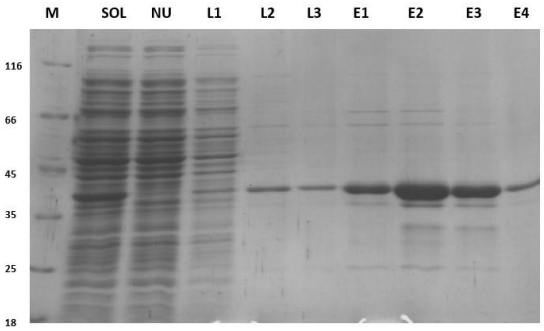
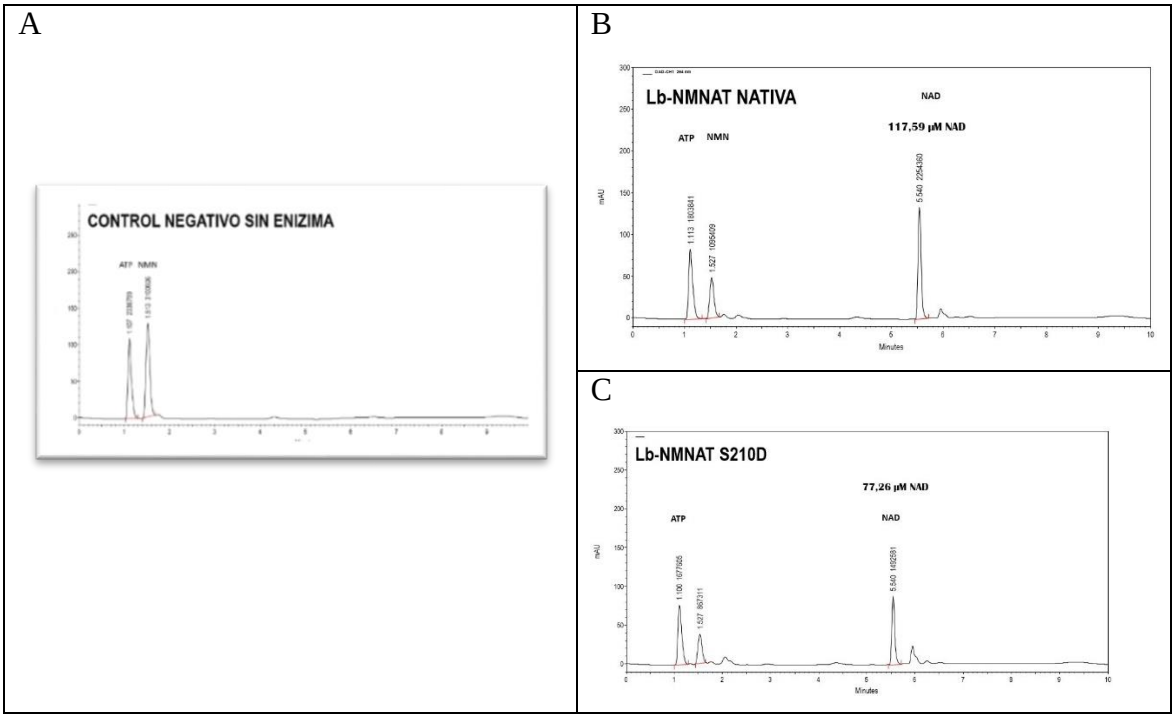


Figura 8-5: Purificación de la Lb-NMNAT S210D (37.7 kDa); **por IMAC.** M: marcador de peso molecular en kDa, SOL: fracción soluble de la lisis, NU: proteínas no retenidas por la resina de cobalto, L1-L3: lavados con concentraciones crecientes de imidazol (10, 20, 35 mM, respectivamente), E1-E4: eludidos con imidazol al 300mM. SDS-PAGE acrilamida 12 %, teñido con azul de Coomassie.



Las enzimas recombinantes LbNMNAT y LbNMNATS210D, parcialmente purificadas se emplearon para evaluar la actividad enzimática mediante ensayos directos (figura 8-22). Con los resultados se determinó que la fosforilación de la LbNMNAT en la serina 210 no está asociada a la inactivación de la enzima cómo se ha observado en otras proteínas al ser fosforiladas; como es el caso de la glucógeno sintasa cinasa 3, donde la fosforilación de la serina 9 interfiere con la unión de los sustratos en el sitio catalítico [107]. Aunque no es necesario que la fosforilación ocurra directamente en el sitio catalítico de una enzima para que puedan tener un efecto en su actividad, ya que algunas las MPT pueden actuar alostericamente [102], [103], como hubiese sido el caso de la fosforilación estudiada.

Figura 8-6: Evaluación de la actividad enzimática del mutante Lb-NMNAT S210D por ensayos directos. Cromatograma RP-HPLC (columna C18) en **A** control negativo sin enzima, **B** His-LbNMNAT y **C** Lb-NMNAT S210D.



En el caso de la LbNMNAT, al comparar la actividad adenilil transferasa de la nativa y su versión mutada, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p = 0,755), ver tabla 8-11; dejando a un lado la posibilidad que la fosforilación en este único sitio podría estar modulando la actividad de la enzima directamente.

Tabla 8-1: Diferencias en la actividad adenilil transferasa de la LbNMNAT nativa y LbNMNAT S210D. Se realizaron réplicas del experimento de actividad enzimática, cuantificando la cantidad de NAD+ Producido en el tiempo y condiciones establecidas del ensayo.

