UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL INTERCAMBIADOR PUTATIVO LbClC-A EN UNA CEPA DE *Leishmania spp.*

Andrea Viviana Ortegón Vergara

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Bioquímica
Ciudad, Colombia
2017

TÍTULO ACEPTADO: GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL INTERCAMBIADOR PUTATIVO LbClC-A EN UNA CEPA DE *Leishmania spp*

TÍTULO SUGERIDO: GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA CEPA DE *Leishmania* spp. EXPRESANDO EL PLÁSMIDO *pSP72RαneoαGFP-LbClC-A*, UN CONSTRUCTO DE SOBREEXPRESIÓN

Andrea Viviana Ortegón Vergara

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director (a):

MD., Ph. D. María Marcela Camacho Navarro

Línea de Investigación:

Propiedades de membrana en el modelo *Leishmania*-macrófago y otros modelos

Grupo de Investigación:

Biofísica y Biología de Membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

Ciudad, Colombia

2017

Agradecimientos

A las entidades patrocinadoras de este proyecto, Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia, a la Dra. María Marcela Camacho por permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo y por su tutoría, a Ángela Cristina Zapata por su enseñanza y apoyo incondicional, a Yamile Adriana Celis, Marcela Parra Muñoz, Carlos esteban Franco, Andrea Buitrago, Andrés Felipe Leal, Diana Londoño y Andrés Gonzales por su colaboración y apoyo y a todos aquellos que de un modo u otro contribuyeron con el desarrollo de este trabajo, por su apoyo emocional e intelectual.

Resumen

Las Leishmaniosis, consideradas un problema de salud pública, son enfermedades transmitidas por vectores, y tienen un amplio rango de presentaciones clínicas. Su agente etiológico son parásitos del género *Leishmania*.

Dentro de su ciclo de vida, *Leishmania spp.* está expuesto a fluctuaciones en el ambiente entre el intestino del insecto vector y las células mononucleadas del hospedero mamífero, que ha llevado a que desarrolle mecanismos que le permitan sobrevivir a estos cambios. El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto de la sobrexpresión de *LbClC-A* en el ciclo de vida del parásito. Para esto se generó una cepa de *Leishmania* transfectada con un plásmido que contiene la secuencia completa del gen *LbClC-A* y se evaluaron su morfología, crecimiento *in vitro* y capacidad de infección de una línea celular de macrófagos. Los resultados evidencian disminución en la tasa de crecimiento, cambio en la morfología y baja tasa de infectividad, al igual que alteración de la respuesta de decremento regulado de volumen desencadenada por un reto hipoosmolar en la cepa transfectada con respecto al control.

Palabras clave: *Leishmania*, *LbClC-A*, hipoosmolar, morfología

Abstract

Leishmaniasis considered a public health problem, are diseases transmitted by vectors with a wide range of clinical presentations. Their etiologic agents are parasites of the *Leishmania* genus.

Within its life cycle, *Leishmania spp*. is exposed to environmental fluctuations between the intestine of the insect vector and the mononuclear cells of the mammalian host. Therefore, this parasite has developed mechanisms to survive these changes. The objective of this work was to study the impact of the overexpression of LbClC-A in the *in vitro* life cycle of the parasite. For this, a strain of *Leishmania* was transfected with a plasmid containing the complete sequence of the gene LbClC-A and its morphology, *in vitro* growth and ability to infect a macrophage cell line were evaluated. The results show a decrease in the growth rate, changes in the morphology of the parasite and low infectivity rate, as well as alteration of the regulated volume decrement response triggered by a hypo-osmolar challenge in the transfected parasites compared to controls.

Keywords: Leishmania, LbClC-A, hypoosmolar , morphology

Contenido

	Pág.
Resumen	**IV**
Lista de Figuras	**VIII**
Lista de tablas	**VIII**
Lista de Símbolos y abreviaturas	**IX**
Introducción	11
1. Capítulo 1	17
1.1. Ciclo de vida de *Leishmania spp*……	17
1.2. Respuesta de *Leishmania* a cambios de pH extracelular……	19
1.3. Canales iónicos……	20
1.3.1. Canales aniónicos……	21
1.3.1.1. Canales de cloruro……	21
1.4. Familia de ClC……	21
1.4.1. Familia ClC de *Leishmania spp*……..	24
2. Capítulo 2	26
2.1. Materiales y métodos……..	27
2.1.1. Construcción del plásmido *pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A*…	27
2.1.2. Verificación del constructo……	27
2.1.3. Condiciones de cultivo de *Leishmania*……..	28
2.1.4. Transfección con el plásmido *pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A*..	29
2.2. Resultados……	29
2.2.1. Verificación del constructo FULL-A……	29
2.2.2. Evaluación de la expresión del plásmido FULL-A……	30
3. Capítulo 3	32
3.1. Materiales y métodos……..	32
3.1.1. Curvas de crecimiento……	32
3.1.2. Medidas morfométricas……	33
3.1.3. Retos hipo-osmóticos……..	33
3.2. Resultados……	34
3.2.1. FULL-A presenta una menor tasa de crecimiento……..	34
3.2.2. Diferencias morfológicas de FULL-A……	35
3.2.3. Baja respuesta de la cepa FULL-A a cambios hipo-osmóticos……	40

4. Capítulo 4 43
4.1. Materiales y métodos……... 43
4.1.1. Amastigotes axénicos……. 43
4.1.2. Infecciones de macrófagos de ratón de la línea J774.A1……. 44
4.2. Resultados……..... 44
4.2.1. Baja tasa de transformación a amastigotes axénicos de la cepa FULL-A…….. 44
4.2.2. Infección de la línea celular de macrófagos murinos J774.A1. 47

5. Capitulo 5 48
5.1. Materiales y métodos…… 48
5.1.1. Evaluación de los niveles de expresión del intercambiador putativo LbClC-A por *Western Blot*…… 48
5.1.2. Tipificación de las cepas de *Leishmania* objeto de estudio… 49
5.2. Resultados…… 50
5.2.1. Niveles de expresión de la proteína LbClC-A……. 50
5.2.2. Tipificación de las cepas objeto de estudio……. 52
5.2.3. Proteína homologa de LbClC-A en *L. (V.) tropica*…… 54

6. Capitulo 6 56

7. **Conclusiones y recomendaciones**…… 59
7.1. Conclusiones……... 59
7.2. Recomendaciones……. 59

A. **Anexo A:** Digestiones *in silico* del plásmido *pSP72RαNEOαGFP* con las enzimas XbaI y BamHI……. 61

B. **Anexo B:** Confirmación de a presencia del plásmido *pSP72RαNEOαGFP* por *PCR*……... 64

C. **Anexo C:** Restos osmótios representados por cepas…… 65

D. **Anexo D:** Secuencia pepitica de la proteína LbClC-A (numero de acceso *GenBank*: ALG38030.1)…… 66

E. **Anexo E:** Alineamientos de la secuencia polipeptídica de la proteína LbClC-A *(ALG8030.1) y Leishmania (taxid: 5658)*…… 67

F. **Anexo F:** Alineamientos con secuencias de referencia (GenBank) del gen HSP70, de las cepas de *L. donovani, L. major, L. aethiopica y L. tropica,* para la determinación de la especie de *Leishmania*…… 71

Bibliografía……..... 76

Lista de figuras

		Pág.
Figura 1-1:	Ciclo de vida de *Leishmania*……	19
Figura 2-1:	Esquema plásmido *pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A*……..	27
Figura 2-2:	Digestión del plásmido *pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A*……...	30
Figura 2-3:	Detección de genes asociados al plásmido *pSP72RαNEOαGFP*…	31
Figura 3-1:	Curva de crecimiento de promastigotes……	35
Figura 3-2:	Morfología de promastigotes……...	36
Figura 3-3:	Morfología de promastigotes en fase de crecimiento logarítmica (48h) o estacionaria (144h)…….	37
Figura 3-4:	Rosetas……...	38
Figura 3-5:	Diámetro rosetas……..	39
Figura 3-6:	La cepa FULL-A es incapaz de regular volumen luego de un reto hipo-osmolar……..	42
Figura 4-1:	Amastigotes axénicos cultivados durante 72h…….	45
Figura 4-2:	Diámetro de amastigotes axénicos a 72h de cultivo……..	46
Figura 5-1:	Niveles de expresión de la proteína *LbClC-A y α-tubulina*……	51
Figura 5-2:	Niveles de expresión de la proteína *LbClC-A*……..	52
Figura 5-3:	Digestión productos de PCR HSP70 (1378pb) con la enzima HaeIII	54
Figura 5-4:	Amplificación del gen *LbClC-A* por *PCR*……...	55

Lista de tablas

		Pág.
Tabla 1-1:	Familia de proteínas ClC……	23

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
μg	Microgramos
λ	lamda
β-ME	β-Mercaptoetanol

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxiribonucleico
°C	Grados Celsius
CIDEIM	Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud y Centro de Referencia para la identificación de especies de *Leishmania*
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
Cl^-	Ión cloruro
ClC	Canal de Cloruro
cm^2	Centímetro cúbico
CO_2	Dióxido de carbono
cRNA	Complementary RNA (Ribonucleic cid)
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
EPT	Extracto de proteína total
EGTA	*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*
FL	Fagolisosoma
Fe	Hierro
GABA	Ácido gamma-aminobutirico
h	hora
H^+	Ión Hidrógeno
$HCO3^-$	Bicarbonato
INS	Instituto Nacional de Salud
KCl	Cloruro de Potasio

KD	*Knockdown*
HEPES	*hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*
$KHPO_4$	monohidrógenofosfato
min	minutos
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmoles
mRNA	*Messenger RNA*
Na^+	Ion sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
OMS	Organiacion Mundial de la Salud
PBS	*Phosphate buffered saline*
PFA	Paraformaldehído
PLL	*Poly-L-lisyne*
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
Sbv	Antimoniales pentavalentes
SDS-PAGE	*Dodecilsulfato sódico-Polyacrylamide gel electrophoresis*
SFB	Suero fetal Bovino
TA	Temperatura ambiente
TBS	*Tris-buffered saline*
Tris-HCl	*Tris, Hydrochloride*
VP	Vacuola parasitofora
WT	Wild type
x g	gravedades

Introducción

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades transmitidas por vectores, que afectan regiones del trópico y subtrópico a nivel mundial; abarcan un amplio espectro de presentaciones clínicas, que van desde lesiones de la piel, que pueden ser autoresueltas, o que involucran las mucosas, con secuelas deformantes, hasta llegar a comprometer vísceras, pudiendo causar la muerte si no son tratadas a tiempo [1].

Su tratamiento actual, es altamente tóxico, largo y algunas de las opciones terapéuticas son costosas y poco asequibles a todas las poblaciones afectadas [2, 3]. Esta enfermedad afecta en su mayoría a personas en estado de pobreza, desnutrición, o que están en constante exposición a focos infecciosos en el sector rural. Actualmente, hay casos de resistencia a los fármacos en uso, dado que los esquemas de tratamiento no son terminados por sus efectos secundarios y el amplio periodo de duración. Lo anterior, remarca la importancia de comprender la biología del parásito, así como los mecanismos de interacción con los diferentes ambientes a los que está sometido, para proponer nuevas opciones terapéuticas y herramientas de control [1, 4-6].