Enzima	µM de NAD+ Producido x 10^{-3}				Promedio	Desviación estándar
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4		
LbNMNAT nativa.	33,30	13,42	13,21	14,06	18,50	9,88
LbNMNAT S210D.	24,01	10,56	16,44	31,77	20,70	9,21
Valor *p* de significancia estadística de las diferencias en la actividad de las dos enzimas 0,7559,						

La fosforilación como un medio de regulación de la actividad enzimática, puede verse implicado en mecanismos de comunicación intra celulares que son más complejos que un efecto causado por un único cambio, haciéndose en ocasiones necesario que ocurran otras MPT, incluidas otras fosforilaciones, para conseguir un efecto esperado [108]. Aunque la mutación no parece tener un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática, el mutante mimético parece tener una mayor solubilidad, expresión y estabilidad frente a la proteina nativa (datos no mostrados). Estos resultados coinciden con la predicción de solubilidad (de 0.265 para la nativa y 0.290 para la mutada calculadas usando en servidor Protein-sol) , donde se aumenta debido al cambio del aminoácido. Lo anterior se relacionan con otros mecanismos regulatorios de la fosforilación tales como la estabilidad; y propiedades dinámicas y de unión de las proteínas [109].

La posición de la S210 se encuentra en la superficie expuesta de la proteina, haciéndola de fácil acceso para otras proteínas, como kinasas u otros monómeros de la misma enzima cuyas interacciones podrían verse afectadas por el estado de fosforilación en este residuo, como se ha demostrado en las proteínas SMAD y su oligomerización modulada por la fosforilación [110]. Con el propósito de determinar la relevancia de esta MPT, sería importante evaluar si la fosforilación en el sito S210 en la LbNMNAT está asociada a la modulación de funciones diferentes a las de adenilil transferasa, ya que a esta familia de proteínas se les ha atribuido otras funciones como la de chaperonas moleculares [111] .

9. Conclusiones y recomendaciones.

9.1 Conclusiones.

Con el propósito de continuar con la caracterización de la LbNMNAT, una enzima central en el metabolismo del NAD+ como potencial blanco quimioterapéutico se emplearon diversas estrategias metodológicas que involucran; el estudio con la LbNMNAT nativa empleando promastigotes del parásito para evaluar el efecto que tendrían algunos derivados imidazolicos sobre su viabilidad, la generación de mutantes empleando mutagénesis dirigida, la producción de proteínas recombinantes y la evaluación enzimática de los mismos. A partir de las cuales se presentan a continuación las principales conclusiones.

El método colorimétrico de MTT fue optimizado y nos permitió evaluar el efecto del ketoconazol sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis* con un IC50 de 27,9 µM, que a su vez funciono como control positivo del método. No se encontró efecto con el metronidazol ni el imidazol. El mebendazol presento un efecto estimulante de la viabilidad de los parásitos, que no había sido reportado antes y requiere de análisis adicionales, que incluyan el estudio de cambios morfológicos y metabólicos que puedan profundizar estos resultados.

En los ensayos de inhibición enzimática se encontraron efectos significativos con el fenbendazol y el mebendazol. No se encontró un efecto estadísticamente significativo del imidazol, metronidazol, y ketoconazol, en las concentraciones evaluadas, sobre la actividad enzimática de la His-LbNMNAT. El efecto observado sobre los promastigotes de *Leishmania* del ketoconazol no es debido a una inhibición directa sobre la NMNAT, sino posiblemente a su acción sobre otros blancos moleculares tales como la lanosterol 14-alfa-desmetilasa.

Integrando herramientas bioinformáticas y experimentales se evaluó el efecto de una modificación postraduccional, la fosforilación de la S210 de la proteina LbNMNAT. El acercamiento bioinformático revelo numerosos blancos de fosforilación, no obstante, se eligió la serina 210 por presentarse en una región exclusiva en la proteina del parásito, al compárala con las ortólogas humanas; cuya modificación según los ensayos de

acoplamiento molécula, podría alterar la interacción con el sustrato. El mutante fosfomimético generado mediante mutagénesis dirigida presenta actividad catalítica, lo que descarta un efecto inactivador. Al comparar la actividad adenilil transferasa de la enzima nativa y el mutante fosfomimético, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; descartando la posibilidad que la fosforilación en este único sitio podría estar modulando la actividad de la enzima directamente.

9.2 Recomendaciones.

En este estudio se establecieron las condiciones óptimas de la metodología de MTT para evaluar viabilidad de promastigote de *Leishmania* frente a diferentes medicamentos. No obstante, es importante el desarrollo de métodos alternativos de mayor sensibilidad y bajo costo. Ante ello, se recomienda se continúen con el desarrollo de parásitos transgénicos que expresen GFP, los cuales permitan monitorear efectos sobre el parásito de una forma directa.

Este trabajo abordo el estudio de compuestos imidazolicos (imidazol, ketoconazol, metronidazol, mebendazol y fenbendazol) como posibles inhibidores de la LbNMNAT con base en el amplio uso y espectro de actividad, con el fin de reposicionar estos medicamentos. Se observó solo inhibición con los derivados benzimidazólicos (fenbendazol y mebendazol). Se propone evaluar otros derivados benzimidazólicos como albendazol y triclabendazol el fin de determinar si estos pudieran tener un mayor efecto sobre la enzima.

Para optimizar las condiciones del ensayo de fosforilación de la LbNMNAT endógena, maximizando la recuperación de la proteina posiblemente fosforilada, se sugiere realizar los experimentos de inmunoprecipitación enriqueciendo el inmunoprecipitado mediante la sobrexpresión de la proteina en parásitos transfectados o induciendo incrementos en la expresión de la proteina variando las condiciones de cultivo.

El reconocimiento de la proteina recombinante LbNMNAT con anti-fosfoserina debe ser confirmado bien sea al disminuir el título del anticuerpo utilizado o la concentración de la proteina recombinante empleada en la inmunodetección.

Se propone recolectar la banda obtenida de la inmunoprecipitación y realizar análisis de secuencia de proteínas, por medio de espectrometría de masas y confirmar nuestros hallazgos sobre la fosforilación de las serinas en la LbNMNAT endógena.

10. Anexos

Anexo 1: Protocolo optimizado, para la evaluación del efecto de medicamentos sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, con el reactivo MTT.

1. En una microplaca de 96 pozos servir diferentes concentraciones del medicamento a evaluar (tenga en cuenta deja pozos para los controles de máxima y nula actividad del medicamento, y un blanco). A un volumen final de 50µl.

2. Adicionar 50µl de promastigotes en fase exponencial de Leishmania braziliensis una concentración de $1x10^6$ parásitos/ml.

3. Adicionar 50 µl de medio menos la cantidad de medicamento que se quiere adicionar.

4. Dejar incubar por 72 horas a 26 °C.

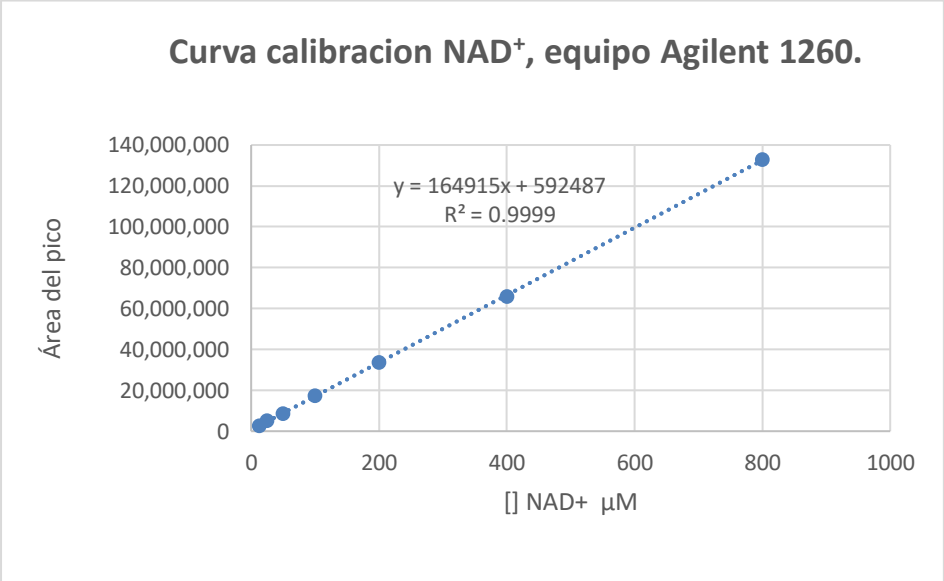
5. Adicionar a cada pozo 10µl de una solución de MTT a 7,5 mg/ml, en PBS. Dejar incubar por 4 horas a 37 °C.

6. Adicionar 100 µl de SDS 0,01N HCL y homogenizar.

7. Realizar la lectura en espectrofotómetro a un 540nm.

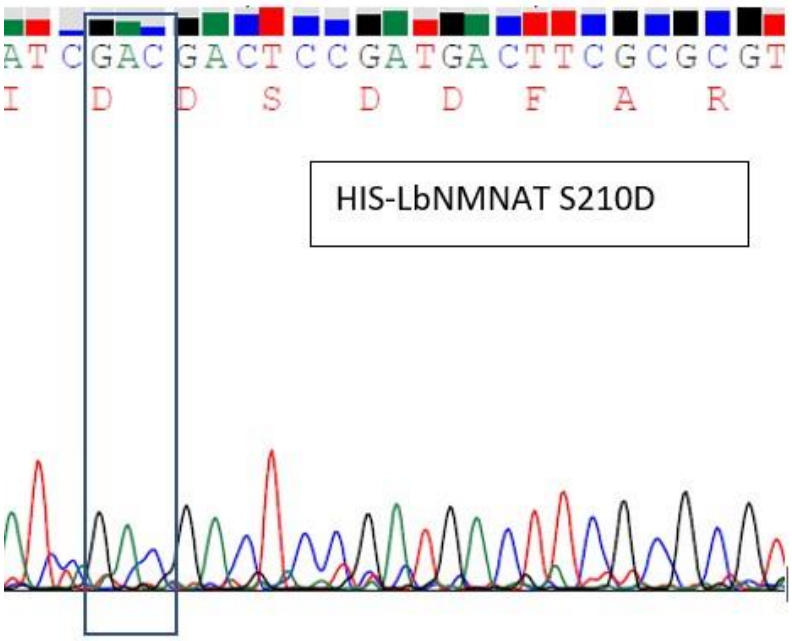
Anexo 2. Curva de calibración del NAD^+.

Se realizan curvas de calibración con patrones conocidos del NAD+ y el área que se detectaba, para cada uno. Se realizaron las curvas para el cromatógrafo Agilent 1260.