Los diferentes ambientes en los que *Leishmania* habita a lo largo de su ciclo de vida, impone adaptaciones por parte del parásito para sobrevivir. Su ciclo de vida involucra dos estadios principalmente: promastigote, una forma flagelada, en el tracto digestivo del insecto vector, y amastigote, forma intracelular, redondeada, con retracción del flagelo, sin motilidad, dentro de células monociticas de mamíferos [7, 8]. Los dos ambientes en donde habita el parásito fluctúan en pH, temperatura y osmolaridad. En la vacuola parasitófora (VP) o fago-lisosoma (FL), compartimiento dentro del macrófago con pH ácido [9-11], y lugar donde se establece y multiplica dentro del mamífero. Este pH es

óptimo para que todas las enzimas del lisosoma funcionen y cumplan su papel degradando partículas foraneas. Por otro lado, la temperatura difiere en aproximadamente 10°C entre el intestino del insecto vector y la VP, lo que ha llevado a que *Leishmania* desarrolle diferentes mecanismos especializados que le permiten lidiar con este ambiente, favoreciendo su supervivencia [11-13].

Dados los mecanismos de adaptación que ha tenido que desarrollar *Leishmania* para sobrevivir a las condiciones hostiles a las que está expuesto tanto en el flebotomíneo, como dentro del fagolisosoma del macrófago, sobresale el papel de proteínas asociadas con la regulación del pH intracelular y de volumen, promoviendo su supervivencia y favoreciendo su replicación y patogénesis.

Se han propuesto canales de cloruro en la membrana plasmática del pro-mastigote de *Leishmania* [14]; su presencia se ha asociado con la función de una H^+ATPasa encargada de generar un gradiente electroquímico, que el parásito usaría para el transporte activo secundario de nutrientes [15]. Por otro lado en el amastigote con un pH intracelular cercano a neutro [16], el gradiente favorece la entrada permanente de H^+ al parásito, lo que implica cambios en la distribución de carga, disminución de pH, alteraciones en volumen y osmolaridad, que deben ser ajustados por el parásito para garantizar su su-pervivencia. Otras células eucariota, excluyen H^+ a través de bombas y movilizan generalmente un anión a través de canales iónicos o intercambiadores para contrarrestar el efecto de carga, al tiempo que regulan pH [17], volumen y osmolaridad.

En estudios previos se ha registrado la presencia de corrientes iónicas en membranas de *Leishmania* [18] y nuestro grupo ha reportado corrientes de cloruro en ovocitos de *Xenopus* luego de inyectar ARNm del parásito [19, 20]. Las corrientes halladas muestran características compatibles con proteínas ClC [21, 22]. Alineamientos del genoma de *Leishmania* muestran cuatro genes que codificarían ClC putativos [23].

Los mecanismos asociados con la habilidad de *Leishmania* para adaptarse a éstos ambientes, en particular los transportadores de cloruro asociados, han sido el foco de estudio por parte del grupo de investigación Biofísica y Biología de Membranas. Se ha

postulado que la familia ClC sería importante para este parásito [23]. La componen los genes *LbClC-A, LbClC-B, LbClC-C y LbClC-D*, que codificarían intercambiadores anión/H+. Dos de estos ClC, LbClC-A y LbClC-B, se han asociado con regulación de volumen en *Leishmania* [24-26].

LbCLC-A sería un intercambiador NO_3^-/H^+ con una tasa de intercambio del H^+ lenta [23]. La secuencia del gen *LbCLC-A* fue subclonada en vectores de expresión para estudios electrofisiológicos de *patch clamp* y *voltage clamp*. El constructo *pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO1* + *LbCLC-A* fue transfectado en células HEK-293 cuya expresión derivó en fluorescencia membranal y perimembranal y al ser registrado por *patch clamp* en configuración de célula entera, desencadenó corrientes rectificadoras de salida de Cl^-, de poca amplitud [27]. Un comportamiento eléctrico similar atribuible a la expresión de LbCLC-A se reportó en células CHO transfectadas con *pmEGFP-1* + *LbCLC-A* [24]. De interés es que el mutante E222A transfectado también en CHO, indujo pérdida de volumen en estas células que luego de 72 horas postransfección no fueron viables [24]. García-Otálora amplió los estudios electrofisiológicos en el modelo de ovocitos *Xenopus laevis*; usando el constructo *psGEM* + *LbCLC-A* como plantilla, sintetizó cRNA de *LbCLC-A* que inyectó en éstas células. A las 48 horas postinyección registró con *voltage clamp* y detectó corrientes de entrada a concentraciones bajas de Cl^- que se hicieron rectificadoras de salida, voltaje dependientes en concentraciones altas de este ión indicando sensibilidad a las concentraciones de Cl^-, característica de los ClC. Además a pH ácido detectó una corriente de entrada de poca amplitud que atribuyó a la salida de H^+, seguida de una corriente rectificación de salida de Cl^-, sugiriendo actividad de intercambiador. De interés en este estudio fue el efecto de disminución de volumen encontrado en ovocitos inyectados con cRNA de *LbCLC-A* [26], que junto con el efecto reportado por Echeverri en células CHO [24], implican a la proteína LbCLC-A en regulación de volumen.

Para entender la función de esta proteína, el grupo hizo una primera aproximación transfectando el gen que la codifica en la cepa Δ*gef1* de levadura carente de su único CLC. El fenotipo de la cepa Δ*gef1* se caracteriza por su inhabilidad para crecer en medios de cultivo pobres en fuentes de carbono no fermentables o Fe [28]. Por tanto, este *knock out* fue transfectado con *pRS416_met25* + *LbCLC-A* y crecido en medios

donde se reemplazó la fuente de carbono (glicerol) o se disminuyó la cantidad de Fe^{3+} disponible. En los ensayos se observó que la cepa silvestre y aquellas complementadas con *gef1* lograron crecer como se esperaba, mientras que Δ*gef1* transfectada con *LbCLC-A* mostró crecimiento marginal sólo en la dilución más alta en medio con glicerol, pero no en ninguna de las otras diluciones o en ausencia de Fe, indicando incapacidad de complementar la levadura y rescatar la función de Gef-1 [29].

El trabajo realizado por Zapata Lemes, arrojó evidencias de la función de la proteína LbClC-A en el ciclo de vida del parásito, realizando un *knock down (KD)* de la proteína en cuestión. Los resultados obtenidos sugieren una función de LbClC-A en regulación del volumen que aparentemente influye en la diferenciación de promastigote a amastigote durante la infección de macrófagos de ratón de la línea celular J774.A1. Adicionalmente, se observaron alteraciones de la morfología del promastigote, su tasa de crecimiento y su regulación de volumen [25]. La proteína LbClC-A muestra localización en membrana plasmática y en compartimientos perimembranales en promastigotes y amastigotes *L. braziliensis*, al igual que en otras especies de *Leishmania* [26, 30].

Dados los antecedentes de nuestro grupo de investigación y con el fin de esclarecer y entender los mecanismos fisiológicos con los que *Leishmania* se adapta a tales condiciones, se plantea la siguiente pregunta:
¿Qué cambios morfológicos y fisiológicos podría desencadenar la sobreexpresión del intercambiador putativo LbClC-A?

Justificación

La Leishmaniosis es un problema de salud pública de las regiones tropicales y subtropicales del mundo; es endémica en las Américas, África, subcontinente indio, regiones del Mediterráneo y Suroeste Asiático. Se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad, con una prevalencia mundial de 20 millones de casos, y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5 - 2 millones de nuevos casos para leishmaniasis cutánea y 500.000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral [1, 31, 32].

La endemicidad de la leishmaniosis en Colombia, se presenta en focos naturales localizados en su mayoría en zonas rurales con ecosistemas de bosque seco y húmedo tropical (aproximadamente 94% del territorio nacional) y se estima que hay 10 millones de personas en riesgo de adquirir la enfermedad. En las últimas décadas se ha presentado un aumento en la incidencia de leishmaniasis, de acuerdo con los datos reportados al Instituto Nacional de Salud [32].

Su diseminación es atribuida a deforestación, desplazamiento forzado, ausencia de diagnóstico o diagnóstico tardío, escasas opciones de tratamiento, falla terapéutica y efectos secundarios de los medicamentos, entre otros [1]. El tratamiento de esta enfermedad está dado por medicamentos como antimoniales pentavalentes, pero no son eficaces en muchas regiones del mundo y tienen efectos secundarios severos. Su efectividad, entendida como su eficacia y tolerabilidad, varía dependiendo de la especie de *Leishmania* y de la presentación clínica. De 30 a 90% de los afectados presentan falla terapéutica a nivel mundial, en Colombia ésta llaga al 39% [33-35].

La Leishmaniosis, es considerada una de las enfermedades desatendidas, denominadas así por la OMS, dado que la mayoría de los afectados pertenecen a las poblaciones más pobres, ubicados en territorios rurales, barrios suburbanos marginales o zonas de conflicto. El entendimiento de los mecanismos de supervivencia, de interacción hospedero-macrófago, las estrategias que le permiten al parásito persistir y habitar lugares diseñados para su control, contribuiría a llenar vacíos en el conocimiento y abriría la posibilidad de postular nuevos blancos terapéuticos, que garanticen una terapia eficaz y segura, mejorando la calidad de vida de la población afectada [36, 37].

Objetivos

✓ Objetivo general

Evaluar el impacto de la expresión del vector *pSP72RaneoαGFP* + *LbClC-A,* un constructo de sobreexpresión del intercambiador putativo *LbClC-A,* en la morfología y fisiología de una cepa de *Leishmania spp*.

✓ Objetivos específicos

1. Generar una cepa *Leishmania spp.* estable que exprese el plásmido *pSP72R-αneoαGFP* + *LbClC-A.*
2. Describir las características morfológicas y de crecimiento de los parásitos transfectados con el constructo de sobreexpresión.
3. Conocer las implicaciones de la expresión de *pSP72RαneoαGFP* + *LbClC-A* en el proceso de infección en macrófagos de ratón de la línea J774.A1.

1. Capítulo 1

Leishmaniosis y la familia de canales/intercambiadores putativos ClC de *Leishmania*

La Leishmaniosis son enfermedades con diferentes presentaciones clínicas, definidas como cutánea, mucocutánea o visceral, con variantes entre ellas como la Leishmaniosis cutánea difusa. Esta enfermedad, es producida por una amplia variedad de parásitos protozoos del género *Leishmania,* que son transmitidos por las hembras de los vectores hematófagos de la subfamilia *Phlebotominae* [1, 38, 39].

1.1 Ciclo de vida de *Leishmania spp*.

El ciclo de vida del parásito involucra dos estadios principales: en el intestino del flebótomo vector, se encuentra la forma promastigote, caracterizada por ser móvil, dada la presencia de un flagelo en el extremo anterior del parásito, en donde sobresalen dos subformas: promastigotes procíclicos y la forma infectiva del parásito que recibe el nombre de promastigote metacíclico, este último con baja tasa de replicación y alta movilidad. Por otro lado, en el hospedero vertebrado, los promastigotes al interior del fagolisosoma se diferencian a amastigotes, presentando una forma de ovoide a redonda, no mótil, con el flagelo retraído (asociado con el censo de nutrientes) [8] y con una tasa de replicación alta, (ver figura 1-1) [40]. Los dos ambientes a los que está expuesto el parásito difieren en temperatura, pH, osmolaridad y nutrientes. Su supervivencia está

dada por mecanismos de morfogénesis, tolerancia a cambios de temperatura y pH, resistencia a lisis por complemento y expresión diferencial de moléculas de superficie [12, 41, 42].