Anexo 3. Resultados secuenciación del mutante HIS-LbNMNAT S210D.

Se señala en el reculado azul el sitio 210, donde se observa el cambio por el ácido aspártico después de la mutagénesis de sitio dirigido.



11. Bibliografía

[1] G. Herrera, A. Teherán, I. Pradilla, M. Vera, y J. D. Ramírez, «Geospatial-temporal distribution of Tegumentary Leishmaniasis in Colombia (2007–2016)», *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 12, n.º 4, abr. 2018, doi: 10.1371/journal.pntd.0006419.

[2] L. E. Contreras, R. Neme, y M. H. Ramírez, «Identification and functional evaluation of Leishmania braziliensis Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase», *Protein Expr Purif*, vol. 115, pp. 26-33, nov. 2015, doi: 10.1016/j.pep.2015.08.022.

[3] S. A. Pulido *et al.*, «Improvement of the green fluorescent protein reporter system in Leishmania spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs», *Acta Trop*, vol. 122, n.º 1, pp. 36-45, abr. 2012, doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.015.

[4] T. Pineda, Y. Valencia, M. F. Flórez, S. A. Pulido, I. D. Vélez, y S. M. Robledo, «A non-commercial approach for the generation of transgenic Leishmania tarentolae and its application in antileishmanial drug discovery», *Parasitology*, vol. 143, n.º 9, pp. 1133-1142, ago. 2016, doi: 10.1017/S0031182016000585.

[5] O. P. de la Salud, «Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas, No. 10 (Diciembre 2021)», *Informe de Leishmaniasis*, dic. 2021, Accedido: 15 de octubre de 2022. [En línea]. Disponible en: https://iris.paho.org/handle/10665.2/55344

[6] V. V. Andrade-Neto, H. L. de Matos-Guedes, D. C. de O. Gomes, M. M. do Canto-Cavalheiro, B. Rossi-Bergmann, y E. C. Torres-Santos, «The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in Leishmania amazonensis», *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 107, n.º 3, pp. 416-419, may 2012, doi: 10.1590/S0074-02762012000300018.

[7] S. L. Croft, S. Sundar, y A. H. Fairlamb, «Drug resistance in leishmaniasis», *Clin Microbiol Rev*, vol. 19, n.º 1, pp. 111-126, ene. 2006, doi: 10.1128/CMR.19.1.111-126.2006.

[8] J. Chakravarty y S. Sundar, «Drug Resistance in Leishmaniasis», *J Glob Infect Dis*, vol. 2, n.º 2, p. 167, 2010, doi: 10.4103/0974-777X.62887.

[9] L. E. Contreras Rodríguez, «Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de Leishmania braziliensis (LbNMNAT)», Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2016.

[10] C. G. Granados Ramírez, L. E. Contreras Rodríguez, O. L. J. Joya, y M. H. Ramírez Hernández, «Efecto inhibitorio del imidazol sobre la actividad de la NMNAT de

Leishmania braziliensis», en *Libro de Memorias Del Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular. Medellín Colombia. ISBN 978-958-59491-1-9.*, 2016, p. 253.

[11] R. L. Charlton, B. Rossi-Bergmann, P. W. Denny, y P. G. Steel, «Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art», *Parasitology*, vol. 145, n.º 2, p. 219, feb. 2018, doi: 10.1017/S0031182017000993.

[12] H. V. Tolomeu y C. A. M. Fraga, «Imidazole: Synthesis, Functionalization and Physicochemical Properties of a Privileged Structure in Medicinal Chemistry», *Molecules*, vol. 28, n.º 2, ene. 2023, doi: 10.3390/MOLECULES28020838.

[13] L. J. Ortiz Joya, «Caracterización de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de Leishmania braziliensis (LbNMNAT) mediante análisis estructural y de interacción proteína-proteína», Universidad Nacional de Colombia, 2017.

[14] W. H. Organization, «Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010», *World Health Organ Tech Rep Ser*, n.º 949, pp. xii-xiii, 1-186, back cover, 2010.

[15] P. A. Bates, «Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies», *International Journal for Parasitology*, vol. 37, n.º 10. Pergamon, pp. 1097-1106, 1 de agosto de 2007. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.

[16] M. Akhoundi *et al.*, «A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies», *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, n.º 3. Public Library of Science, 3 de marzo de 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0004349.

[17] B. Zulfiqar, T. B. Shelper, y V. M. Avery, «Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development», *Drug Discovery Today*, vol. 22, n.º 10. Elsevier Ltd, pp. 1516-1531, 1 de octubre de 2017. doi: 10.1016/j.drudis.2017.06.004.

[18] D. Pace, «Leishmaniasis», *Journal of Infection*, vol. 69, n.º S1, pp. S10-S18, nov. 2014, doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.016.

[19] Pan American Health Organization, *Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas*. PAHO/WHO, 2019.

[20] «Leishmaniasis». https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis (accedido 15 de octubre de 2022).

[21] PubChem, «Nadide | C21H27N7O14P2 - PubChem». https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5892 (accedido 8 de mayo de 2020).

[22] M. Arenas-Jal, J. M. Suñé-Negre, y E. García-Montoya, «Therapeutic potential of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)», *Eur J Pharmacol*, vol. 879, p. 173158, jul. 2020, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173158.