La literatura soporta que los cambios extremos tanto de pH como de temperatura desencadenan expresión génica diferencial que resulta en diferenciación de una forma a la otra [12, 43]. El pH de la VP es 4,5, mientras el del mosquito es básico > 8,0 y mientras el parásito mantiene su pH cercano a neturo entre 6,8 a 7,4 [10, 44-46]. Dicho de otro modo en el intestino del vector el pH intracelular de la forma promastigote es ácido con respecto al medio en donde se encuentra, mientras en el VP el pH intracelular del parásito es más alto que el del VP. En cuanto a temperatura, en el vector es de 25 a 28 °C, en la piel del hospedero entre 31 y 35 °C y en vísceras de 37 °C. Aprovechando estas diferencias se pueden generar en el laboratorio formas promastigote y amastigote axénicas [12, 41, 43, 47, 48].

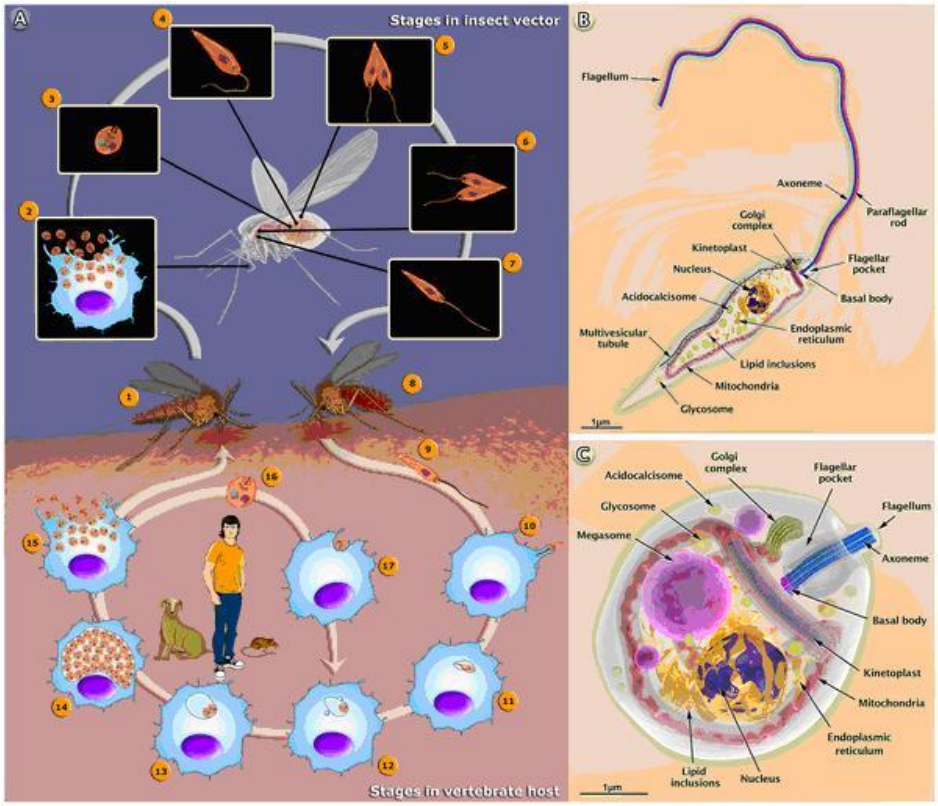


Figura 1-1: Clico de vida de Leishmania (A). Organización estructural de la forma promastigote (B) y amastigote (C). *Tomado de The cell biology of Leishmania: how to teach using animations [49].*

1.2 Respuesta de *Leishmania* a cambios de pH extracelular

Varios trabajos han evidenciado que *Leishmania* tiene una alta capacidad de adaptación a diferentes valores de pH del medio. Con ensayos enzimáticos se ha visto que la metaloproteinasa de superficie gp63 en promastigotes *Leishmania mexicana*, tiene actividad óptima a pH alrededor de 7,0, mientras la expresada por amastigotes se alcanza entre 4,5 y 5,0 de pH [50]. Por otro lado promastigotes *Leishmania donovani* metabolizan más rápidamente glucosa, prolina y nucleósidos a pH entre 7,0 y 7,5, mientras los amastigotes de la misma especie catabolizan estos sustratos a pH entre 4,5 y 5,0 [51].

Aunque el pH del medio extracelular e intracelular de *Leishmania* difiere en más de dos unidades, el pH intracelular del parásito fluctúa poco a lo largo de su ciclo de vida [52]. El mecanismo responsable de este grado de adaptación es poco conocido. Probablemente *Leishmania*, al igual que otros eucariotas ajuste pH a través de más de un mecanismo. En varios microorganismos bombas de protones están involucradas con el mantenimiento del pH, controlando la concentración intracelular de protones [53, 54]. En la membrana plasmática y la bolsa flagelar de promastigotes *L. donovani* ha sido identificada una bomba H^+ATPasa, responsable de la creación de un gradiente electroquímico de protones en la membrana del parásito. Ésta es una enzima dependiente de Mg^{2+} con actividad óptima a pH 6,5 [55-57]. Sumado a esto, algunos estudios han señalado que la habilidad de promastigotes *L. donovani* para regular su pH intracelular depende de la presencia de iones cloruro en su citoplasma. En promastigotes *Leishmania major* una bomba de protones y un canal de cloruro contribuyen con mantenimiento de pH y potencial de membrana hiperpolarizado [14, 58].

Sin embargo, para estos parásitos el conocimiento es poco acerca de los transportadores y la naturaleza de los canales iónicos que regulan estos mecanismos. En promastigotes de *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* nuestro grupo

ha mostrado la presencia de corrientes de cloruro voltaje dependientes [19, 20] sugiriendo la presencia de canales/transportadores para este ión.

1.3 Canales iónicos

Son proteínas integrales de membrana, que permiten el paso de iones a favor de su gradiente electroquímico. Forman un poro acuoso que permite el paso de iones de un lado al otro de la membrana y presentan alta selectividad iónica y varios mecanismos de apertura [59, 60].

1.3.1 Canales aniónicos

Se asume que permiten la difusión pasiva de aniones a favor de su gradiente electroquímico. Son frecuentemente llamados canales de cloruro (Cl^-), dado que este ión es el anión más abundante en los organismos [59, 60].

1.3.1.1 Canales de cloruro

Los canales de cloruro ubicados en la membrana plasmática tienen como función regular volumen, mantener homeostasis iónica, participar en el transporte trans-epitelial y regular excitabilidad eléctrica [61]. Para mantener la composición iónica en citoplasma y el volumen celular los canales de Cl^- funcionan en paralelo con varios transportadores iónicos, incluyendo bombas, co-transportadores y otros canales iónicos. Para la regulación de pH existen intercambiadores Na^+/H^+ e intercambiadores $Na^+HCO_3^-/H^+Cl^-$ que requieren de un *shunt* eléctrico en paralelo para hacer reciclaje del ión Cl^- [61].

Se han descrito tres familias de canales de cloruro: ClC, CFTR *(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)* y receptores activados por GABA y glicina [61].

1.4. Familia de ClC

Esta familia está compuesta por canales Cl^- voltaje dependientes e intercambiadores H^+/anión; están presentes tanto en células procariota como eucariota [62]. Los ClC son dímeros, donde cada monómero tiene una zona por la que permea el anión [63]. Desde el punto de vista biofísico se cree que una misma estructura explica transporte por electrodifusión en el caso de los canales o transporte acoplando la energía del gradiente de un ión para concentrar el otro ión en el caso de los intercambiadores [22].

El primero de esta familia descrito fue ClC-0 de *Torpedo marmorata* [64]. En mamíferos se han descrito 9 ClC basándose en la homología de las secuencias. Pueden ser encontrados en membrana plasmática, o en membranas intracelulares del Aparato de Golgi o sistema endolisosomal [65-67]. Los ClC de mamífero están implicados en diferentes patológicas hereditarias, causadas por mutaciones en sus genes [66, 68].

Los ClC de mamífero están nombrados del 1 al 7 y ClC-Ka y ClC-Kb. El canal de cloruro ClC-1 da la mayor parte de conductancia del músculo esquelético y su mutación lleva a miotonía en ratones y humanos [68, 69]. La función de ClC-2 aún no es clara, pero en general es un canal de cloruro que puede ser activado por hiperpolarización [70], hipotonicidad y acidificación extracelular [71, 72]. Su alteración conlleva a degeneración testicular y retinal [73].

En riñón y oído interno se expresan los ClC denominados ClC-Ka y ClC-Kb, que adquirieron estos nombres porque el alto grado de identidad de sus secuencias dentro de las isoformas ClC-K dentro de una única especie, hace imposible identificar especies ortólogas por comparación de secuencias [74]. La expresión de ClC-K es influenciada por cambios de volumen de agua y concentración de sales [75].

ClC-3 es predominantemente expresado en cerebro y es intracelular, pero también se expresa en riñón, hígado, músculo esquelético, corazón, glándulas adrenales y páncreas [76]. Varios estudios han sido incapaces de obtener corrientes asociadas

a esta proteína en sistemas heteorólogos [77-79], pero Wasaki y colaboradores encontraron corrientes rectificadoras de salida de amplitud intermedia en ovocitos de *Xenopus* [80].

ClC-4 se expresa predominantemente en cerebro y músculo esquelético, aunque también se le ha encontrado en corazón, hígado y riñón. ClC-4 al igual que ClC-3 y ClC-5, se ubica en membranas intracelulares [65, 78]. Mutaciones de la proteína ClC-5 explican la enfermedad de Dent. Este ClC se expresa predominantemente en riñón, pero también está presente en hígado, cerebro, testículo e intestino. Genera corrientes rectificadoras aniónicas en ovocitos de *Xenopus* y en células mamíferas, que son medibles sólo a voltajes superiores de +20 mV [81-83]. ClC-5 se ubica en endosomas de reciclaje [84], donde su función sería la de intercambiador usando el grandiente de H^+ para concentrar Cl^- en este compartimiento y regular indirectamente la expresión de transportadores de membrana [85].

A la fecha está documentado que ClC-6 y 7 son intercambiadores $2Cl^-/H^+$, implicados en procesos de acidificación en el tránsito endosoma-lisosoma [86-88]. En cuanto al ClC-7, la disrupción de este gen en ratones lleva a osteopetrosis y degeneración de la retina. La tabla 1, resume las características más relevantes para cada ClC.

Tabla 1: Familia de proteínas ClC

ClC	Organismo	Tipo	Ubicación	Referencia
ClC-0	*Torpedo marmorata*	Canal de Cloruro voltaje dependiente	Membrana plasmática	[22, 61, 89]
ClC-1	*Mamíferos*	Canal de Cloruro voltaje dependiente	Membrana plasmática	[61, 89]
ClC-2		Canal de Cloruro voltaje dependiente	Membrana plasmática	[61, 89]
ClC-K (a y b)		Canal de Cloruro voltaje dependiente	Membrana plasmática	[61, 89]
ClC-3		Intercambiador Cl^-/H^+	Compartimientos del sistema endosomico-lisosomal	[61, 77, 89]
ClC-4		Intercambiador Cl^-/H^+	Endososmas	[61, 89, 90]

Continuación Tabla 1-1: Familia de proteínas ClC

ClC-5		Intercambiador Cl^-/H^+	Endosomas	[61, 89, 91]
ClC-6		Canal de Cl^- o intercambiador Cl^-/H^+ ?	Endosomas	[61, 87, 89, 92]
ClC-7		Intercambiador Cl^-/H^+	Compartimientos del sistema endosomico-lisosomal	[61, 89, 92, 93]
AtClCa	*Arabidopsis thaliana*	Intercambiador $2NO_3^-/H^+$	Vacuola	[94]
EcClC-1	*E. coli*	Intercambiador $2Cl^-/H^+$		[95]
OmClC-3	*Oreochromis mossambicus*	?	?	[96]
OmClC-5		?	?	[96]
GEF-1	*S. cerevisiae*	Intercambiador Cl^-/H^+	Aparato de Golgi y sistema endosomal	[61, 97]

1.4.1 Familia ClC de *Leishmania* spp.

Los mecanismos de supervivencia desarrollados por *Leishmania* para sobrepasar los diferentes ambientes a los que está expuesto requieren la expresión de proteínas especializadas en transporte de protones que aseguren su supervivencia en condiciones distintas de pH y osmolaridad; como ya se ha mencionado las proteínas ClC se encuentran en una gran variedad de organismos y han sido asociadas con funciones similares [61].

El grupo Biofísica y biología de membranas, ha considerado que el estudio de las proteínas de *Leishmania* involucradas en transporte de iones, es relevante para el entendimiento de los mecanismos que regulan la homeostasis del parásito. Es así, como teniendo en cuenta el postulado de un canal de cloruro acoplado con una H^+ATPasa en la membrana del parásito [14, 58] y la presencia de corrientes de cloruro en la membrana del mismo [18], que nuestro grupo realiza un primer acercamiento para la caracterización de corrientes de cloruro del parásito en ovocitos de *Xenopus laevis* [19, 20], para lo que se inyectó ARN poliadenilado de promastigotes *L. amazonensis,* detectándo tres tipos de corrientes de cloruro, una de las cuales se atribuyó al ARNm inyectado. Se determinó el orden de selectividad para la corriente registrada remplazando cloruro con otros iones, y se encontró que era $I^- > Br^- > Cl^-$. Esta selectividad aniónica se corroboró por medio de experimentos con DIDs y ácido niflúmico, dos bloqueadores de transportadores aniónicos [19]. El

hallazgo de corrientes de cloruro voltaje dependientes, sugiere la expresión de ClCs en estos parásitos [23].

Mediante búsqueda bioinformática del genoma de *L. braziliensis* se detectaron cuatro secuencias de canales de cloruro putativos*: Lb01.0210* (GI: 389600016), *Lb04.1010* (GI: 389600188), *Lb32.3670* (GI: 389602765) y *Lb33.1260* (GI: 389602969). Las proteínas putativas fueron denominadas por el grupo como *LbCLC-A* (0210; 768 aa), *LbCLC-B* (3670; 884 aa), *LbCLC-C* (1260; 911 aa) y *LbCLC-D* (1010; 1185 aa), conforme con la nomenclatura y el alineamiento con la proteína *EhCLC-A* [23], único CLC de protozorios caracterizado hasta el momento [98].

2. Capítulo 2

Generación de una cepa estable expresando el vector *pSP72RαNEOαGFP* + *LbClC-A*

Leishmania es susceptible de transfección estable luego de la inserción de plásmidos [99-102]. Para la generación de una cepa estable se decidió usar el vector de expresión modificado para *L. braziliensis pSP72RαNeoαGFP* [102], amablemente donado por la Dr. Elisabetta Ullu (Yale School of Public Health, Yale University, Estados Unidos).

Este plásmido fue generado a partir del vector comercial *pSP72* (Promega), el cual presenta el promotor T7, seguido del promotor ribosomal de *L. braziliensis*, parte del *multicloning site* original, seguido por un casete conformado por el gen de neomicina fosfotransferasa flanqueado por regiones intergénicas del gen α-tubulina de *Leishmania enrietti* [99] entre los sitios BamHI–SmaI [100]. Posteriormente a este constructo le fue insertado el gen de la variante de proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* - GFP-S65T) [101], para terminar con el gen que confiere resistencia a ampicilina, seguido de S6 y componentes del vector original, para finalmente tener el vector de expresión utilizado por el grupo de la Profesora Ullu al cual insertaron el promotor ribosomal [102]. Este vector posee el sitio de restricción Xba I, zona en las que se insertó el gen *LbCLC-A*, luego de la segunda zona intergénica de α-tubulina y precediendo al gen de la proteína reportera GFP-S65T [101] (Figura 2-1).

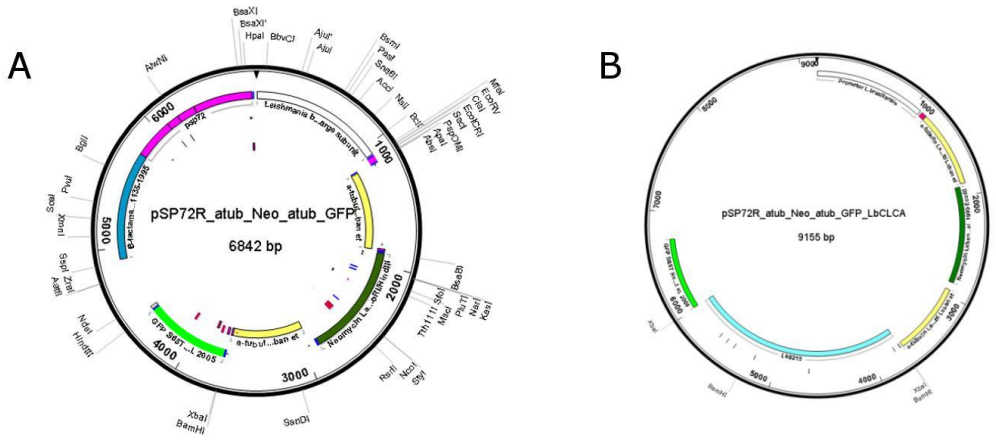


Figura 2-1: Esquema plásmido pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A. (A) *Mapa de restricción del plásmido pSP72RαtubNeoαtubGFP secuenciado en el grupo.* ***(B)*** *Mapa de pSP72RαtubNEOαtubGFP + LbClC-A mostrando sitios de restricción usados para verificación.*

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Construcción del plásmido *pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A*

Para este estudio se recibió el útil génico *psp72RαNEOαGFP* + LbCLC-A generado previamente en el grupo (Zapata y Camacho). Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la secuencia del gen de 2307 pb que codifica la proteína de interés incluyendo el sitio de restricción XbaI (TCTAGA). El producto de PCR fue cortado, purificado y ligago al vector de clonación *pGEM-T-Easy* el cuál fue amplificado en *Escherichia coli* cepa DH5α, seleccionadas con ampicilina y el ADN plasmídico purificado. Posteriormente el gen de interés fue liberado por digestión con XbaI e insertado dentro del plásmido de expresión *psp72RαNEOαGFP*, que fue amplificado en *E. coli* cepa DH5α. El ADN plasmídico se obtuvo por lisis alcalina [103], utilizando *Midiprep Nucleospin® Plasmid ADN Purification Kit* (Macherey-Nagel).

2.1.2. Verificación del constructo

La verificación del constructo se realizó por digestión con endonucleasas y secuenciación. El *poli-linker* del plásmido contaba con dos sitios de corte para enzimas de

restricción, XbaI, que fue utilizada para flanquear la secuencia de la proteína de interés (*LbClC-A*) y BamHI. XbaI, digiere el plásmido en dos secciones: el vector, que es de ~ 6842 pb y la secuencia de *LbClC-A*, de ~2307 pb, mostrando así la inserción de la secuencia de interés. BamHI, tiene un punto de corte dentro de la secuencia del gen de interés lo que resulta en dos fragmentos de pesos diferentes a los inducidos por XbaI. En el ANEXO A, se pueden visualizar los resultados *in silico* de estas digestiones.

El ADN plasmídico fue cuantificado por espectrofotometría (BioSpec-mini, Mason Technology) a 260 nm. Un µg del plásmido vacío, *psp72RaneoαGFP*, en adelante pSP, o del constructo *psp72RaneoαGFP + LbCLC-A, en adelante* FULL-A, fueron digeridos con las enzima XbaI (Promega), o BamHI-HF (NEB). Las condiciones de digestión para cada enzima se muestran a continuación. Las reacciones fueron incubadas durante 1 h a 37 °C y posteriormente inactivadas durante 20 min a 56 °C.

Digestión enzima XbaI

Reactivo	[ ] Stock	[ ] Rxn
Agua ultrapura	N/A	N/A
Buffer D	10X	1X
BSA	10µg/µL	0,1 µg/µL
Enzima	10U/µL	5U/µL
[ ] plásmido	N/A	1ug

Digestión enzima BamHI-HF

Reactivo	[ ] Stock	[ ] Rxn
Agua ultrapura	N/A	N/A
Buffer CurtSmart	10X	1X
Enzima	10U/mL	5U/uL
[ ] plásmido	N/A	1ug

De cada digestión se sirvieron 10 µL que fueron separados por electroforesis a 80 V durante 70 min en un gel de agarosa 1%, y los productos visualizados por tición con *Gel Stain* 1X (LONZA).

Para verificar la orientación correcta del gen insertado y la construcción adecuada del plásmido FULL-A, este fue enviado a secuenciar (Macrogen y Max Planck Institut für Experimentelle Medizin) corroborando la construcción correcta del plásmido.

2.1.3. Condiciones de cultivo de *Leishmania.*

Promastigotes de *Leishmania* del cepario del Laboratorio de Biofísica y biología de membranas, adquiridos del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM: Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud y Centro de Referencia para la identificación de especies de *Leishmania*), codificados como *L. (Viannia) braziliensis*, cepa (HOM/BR/75/M2903) y tipificados por anticuerpos monoclonales, se cultivaron a 26 ± 1 °C en medio RPMI-1640 (Life technologies™) suplementado con 5 - 10% de suero fetal bovino (SFB, Ref: *S1810*, BIOWEST, Kansas City, MO) inactivado con calor (56 °C). Se realizaron pases una vez alcanzado crecimiento estacionario. Los parásitos de la cepas silvestre (WT), pSP [25], FULL-A (cepa con el constructo de sobreexpresión) o E1 (cepa *knock down* de LbClC-A) [25] hasta obtener promastigotes estacionarios para los ensayos de infección, retos osmóticos y diferenciación a amastigotes axénicos. Las cepas transfectadas se cultivaron en presencia de G418 a 60 µg/mL.