[23] M. Pehar, B. A. Harlan, K. M. Killoy, y M. R. Vargas, «Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolism and Neurodegeneration», *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 28, n.º 18. Mary Ann Liebert Inc., pp. 1652-1668, 20 de junio de 2018. doi: 10.1089/ars.2017.7145.

[24] C. Cantó, K. J. Menzies, y J. Auwerx, «NAD+ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus», *Cell Metabolism*, vol. 22, n.º 1. Cell Press, pp. 31-53, 7 de julio de 2015. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023.

[25] I. Mesquita *et al.*, «Exploring NAD+ metabolism in host-pathogen interactions», *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, n.º 6. Birkhauser Verlag AG, pp. 1225-1236, 1 de marzo de 2016. doi: 10.1007/s00018-015-2119-4.

[26] A. S. Marletta, A. Massarotti, G. Orsomando, G. Magni, M. Rizzi, y S. Garavaglia, «Crystal structure of human nicotinic acid phosphoribosyltransferase», *FEBS Open Bio*, vol. 5, pp. 419-428, ene. 2015, doi: 10.1016/j.fob.2015.05.002.

[27] R. Capela, R. Moreira, y F. Lopes, «An overview of drug resistance in protozoal diseases», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n.º 22. MDPI AG, 2 de noviembre de 2019. doi: 10.3390/ijms20225748.

[28] S. Emami, P. Tavangar, y M. Keighobadi, «An overview of azoles targeting sterol 14α-demethylase for antileishmanial therapy», *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 135. Elsevier Masson SAS, pp. 241-259, 2017. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.044.

[29] P. R. Murumkar y R. B. Ghuge, «Vicinal Diaryl Oxadiazoles, Oxazoles, and Isoxazoles», en *Vicinal Diaryl Substituted Heterocycles*, Elsevier, 2018, pp. 277-303. doi: 10.1016/B978-0-08-102237-5.00009-2.

[30] N. Martínez-Matías y J. R. Rodríguez-Medina, «• REVIEW ARTICLE • Fundamental Concepts of Azole Compounds and Triazole Antifungals: A Beginner's Review», 2018.

[31] S. S. Braga, «Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing», *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 183. Elsevier Masson SAS, 1 de diciembre de 2019. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111660.

[32] J. S. de Araújo *et al.*, «Imidazole derivatives as promising agents for the treatment of Chagas disease», *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 63, n.º 4, abr. 2019, doi: 10.1128/AAC.02156-18.

[33] C. M. Cuesta y J. A. Hernández, «Desarrollo de nuevos fármacos en parasitología», en *Parasitología médica, 5e*, M. A. B. Flores, Ed., New York, NY: McGraw-Hill Education, 2019.

[34] R. G. Zhai, M. Rizzi, y S. Garavaglia, «Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme», *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, n.º 17. Cell Mol Life Sci, pp. 2805-2818, septiembre de 2009. doi: 10.1007/s00018-009-0047-x.

[35] C. Cui, J. Qi, Q. Deng, R. Chen, D. Zhai, y J. Yu, «Nicotinamide Mononucleotide Adenylyl Transferase 2: A Promising Diagnostic and Therapeutic Target for Colorectal Cancer», *Biomed Res Int*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1804137.

[36] M. Ginouves, B. Carme, P. Couppie, y G. Prevot, «Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against leishmania spp.», *J Clin Microbiol*, vol. 52, n.º 6, pp. 2131-2138, 2014, doi: 10.1128/JCM.00201-14.

[37] M. Ginouves, B. Carme, P. Couppie, y G. Prevot, «Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against leishmania spp.», *J Clin Microbiol*, vol. 52, n.º 6, pp. 2131-2138, 2014, doi: 10.1128/JCM.00201-14.

[38] S. Gupta y Nishi, «Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery», *Indian Journal of Medical Research*, vol. 133, n.º 1. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, pp. 27-39, enero de 2011.

[39] J. R. Haanstra, E. B. González-Marcano, M. Gualdrón-López, y P. A. M. Michels, «Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites», *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1863, n.º 5. Elsevier B.V., pp. 1038-1048, 1 de mayo de 2016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.015.

[40] A. A. Religa y A. P. Waters, «Sirtuins of parasitic protozoa: In search of function(s)», *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 185, n.º 2. Elsevier, pp. 71-88, octubre de 2012. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.08.003.

[41] S. K. Ardestani *et al.*, «Cell death features induced in Leishmania major by 1,3,4-thiadiazole derivatives», *Exp Parasitol*, vol. 132, n.º 2, pp. 116-122, oct. 2012, doi: 10.1016/j.exppara.2012.06.002.

[42] L. E. Contreras Rodríguez, R. Neme, y M. H. Ramírez, «Aproximación al Metabolismo del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD+) en Leishmania», *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, vol. 22, pp. 97-112, 2010.

[43] L. E. Contreras Rodríguez, M. Ziegler, y M. H. Ramírez Hernández, «Kinetic and oligomeric study of Leishmania braziliensis nicotinate/nicotinamide mononucleotide

adenylyltransferase», *Heliyon*, vol. 6, n.º 4, p. e03733, abr. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03733.

[44] L. Ortiz-Joya, L. E. Contreras-Rodríguez, y M. H. Ramírez-Hernández, «Protein-protein interactions of the nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase of leishmania braziliensis», *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 114, n.º 2, feb. 2019, doi: 10.1590/0074-02760180506.

[45] S. P. Georgiadou, K. P. Makaritsis, y G. N. Dalekos, «Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment», *J Transl Int Med*, vol. 3, n.º 2, pp. 43-50, dic. 2016, doi: 10.1515/jtim-2015-0002.