2.1.4. Transfección con el plásmido *pSP72RαNEOαGFP+LbClC-A.*

Promastigotes WT a una densidad de 1 x 10^7 parásitos, se electroporaron con el constructo *pSP72RαNEOαGF_LbClC-A*. Para esto los parásitos fueron centrifugados a 1200 *g* durante 10 min, lavados dos veces con PBS 1X y posteriormente resuspendidos en Citomix (en mM 120 KCl, 0,15 $CaCl_2$, 10 KH_2PO_4, 25 HEPES, 2 EGTA y 5 $MgCl_2$, pH 7,6). Para realizar la transfección, se mezclaron 400 µL de esta suspensión de parásitos con ~ 20 ng/µL del plásmido FULL-A, se depositaron en celdas para electroporación de 4 mm (Gene Pulser Xcell™ Electroporation System, Bio Rad), y se expusieron a un pulso de 1600 V, 25 µF y resistencia infinita. Posteriormente las celdas se depositaron en hielo por 1 min y los parásitos se sembraron en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB en cajas de cultivo de 25 cm^2 (TPP), a 26 ± 1 °C durante 24 h. Pasadas 24 h se adicionaron 60 µg/mL de geniticina (G418 Solution, PAA Laboratories GmbH, Australia) a los parásitos transfectados con el constructo FULL-A. Las cajas de cultivo fueron supervisados todos los días por microscopía de luz y de epifluorescencia en un microscopio invertido Zeiss Axio observer A.1®, para verificar el crecimiento de los parásitos. Las cepas pSP y E1 que se usaron como controles [25].

2.2. Resultados

2.2.1. Verificación del constructo FULL-A

En la figura 2-3, se observa el gel de agarosa luego de separación por electroforesis de los productos sin digerir o digeridos de los constructos pSP y FULL-A. En la digestión de pSP con XbaI y BamHI se observa una sola banda del peso esperado, que corresponde al plásmido linearizado. En el carril correspondiente a FULL-A digerido con XbaI, se observan bandas de los tamaños esperados (~ 6800 pb y 2300 pb) sugestivas de liberación de la secuencia de interés desde el plásmido. En cuanto a la digestión de FULL-A con BamHI, como existe un sitio de restricción para esta enzima en la secuencia del gen LbCLC-A, su digestión resultaría en dos fragmentos uno de 1589 pb y otro de 718 pb, y al cortarlo desde el plásmido daría un fragmento de más de 7000 pb (pSP + fragmento de *LbCLC-A*) y otro de casi 1600 pb (fragmento de *LbCLC-A*), lo que corresponde con los resultados obtenidos.

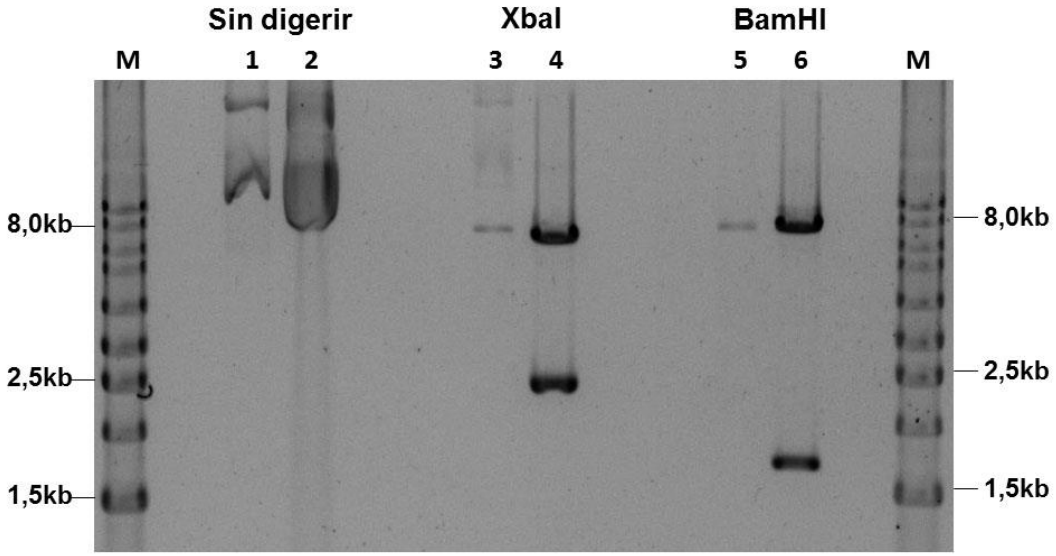


Figura 2-2**: **Digestión del plásmido pSP72RαNEOαGFP_LbClC-A.
***M**, marcador de peso molecular de 1Kb (1Kb Ladder DNA Maker, Axygen); **1, 3 y 5**, corresponde al vector sin el constructo de sobreexpresión (vector vacío, pSP); **2, 4 y 6**, corresponden al plásmido con el constructo de sobreexpresión (FULL-A).*

2.2.2. Evaluación de la expresión del plásmido FULL-A.

Se realizaron ensayos de PCR para confirmar la presencia tanto del plásmido como de los genes que codifican para la proteína GFP y la enzima neomicina fosfotransferasa en cada cepa. Las PCRs se realizaron a partir de ADN genómico (Purelink Viral RNA/DNA Kit, INVITROGEN). Productos de los pesos esperados evidencian la presencia tanto del plásmido, como de los otros componentes en cada una de las cepas transfectadas (Figura 2-3).

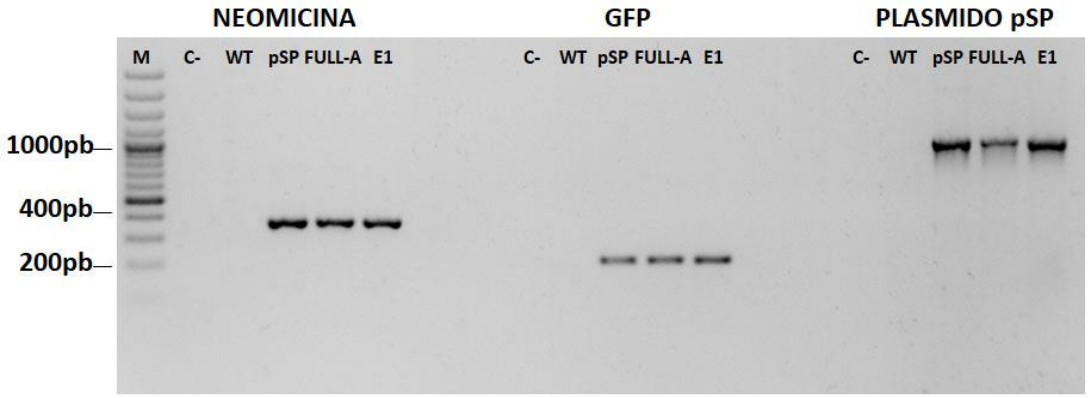


***Figura 2-3**: **Detección de genes asociados al plásmido pSP72RαNEOαGFP** Separación de productos de PCR por electroforesis en de gel 1% agarosa, a 70V durante 70 min. M: Marcador de peso molecular 100pb (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific), **C-:** control negativo; **WT**: cepa silvestre; **pSP:** control vacío; **FULL-A:** cepa expresando el constructo de sobreexpresión y **E1:** cepa transfectada con el constructo de interferencia para LbClC-A.*

La cepa tranfectada FULL-A es resistente al antibiótico de selección geneticina, y ésta se conserva a través de los pases, sugiriendo expresión de neomicina fosfotransfersa, a diferencia de la cepa WT que muere al ser expuesta a la misma concentración de antibiótico. Las cepas pSP y E1 también son resistentes a G418 [25]. Más aún FULL-A es fluorescente aunque, ésta es de menor intensidad comparada con pSP y E1, indicando expresión de la proteína reportera GFP. Estas dos características sugieren transfección exitosa.

3. Capítulo 3

Características morfométricas, de crecimiento y respuesta ante retos osmóticos, de promastigotes de la cepa FULL-A

Usando un sistema de desarrollo del parásito *in vitro* adaptado a nuestro laboratorio, que incluye amastigotes axénicos y amastigotes *in situ*, y que comprende desde la entrada del promastigote al macrófago sin cambios morfológicos (Fase 1; 0 - 5h), detención del movimiento y agregación (Fase 2; 5 -10h), diferenciación morfológica a amastigote (Fase 3; 10 – 25h) y finalmente maduración del amastigote y replicación (Fase 4; 25-120h) [104], se estudió el fenotipo en cultivo *in vitro* de la cepa transfectada estable, FULL-A. En este capítulo se reportan los datos para promastigotes a partir de curvas de crecimiento en el tiempo por impedanciometría con un *Coulter* y medición de largo y ancho del cuerpo del parásito y longitud del flagelo por microscopía de luz. Se compararon estos parámetros con aquellos medidos para las cepas WT, pSP y E1.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Curvas de crecimiento

Promastigotes de cada cepa en estudio fueron cultivados a 26 ± 1 °C en RPMI-1640 (Life technologies™) suplementado con 5% de SFB inactivado, sin antibiótico, partiendo de una densidad celular de ~1 X 10^6. Diariamente se tomaron muestras

de cada cultivo para evaluar el crecimiento a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96 y 144 h).

Los conteos se hicieron por impedanciometría en un contador de partículas Z2 *Coulter Counter* (Beckman). Para la medición, las muestras fueron diluídas 1/10 en PBS 1X estéril. Los resultados fueron graficados como promedios del número de parásitos ± error estándar generados para cada tiempo y cada cepa, usando el programa Origin Pro 8.0. Los datos representan tres replicas técnicas de dos ensayos realizados en momentos diferentes.

3.1.2. Medidas morfométricas

Para estas medidas se partió de una concentración de promastigotes de 1,5 x 10^6 células/mL. Cada 24 h se observaron por microscopía de luz y se adquirieron imágenes a diferentes magnificaciones 100 X, 400 X y 1000 X. Promastigotes de las cepas WT, pSP, FULL-A y E1 de 48 y 144 h de crecimiento fueron lavados dos veces con PBS 1X y fijados con paraformaldehído 2% durante 10 min. Posteriormente se realizaron montajes en fresco entre lámina y laminilla selladas con esmalte y visualizaron por microscopía de luz en un microscopio invertido (Axio Vert.A1, ZEISS). Se adquirieron imágenes por microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y luego se realizaron mediciones de las dimensiones del cuerpo del parásito y longitud del flagelo con el software AxioVision Rel. 4.8.

3.1.3. Retos hipo-osmóticos

4000 promastigotes/mL con 5 días de cultivo fueron centrifugados a 1200 *gx* por 10 min para retirar el medio de cultivo. Posteriormente se resuspendieron en la solución de interés (296 mOSm, 146 mOsm o 76 mOsm). Se realizaron mediciones en el contador de partículas Z2 *Coulter Counter* (Beckman) determinando el número y el volumen celular por impedanciometria, en los tiempos 0, 3, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos, con límites entre 3 y 8 µm. La ganancia y ruido de fondo fueron determinados antes de las mediciones. Después de finalizado cada registro se realizó lavado de la apertura (50 µm) durante 5 min con PBS 1X estéril, antes de realizar la siguiente medición. Para la preparación de las soluciones empleadas en los retos osmóticos, inicialmente se preparó la solución a 330 mOsm/L (en mM: 137

NaCl; 4 KCl; 1,5 KH_2PO_4; 8,5 NaH_2PO_4; 20 Hepes; 11 glucosa; 1 $CaCl_2$; 0,8 $MgSO_4$, pH 7,4). A partir de esta solución se realizaron diluciones con agua desionizada para obtener osmolaridades finales de 300 mOsm, 150 mOsm y 70 mOsm que fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. La osmolaridad fue determinada utilizando el osmómetro de presión de vapor Vapro5600® (Wescor®), tolerándose un margen de error de ± 6 mOsm/L por solución. Cada experimento se realizó por triplicado y se ajustaron los datos para que representaran el valor numérico acumulado del volumen vs el número de partículas. Se realizó ANOVA de una vía entre los grupos empleando el Software SigmaStat 3.1 y se consideró significancia estadística de $p < 0,01$.

3.2. Resultados

3.2.1. FULL-A presenta una menor tasa de crecimiento

El crecimiento de promastigotes de *Leishmania in vitro* sigue un curso temporal de replicación celular cuando se inicia el cultivo con inóculo bajo similar a otras células en cultivo [105, 106]. En las primeras 24 h hay división lenta o fase de latencia, cuya pendiente aumenta a las 48 h y se mantiene por 72 - 96 h, fase logarítmica, hasta alcanzar un *plateau* que resultaría de crecimiento estacionario, en donde el parásito no se replica o el balance neto entre replicación y muerte se estabiliza, fase estacionaria y finalmente deterioro del cultivo por muerte del parásito debido a escasez de nutrientes [106]. El crecimiento de FULL-A se comparó con el de las cepas WT, pSP y E1 que previamente habían mostrado tasas de replicación diferentes [25].

En WT se observa el comportamiento típico esperado (figura 3-1 A). Para pSP, el cultivo no alcanza la fase de muerte, mientras que para E1 el cultivo llega a fase logarítmica (figura 3-1 B) en la ventana de tiempo estudiada. El crecimiento de FULL-A tiene la secuencia esperada de fase de latencia, logarímica y estacionaria en las 144 h analizadas pero claramente su crecimiento es más bajo que las otras cepas, reflejando una tasa replicativa menor (figura 3-1 B, círculos negros).

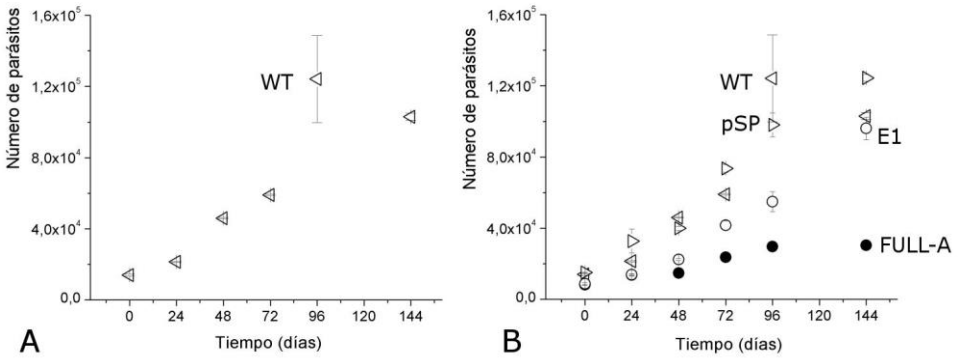


Figura 3-1: Curva de crecimiento de promastigotes*. Densidad celular tomada a las 24, 48, 72, 96 y 144h de las cepas **WT** (silvestre), **pSP** (control vacio), **FULL-A** (cepa con el constructo de sobre-expresion) y **E1** (cepa Knock down de LbClC-A). **(A)** Datos de WT. **(B)** Datos de todas las cepas*

3.2.2. Diferencias morfológicas de FULL-A

Para determinar si existían diferencias en la morfología de la cepa FULL-A con respecto a los controles se hicieron cultivos y seguimiento durante 7 días. Con el fin de establecer diferencias entre las diferentes cepas, se compararon las medidas obtenidas para mínimo 100 promastigotes de cada cepa, a 48 h, donde se esperan encontrar promastigotes en fase logarítmica de crecimiento y podrían corresponder a procíclicos y a 144 h, tiempo en el cual la población es predominantemente de promastigotes en fase estacionaria que se presumen promastigotes metacíclicos, donde hay formación de un número importante de rosetas.

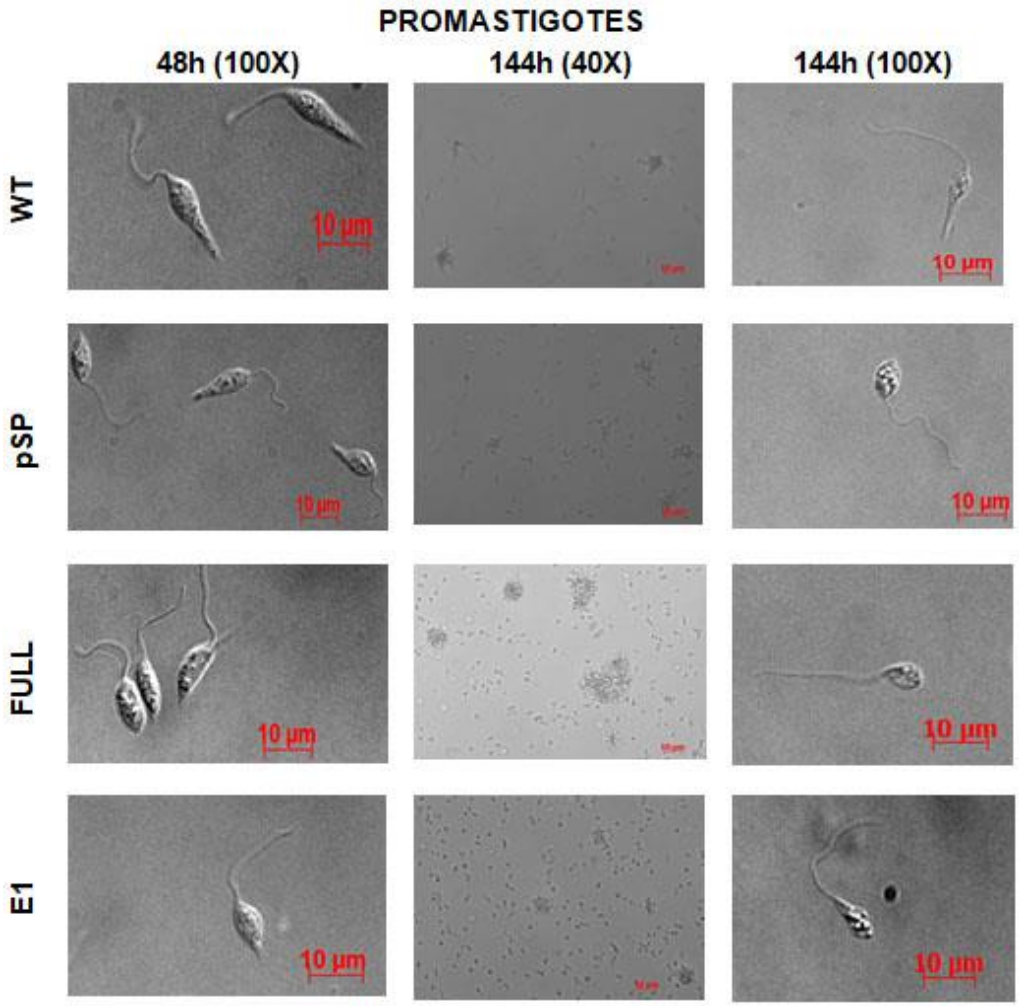
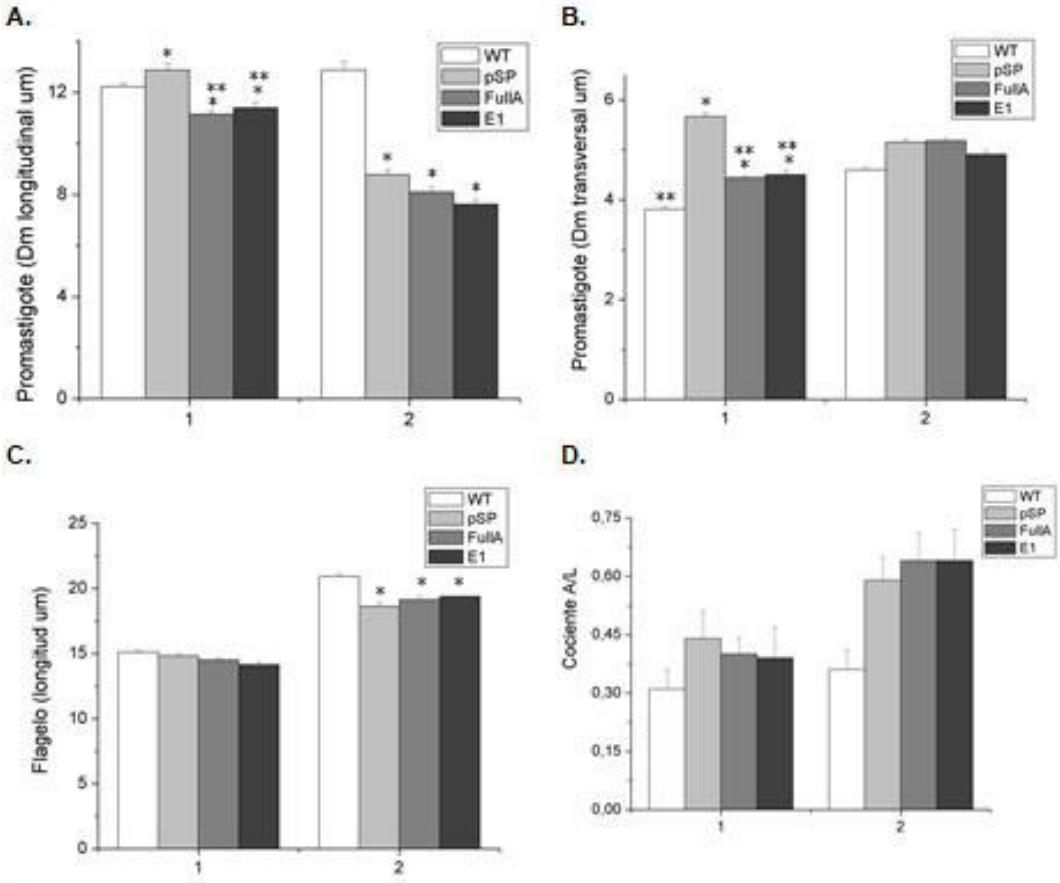


Figura 3-2: Morfología de promastigotes. *Cepas* ***WT*** *(silvestre),* ***pSP*** *(control vacío),* ***FULL-A*** *(cepa con el constructo pSP72RαneoαGF_LbClC-A) y* ***E1*** *(cepa que se presume Knock down de LbClC-A). La barra representa 10µm.* (40X y 100X, objetivo con el que fue adquirida la imagen, se debe multiplicar por 10 para obtener magnificación final).

A las 48 h de cultivo, la morfología de los promastigotes es similar entre las diferentes cepas, al igual que la longitud del flagelo que es del mismo largo del cuerpo del parásito sugestivo de formas procíclicas. En contraste a las 144 h, promastigotes de las cepas pSP, FULL-A y E1 tienen un cuerpo más pequeño (8,78 µm ± 0,19; 8,10 µm ± 0,18 y 7,62 µm ± 0,18, respectivamente). La tasa de la longitud de sus flagelos con respecto a la del cuerpo celular es 62% en pSP, 76%

en FULL-A y 91% en E1 ≥ dos veces el largo del cuerpo celular y compatible con formas metacíclicas en *Leishmania*, [107, 108].