[46] E. L. Galvão, A. Rabello, y G. F. Cota, «Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis», *PLoS One*, vol. 12, n.º 10, oct. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0186117.

[47] V. V. Andrade-Neto *et al.*, «Leishmaniasis treatment: Update of possibilities for drug repurposing», *Frontiers in Bioscience - Landmark*, vol. 23, n.º 5, pp. 967-996, ene. 2018, doi: 10.2741/4629.

[48] R. L. Charlton, B. Rossi-Bergmann, P. W. Denny, y P. G. Steel, «Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: The-state-of-the-art», *Parasitology*, vol. 145, n.º 2. Cambridge University Press, pp. 219-236, 1 de febrero de 2018. doi: 10.1017/S0031182017000993.

[49] J. A. R. Vargas, A. G. Lopez, M. C. Piñol, y M. Froeyen, «Molecular docking study on the interaction between 2-substituted-4,5-difuryl Imidazoles with different Protein Target for antileishmanial activity», *J Appl Pharm Sci*, vol. 8, n.º 3, pp. 014-022, mar. 2018, doi: 10.7324/JAPS.2018.8303.

[50] A. Kumar, S. C. Pandey, y M. Samant, «Slow pace of antileishmanial drug development», *Parasitol Open*, vol. 4, 2018, doi: 10.1017/pao.2018.1.

[51] A. Niño y M. Camacho, «Leishmania (Viannia) braziliensis growth in vitro culture relies more on folic acid availability than Leihsmania (Leishmania) amazonensis», *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 100, n.º 3, pp. 309-310, 2005, doi: 10.1590/S0074-02762005000300017.

[52] M. E. Forero, M. Marín, A. Corrales, I. Llano, H. Moreno, y M. Camacho, «Leishmania amazonensis infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells», *Journal of Membrane Biology*, vol. 170, n.º 2, pp. 173-180, 1999, doi: 10.1007/s002329900547.

[53] B. J. Celeste y M. C. Guimarães, «Growth curves of Leishmania braziliensis braziliensis promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's Drosophila medium as assessed by anti-Leishmania

human sera.», *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, vol. 30, n.º 2, pp. 63-67, mar. 1988, doi: 10.1590/S0036-46651988000200001.

[54] T. Mosmann, «Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays», 1983.

[55] S. Rahimi *et al.*, «The leishmanicidal effect of Lucilia sericata larval saliva and hemolymph on in vitro Leishmania tropica», *Parasit Vectors*, vol. 14, n.º 1, pp. 1-12, dic. 2021, doi: 10.1186/S13071-020-04543-Y/TABLES/5.

[56] S. Muelas-Serrano, J. J. Nogal-Ruiz, y A. Gómez-Barrio, «Setting of a colorimetric method to determine the viability of Trypanosoma cruzi epimastigotes», *Parasitol Res*, vol. 86, n.º 12, pp. 999-1002, 2000, doi: 10.1007/PL00008532.

[57] J. Sambrook y Russell D.W, *Molecular Cloning: A Labortaroy Manual*. 2001. doi: 10.1128/AEM.68.3.1232.

[58] A. Dutta, S. Bandyopadhyay, C. Mandal, y M. Chatterjee, «Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis», *Parasitol Int*, vol. 54, n.º 2, pp. 119-122, 2005, doi: 10.1016/j.parint.2005.01.001.

[59] B. S. Borges, G. de P. Bueno, F. Tomiotto-Pellissier, F. B. Figueiredo, y L. C. Soares Medeiros, «In vitro anti-Leishmania activity of triclabendazole and its synergic effect with amphotericin B», *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, ene. 2023, doi: 10.3389/FCIMB.2022.1044665/FULL.

[60] V. D. Atayde, E. Ullu, y N. G. Kolev, «A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem-loop RNA», *Mol Biochem Parasitol*, vol. 184, n.º 1, p. 55, jul. 2012, doi: 10.1016/J.MOLBIOPARA.2012.04.003.

[61] O. Trott y A. J. Olson, «AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading», *J Comput Chem*, vol. 31, n.º 2, p. 455, ene. 2010, doi: 10.1002/JCC.21334.

[62] M. F. Sanner, «Python: a programming language for software integration and development - PubMed», *Journal of molecular graphics & modelling*, 1999. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10660911/ (accedido 24 de enero de 2022).

[63] E. F. Pettersen *et al.*, «UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis», *J Comput Chem*, vol. 25, n.º 13, pp. 1605-1612, oct. 2004, doi: 10.1002/JCC.20084.

[64] M. Bradford, «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding», *Anal Biochem*, vol. 72, n.º 1-2, pp. 248-254, may 1976, doi: 10.1006/abio.1976.9999.

[65] M. Emanuelli, N. Raffaelli, A. Amici, M. Fanelli, S. Ruggieri, y G. Magni, «Three-minute high-performance liquid chromatographic assay for NMN adenylyltransferase using a 20-mm-long reversed-phase column», *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 676, n.º 1, pp. 13-18, feb. 1996, doi: 10.1016/0378-4347(95)00408-4.

[66] R. Levy, E. Gregory, W. Borcherds, y G. Daughdrill, «p53 phosphomimetics preserve transient secondary structure but reduce binding to Mdm2 and MdmX», *Biomolecules*, vol. 9, n.º 3, p. 83, mar. 2019, doi: 10.3390/biom9030083.

[67] N. Blom, S. Gammeltoft, y S. Brunak, «Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites», *J Mol Biol*, vol. 294, n.º 5, pp. 1351-1362, dic. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.3310.

[68] A. Palmeri *et al.*, «PhosTryp: a phosphorylation site predictor specific for parasitic protozoa of the family trypanosomatidae», *BMC Genomics*, vol. 12, p. 614, dic. 2011, doi: 10.1186/1471-2164-12-614.

[69] M. Baek *et al.*, «Accurate prediction of protein structures and interactions using a 3-track neural network», *Science*, vol. 373, n.º 6557, p. 871, ago. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABJ8754.

[70] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, y M. Steinegger, «ColabFold: making protein folding accessible to all», *Nature Methods 2022 19:6*, vol. 19, n.º 6, pp. 679-682, may 2022, doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.

[71] R. J. Anderson, Z. Weng, R. K. Campbell, y X. Jiang, «Main-chain conformational tendencies of amino acids», *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 60, n.º 4, pp. 679-689, sep. 2005, doi: 10.1002/PROT.20530.

[72] D. M. Sánchez-Lancheros, L. F. Ospina-Giraldo, y M. H. Ospina-Giraldo, «Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of Trypanosoma cruzi (TcNMNAT): a cytosol protein target for serine kinases», *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 111, n.º 11, pp. 670-675, nov. 2016, doi: 10.1590/0074-02760160103.

[73] L. E. Contreras Rodríguez, «Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de Leishmania braziliensis (LbNMNAT)», 2016.

[74] J. Engebrecht, R. Brent, y M. A. Kaderbhai, *Minipreps of Plasmid DNA*, vol. 15, n.º 1. Wiley, 2001. doi: 10.1002/0471142727.mb0106s15.

[75] L. E. Contreras Rodríguez, «Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de Leishmania braziliensis (LbNMNAT)», 2016.

[76] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, y I. Kempson, «The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis», *Int J Mol Sci*, vol. 22, n.º 23, dic. 2021, doi: 10.3390/IJMS222312827/S1.

[77] Software GraphPad Prism, «Equation: Exponential growth». https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_exponential_growth.htm (accedido 12 de febrero de 2023).

[78] A. S. Nagle *et al.*, «Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis», *Chem Rev*, vol. 114, n.º 22, pp. 11305-11347, nov. 2014, doi: 10.1021/CR500365F/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2014-00365F_0012.JPEG.

[79] A. Shokri *et al.*, «Promising antileishmanial activity of novel imidazole antifungal drug luliconazole against Leishmania major: In vitro and in silico studies», *J Glob Antimicrob Resist*, vol. 14, pp. 260-265, sep. 2018, doi: 10.1016/J.JGAR.2018.05.007.

[80] D. C. de O. S. Nunes *et al.*, «Mitochondrial dysfunction on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induced by ketoconazole: insights into drug mode of action», *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 117, 2022, doi: 10.1590/0074-02760210157.

[81] M. L. Kennedy *et al.*, «Leishmanicidal and reversal multidrug resistance constituents from Aeonium lindleyi», *Planta Med*, vol. 77, n.º 1, pp. 77-80, 2011, doi: 10.1055/S-0030-1250144.

[82] R. E. Saenz, H. Paz, y J. D. Berman, «Efficacy of ketoconazole against Leishmania braziliensis panamensis cutaneous leishmaniasis», *Am J Med*, vol. 89, n.º 2, pp. 147-155, 1990, doi: 10.1016/0002-9343(90)90292-L.

[83] L. K. Rushworth *et al.*, «Repurposing screen identifies mebendazole as a clinical candidate to synergise with docetaxel for prostate cancer treatment», *Br J Cancer*, vol. 122, n.º 4, p. 517, feb. 2020, doi: 10.1038/S41416-019-0681-5.

[84] «JPMA - Journal Of Pakistan Medical Association». https://jpma.org.pk/article-details/5571?article_id=5571 (accedido 30 de enero de 2023).

[85] C. Alauzet, A. Lozniewski, y H. Marchandin, «Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review», *Anaerobe*, vol. 55. Academic Press, pp. 40-53, 1 de febrero de 2019. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.10.004.

[86] A. Naif, H. Hasan, y K. Kadhim, «Metronidazole versus Pentostam for treatment of cutaneous leishmaniasis», *Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche*, vol. 177, n.º 11, pp. 611-616, nov. 2018, doi: 10.23736/S0393-3660.17.03627-0.

[87] J. S. Keithly y S. G. Langreth, «Inefficacy of Metronidazole in Experimental Infections of Leishmania Donovani, L. Mexicana, and Trypanosoma Brucei Brucei», *Am J Trop Med Hyg*, vol. 32, n.º 3, pp. 485-496, may 1983, doi: 10.4269/AJTMH.1983.32.485.

[88] D. Leitsch, «A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy», *Parasitology*, vol. 146, n.º 9, pp. 1167-1178, ago. 2019, doi: 10.1017/S0031182017002025.

[89] M. P. Deutscher, «Chapter 10 Maintaining Protein Stability», *Methods Enzymol*, vol. 463, n.º C, pp. 121-127, ene. 2009, doi: 10.1016/S0076-6879(09)63010-X.

[90] R. R. Burgess, «Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins», *Methods Enzymol*, vol. 463, n.º C, pp. 259-282, ene. 2009, doi: 10.1016/S0076-6879(09)63017-2.