E

parámetro	Promastigotes							
	WT		pSP		FULL		E1	
	48h	144h	48h	144h	48h	144h	48h	144h
Largo (µm ± ES)	12,22 ± 0,13	12,67 ± 0,34	12,87 ± 0,27	8,78 ± 0,19	11,41 ± 0,13	8,10 ± 0,18	11,40 ± 0,21	7,62 ± 0,18
Ancho (µm ± ES)	3,81 ± 0,05	4,60 ± 0,05	5,67 ± 0,07	5,15± 0,06	4,44 ± 0,04	5,18± 0,07	4,50 ± 0,08	4,91 ± 0,08
Longitud del flagelo (µm ± ES)	15,09 ± 0,14	20,93 ± 0,19	14,81 ± 0,22	18,62 ± 0,33	14,51 ± 0,17	19,12 ± 0,31	14,14± 0,24	19,40 ± 0,31
Flagelo/cuerpo ≥ 2 (% de parásitos)	N/A	30%	N/A	62%	N/A	76%	N/A	91%

Figura 3-3: Morfometría de promastigotes en fase de crecimiento logarítmica (1: 48 h) o estacionaria (2: 144h). *Las gráficas representan el promedio ± ES de* ***(A)*** *Largo del cuerpo del parasito,* ***(B)*** *Ancho del cuerpo del parasito,* ***(C)*** *Longitud del flagelo,* ***(D)*** *Cociente del ancho/largo del cuerpo del parasito. (****E****) Tabla con los datos representados en las gráficas y adicionalmente se muestra los porcentajes de promastigotes en los que la longitud del flagelo es ≥ a dos veces el lago del cuerpo celular. Cepas* ***WT*** *(silvestre),* ***pSP*** *(control vacío),* ***FULL-A*** *(cepa con el constructo pSP72RαneoαGF_LbClC-A) y* ***E1*** *(cepa que se presume Knock down de LbClC-A).* (*, p=<0,001, con respecto a WT), (**, p= <0,001, con respecto a pSP).

Por otro lado, en WT el cuerpo celular mantiene una talla similar (12,22 µm ± 0,13 a 48 h y 12,87 µm ± 0,34 a 144 h), el flagelo es más largo (20,93 µm ± 0,19), pero sólo 30% de los parásitos poseen un flagelo con longitud dos veces el cuerpo celular (Figura 3-2 y 3-3). Las promastigotes metacíclicos se caracterizan por tener tasas de replicación baja y alta infectividad. No obstante, los cambios morfológicos no son criterio suficiente para afirmar que estén en ese estado o que sean infectivos. Para establecer el estadio deben usarse pruebas más específicas, como resistencia a lisis por complemento, selección negativa con lectinas o marcación con anticuerpos específicos contra lipofosfoglicano (LPG) y evidencia de sobre-expresión de genes como *META1, SHERP y HASP* [37, 108-110].

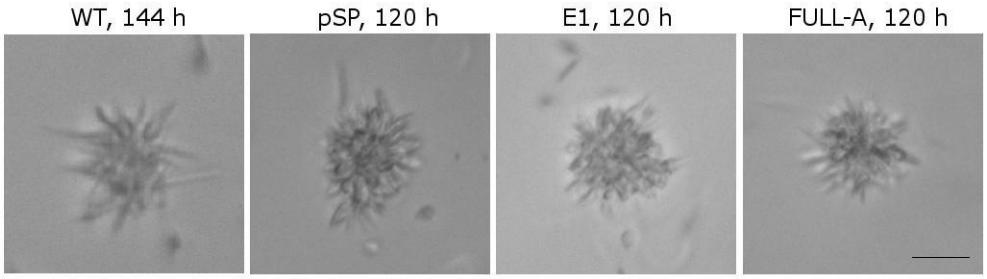
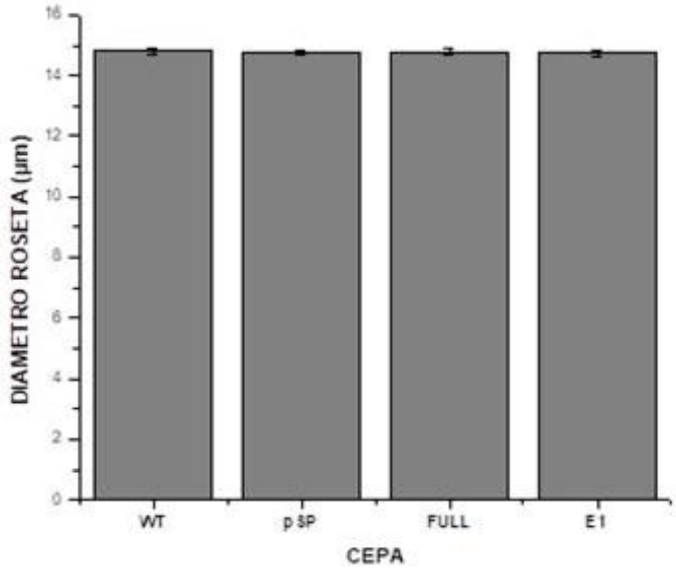


Figura 3-4: Rosetas. *Imágenes de microscopía DIC adquiridas a 144 h para WT o 120 h de cultivo para pSP, FULL-A.* ***WT*** *(silvestre),* ***pSP*** *(control vacío),* ***FULL-A*** *(cepa con el constructo pSP72RαneoαGF_LbClC-A) y* ***E1*** *(cepa que se presume Knock down de LbClC-A). Magnificación 400 X. La barra representa 10µm.*

En nuestras condiciones de cultivo observamos que a medida que el tiempo progresa los parásitos se agregan formando rosetas. Aspectos morfológicos de éstas fueron también valorados. Su diámetro y forma fueron similares para todas las cepas estudiadas (Figura 3-4 y 3-5), no presentan diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el tiempo a partir del cual comienzan a formarse y acumularse varía. Para FULL-A y E1, su aparición es más temprana y se observan desde 96 h de cultivo (datos no mostrados). A 120 h se registran una cantidad significativa de rosetas en pSP, FULL-A y E1 (Figura 3-4), por esta razón este tiempo fue escogido para hacer comparaciones, ya que a 144 h, para estas cepas las rosetas comienzan a agregarse y esto no permite la valoración del diámetro de las mismas.

No obstante, a este tiempo la proporción de rosetas es baja en WT, pero aumentan a 144 h.

A.



B.

parámetro	ROSETAS			
	WT	pSP	FULL	E1
DIAMETRO (µm ± ES)	14,81 ± 0,09	14,75 ± 0,09	14,76 ± 0,09	14,74 ± 0,08

Figura 3-5: Diámetro de rosetas. A. *Gráfica de barras del diámetro de las rosetas.* ***B.*** *promedio ± ES de las medidas para minimo100 rosetas por cepa.* ***WT*** *(silvestre),* ***pSP*** *(control vacío),* ***FULL-A*** *(cepa con el constructo pSP72RαneoαGF_LbClC-A) y* ***E1*** *(cepa que se presume Knock down de LbClC-A).*

Los datos encontrados para promastigotes indican que siguen un curso de diferenciación *in vitro* que incluye parásitos con morfología compatible con formas procíclicas y metacíclicas. A pesar de esto se encuentran diferencias entre las cepas estudiadas donde FULL-A es más pequeño que los controles y su fenotipo se acerca más al de la cepa E1 que se supone *knock down* para LbClC-A.

3.2.3. Baja respuesta de la cepa FULL-A a cambios osmóticos

La osmolaridad es otro de los factores que oscila en los dos diferentes ambientes en los que se desarrollan los parásitos de *Leishmania* [46], variando de 300 mOsm o más en el intestino de la hembra del insecto vector [111, 112], dependiendo de su dieta que inlcuye savia de plantas (rica en azúcares) o sangre, (necesaria para la maduración de los huevos), a osmolaridades más bajas dentro de la VP [113], llevando a que el párasito desarrolle mecanismos de osmoregulacion que contribuyen a la supervivencia del parasito ante los constantes cambios del ambiente [114, 115].

Resultados previos en el grupo de investigación han asociado la función de LbClC-A con regulación de volumen. En el trabajo de Echverri, la expresión del mutante E222A, que reemplaza un residuo con carga neta negativa por uno apolar, se espera supresión de la compuerta en aquellos que son canales o modificación del ciclo de paso de iones en los que son intercambiadores, en células CHO resulta en disminución de volumen y muerte celular [116]. En el estudio realizado por Zapata, se evidenció la incapacidad de la cepa E1 para regular volumen ante retos hipo-osmolares [25]. Teniendo en cuenta lo anterior decidio exponer la cepa FULL-A a retos hipo-osmolares. Para esto se tomaron promastigotes cultivados durante 120 h y se resuspendieron en soluciones de 296, 146 y 76 mOsm/L durante 40 minutos. Se midió el volumen por por impedancia a diferentes tiempos, en las cepas WT, pSP, FULL y E1.

Como reflejan los resultados de las medidas morfométricas, el cuerpo del promastigote de la cepa WT es más grande con respecto a las otras cepas (figura 3-6). En los retos hipo-osmolares se espera documentar la respuesta de decremento regulado de volumen, donde ante un reto hipo-osmolar la célula aumenta de volumen para luego recuperar el inicial luego de movilización de iones, usualmente K^+ y Cl^- y algunos aminoácidos [114, 115, 117]. Así, se puede observar que a 296 mOsm hay un incremento de volumen en los primeros 3 min para las cepas WT: 4,7%, pSP: 3,6%, FULL-A de 2,1%, y E1: 1,1% seguido de recuperación de su volumen original (figura 3-6, grafica A).

En la solución hipotónica de 146 mOsm, la cepa WT registra un aumento de volumen, hasta alcanzar ~ 30% más, pero en el tiempo estudiado no se observa el retorno al volumen inicial. En cuanto a las cepas pSP, FULL-A y E1, muestran un comportamiento similar, tienen una perdida de volumen, estadísticamente significativa (10,8%, p=0,01; 10,5%, p= 0.03; 7,0%, p=0.001, respectivamente, comparando el T_0 con el T_{40} para cada cepa) con respecto a la cepa WT (figura 3-6, grafica B).