[91] W. W. Cleland, «DITHIOTHREITOL, A NEW PROTECTIVE REAGENT FOR SH GROUPS», *Biochemistry*, vol. 3, n.º 4, pp. 480-482, abr. 1964, doi: 10.1021/BI00892A002.

[92] V. M. Bolanos-Garcia y O. R. Davies, «Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1760, n.º 9, pp. 1304-1313, sep. 2006, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2006.03.027.

[93] R. Petrelli, K. Felczak, y L. Cappellacci, «NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) and NAD kinase (NADK) inhibitors: chemistry and potential therapeutic applications», *Curr Med Chem*, vol. 18, n.º 13, pp. 1973-1992, may 2011, doi: 10.2174/092986711795590048.

[94] G. Indrayanto, G. S. Putra, y F. Suhud, «Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research», *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, vol. 46, pp. 273-307, ene. 2021, doi: 10.1016/BS.PODRM.2020.07.005.

[95] G. W. Caldwell, Z. Yan, W. Lang, y J. A. Masucci, «The IC(50) concept revisited», *Curr Top Med Chem*, vol. 12, n.º 11, pp. 1282-1290, may 2012, doi: 10.2174/156802612800672844.

[96] C. G. Granados-Ramírez, L. E. Contreras-Rodríguez, y M. H. Ramírez-Hernández, «Optimización del ensayo de inhibición de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa de Leishmania braziliensis», *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat*, vol. 45, n.º 176, pp. 721-730, jul. 2021, doi: 10.18257/RACCEFYN.1272.

[97] L. F. Lye *et al.*, «Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans», *PLoS Pathog*, vol. 6, n.º 10, p. e1001161, oct. 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1001161.

[98] K. K. Ojo *et al.*, «Glycogen Synthase Kinase 3 Is a Potential Drug Target for African Trypanosomiasis Therapy», *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 52, n.º 10, p. 3710, oct. 2008, doi: 10.1128/AAC.00364-08.

[99] K. K. Ojo *et al.*, «Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from Leishmania major and comparative inhibitor structure–activity relationships with Trypanosoma brucei GSK-3», *Mol Biochem Parasitol*, vol. 176, n.º 2, pp. 98-108, abr. 2011, doi: 10.1016/J.MOLBIOPARA.2010.12.009.

[100] A. Efstathiou y D. Smirlis, «Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis», *Microorganisms*, vol. 9, n.º 4, abr. 2021, doi: 10.3390/MICROORGANISMS9040691.

[101] E. Xingi *et al.*, «6-Br-5methylindirubin-3′oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis», *Int J Parasitol*, vol. 39, n.º 12, pp. 1289-1303, oct. 2009, doi: 10.1016/J.IJPARA.2009.04.005.

[102] J. Guo y H. X. Zhou, «Protein Allostery and Conformational Dynamics», *Chem Rev*, vol. 116, n.º 11, p. 6503, jun. 2016, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00590.

[103] L. Uhrik *et al.*, «Allosteric changes in HDM2 by the ATM phosphomimetic S395D mutation: implications on HDM2 function», *Biochemical Journal*, vol. 476, n.º 21, p. 3401, nov. 2019, doi: 10.1042/BCJ20190687.

[104] Y. O. Ali, R. McCormack, A. Darrand, y R. G. Zhai, «Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Is a Stress Response Protein Regulated by the Heat Shock Factor/Hypoxia-inducible Factor 1α Pathway», *J Biol Chem*, vol. 286, n.º 21, p. 19089, may 2011, doi: 10.1074/JBC.M111.219295.

[105] E. Schastnaya *et al.*, «Extensive regulation of enzyme activity by phosphorylation in Escherichia coli», *Nature Communications 2021 12:1*, vol. 12, n.º 1, pp. 1-11, sep. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25988-4.

[106] B. Macek *et al.*, «Phosphoproteome analysis of E. coli reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation», *Mol Cell Proteomics*, vol. 7, n.º 2, pp. 299-307, feb. 2008, doi: 10.1074/MCP.M700311-MCP200.

[107] E. Beurel, S. F. Grieco, y R. S. Jope, «Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases», *Pharmacol Ther*, vol. 0, p. 114, 2015, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2014.11.016.

[108] M. Julien, C. Bouguechtouli, A. Alik, R. Ghouil, S. Zinn-Justin, y F. X. Theillet, «Multiple Site-Specific Phosphorylation of IDPs Monitored by NMR», *Methods in Molecular Biology*, vol. 2141, n.º 26, pp. 793--817, 2020, doi: 10.1007/978-1-0716-0524-0_41.

[109] H. Nishi, A. Shaytan, y A. R. Panchenko, «Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation», *Front Genet*, vol. 5, n.º AUG, p. 270, ago. 2014, doi: 10.3389/FGENE.2014.00270/BIBTEX.

[110] B. M. Chacko, B. Qin, J. J. Correia, S. S. Lam, M. P. de Caestecker, y K. Lin, «The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization», *Nat Struct Biol*, vol. 8, n.º 3, pp. 248-253, 2001, doi: 10.1038/84995.

[111] J. M. Brazill, C. Li, Y. Zhu, y R. G. Zhai, «NMNAT: It's an NAD+ Synthase… It's a Chaperone… It's a Neuroprotector», *Curr Opin Genet Dev*, vol. 44, p. 156, jun. 2017, doi: 10.1016/J.GDE.2017.03.014.