En la solución hipo-osmolar de 76mOSm/L, la cepa WT, presenta un incremento del volumen del 32,9% y al igual que en el la solución a 146mOsm/L, no regresa a la línea base en el tiempo medido, el incremento del volumen es un poco mayor y se puede pensar que el retorno al volumen inicial puede tomar mas tiempo que con respecto a la solución con una disminución de osmolaridad del 50%. En un trabajo desarrollado con *L. (L.) donovani* en el 2012, reportan que al someter a esta cepa a una solución 60mOsm, recupera su volumen inicial en 60min [118], podría tomarle mas de 40min a la cepa WT retornar a su volumen inicial. Cuando la cepa FULL-A es expuesta a la solución de 76 mOsm, presenta un incremento de volumen a los 3 min (22,2%) y posteriormente disminuye el volumen en un 7,4%, pero no regresa a la línea base T_0=16,3 μm^3, aumenta en el minuto 3 a 21,0 μm^3 y recupera hasta 19,4 μm^3 en el minuto 40); La cepa pSP también presenta un pequeño aumento de volumen al minuto 3 (6,1%), y vuelve a su volumen inicial al minuto 5. Con respecto a la cepa E1, presenta un aumento de volumen a los 5min (4,5%) y no vuelve a la línea base. Los resultados obtenidos por Zapata Lesmes muestran que la cepa E1 es incapaz de regular cambios de volumen [25].En todas las cepas se ve un cambio mas evidente ante el reto a 76mOsm/L, en el ANEXO C se muestran los resultados graficados por cepas, en donde es más evidente este cambio. En conclusión, se observa que la cepa silvestre tiene una ganancia de volumen mayor, haciendo que a esta le tome mas tiempo recuperar su volumen inicial, la cepas pSP y FULL-A tienen incremento de volúmenes menores y regresan a la línea base, tomándole más tiempo a la cepa con el constructo de sobre-expresion y la cepa E1 no evidencia tener capacidad regulatoria ante estos cambios de volumen como había sido reportado anteriormente.

Visto de otro modo y teniendo en cuenta el diseño experimental usado en el presente trabajo, las solución hipotónica (146 mOsm), pordria estarse comportando como hiperosmoticas, dado que el momento de la medida del volumen en el Coulter, los parasitos eran diluidos en una solución isotónica momentáneamente, luedo de estar expuestos a la solución hipoosmolar, observandoce perdida de volumen por esta razón (figura 3-6, A). Por otro lado, en cuanto a la respuesta ante la solución hipoosmolar de 76mOsm, la respuesta puesde estar siendo mitigada, ya que el reto es mucho mayor.

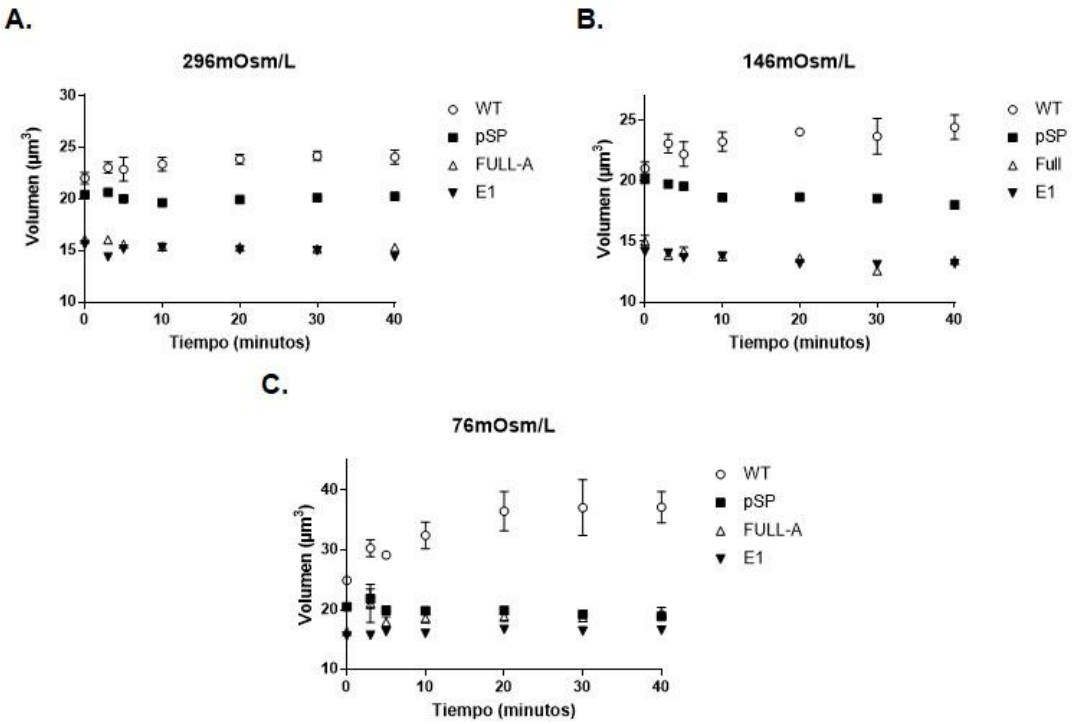


Figura 3-6: La cepa FULL-A es incapaz de regular volumen luego de un reto hipo-osmolar. (A) *Solución 296 mOsm (isotónica);* ***(B)*** *solución 146mOsm (hipo-osmolar);* ***(C)*** *solución 76mOsm (Hipo-osmolar).*

4. Capítulo 4
Capacidad de diferenciación a amastigotes e infectividad de la cepa FULL-A

En estadio promastigote la cepa FULL-A mostró ser diferente con respecto a los controles. Para determinar su capacidad de diferenciarse a amastigote se indujeron condiciones que promueven este evento *in vitro* como aumento de temperatura y acidificación del medio de cultivo para la generación de amastigotes axénicos.

La formación temprana de rosetas podría comprometer la habilidad de infectar por lo que se hicieron infecciones de una línea de macrófagos de ratón y se exploró la diferenciación a amastigote *in situ*.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Amastigotes axénicos

Parásitos crecidos durante 5 días fueron contados en cámara de Neubauer, usando azul de Tripán para determinar su densidad celular. Posteriormente fueron centrifugados a 1200 *xg* durante 10 min y el pellet celular se resuspendió en el volumen necesario de RPMI-1460 pH 5,2 ± 2 para una concentración final de 3 x 10^6 parásitos/mL para luego incubar a 35 °C. Los cultivos fueron supervisados cada 24 horas y se adquirieron imágenes de microscopía de luz a 400X y 1000X. Las

mediciones de diámetro se realizaron usando una estrategia similar a la descrita para promastigotes.

4.1.2. Infecciones de macrófagos de ratón de la línea J774.A1

Macrófagos de ratón de la línea celular J774.A1 (ATCC TIB-67) se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de SFB en flask de 25 cm^2 a 35 °C con 5% de CO_2 hasta obtener una densidad celular de ≈ 5 x 10^6 cells/mL (80% de confluencia). La densidad y viabilidad se determinaron con azul Tripan en cámara de *Neubauer*. En placas de 24 pozos se depositaron laminillas donde se sirvieron 200.000 células por pozo. Se permitió adherencia por 2 h, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron, promastigotes en fase estacionaria en una relación 10:1 (parásitos: macrófagos) de cada una de las cepas. Las placas se cultivaron a 35 °C 5% de CO_2 durante 2-4 h. Posteriormente se retiró el medio con el excedente de parásitos y se lavó dos veces con medio sin suplementar. Una vez se hicieron los lavados se adicionó medio RPMI-1640 + 10% de SFB. Para la valoración morfológica se retiraron las laminillas, fijaron y colorearon. Para cada unidad experimental se evaluaron porcentaje de infección y número de parásitos por macrófago a partir de 100 células mínimo. La infección se realizó por triplicado y por lo menos dos experimentos independientes.

4.2 Resultados

4.2.1 Baja tasa de transformación a amastigotes axénicos de la cepa FULL-A

Para evaluar el impacto de la transfección del constructo *pSP72RαneoαGFP+LbClC-A* en la capacidad de diferenciación a amastigote, se modificaron las condiciones de temperatura y pH del medio, para inducir este estadio *in vitro* como previamente ha sido reportado en otros estudios, para diferentes especies de *Leishmania* [119-122].

Promastigotes en estado estacionario fueron expuestos a pH de 5,2 y una temperatura de 35 °C. Los cultivos fueron supervisados cada 24 h. En este lapso de

tiempo se observó gran proporción de amastigotes en pSP, pero muy pocos en WT, FULL-A y E1 (datos no mostrados).

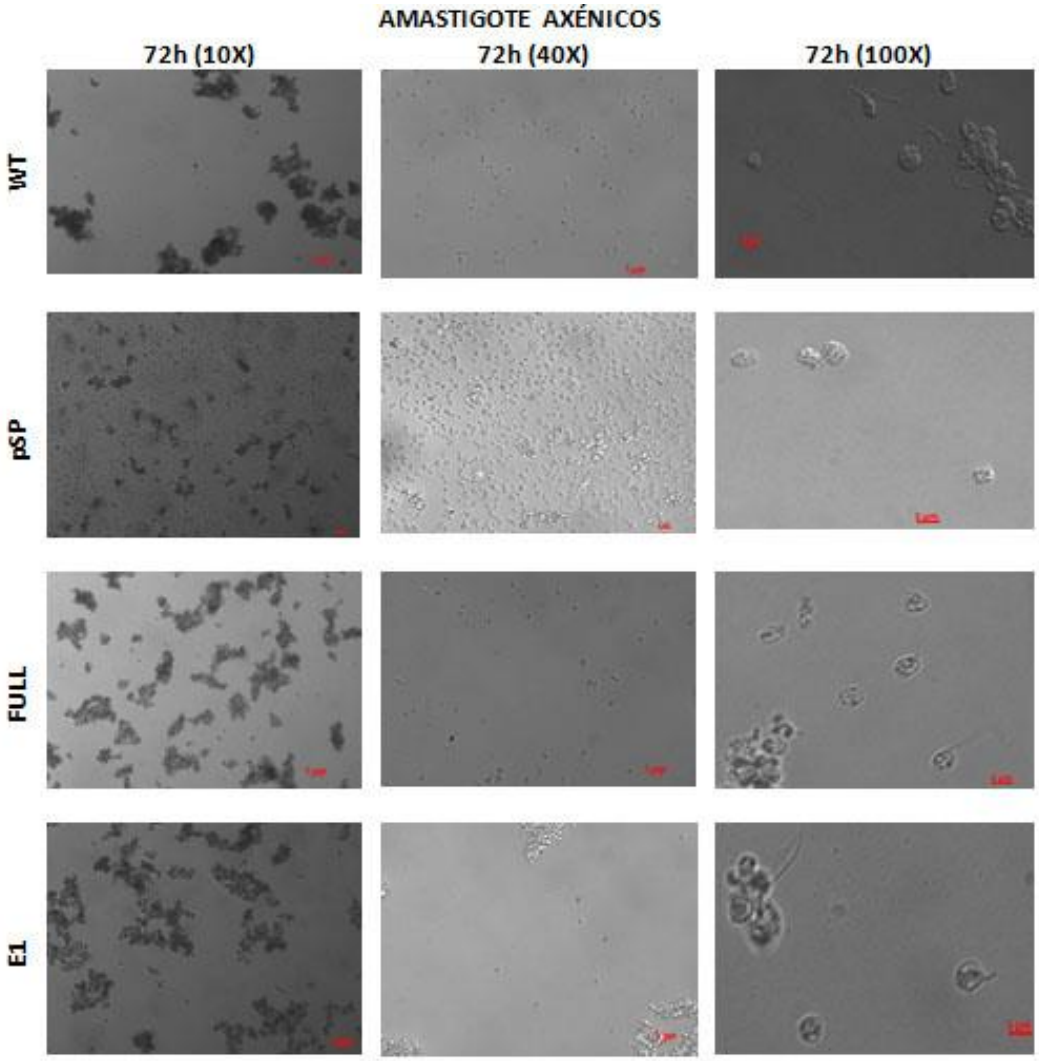
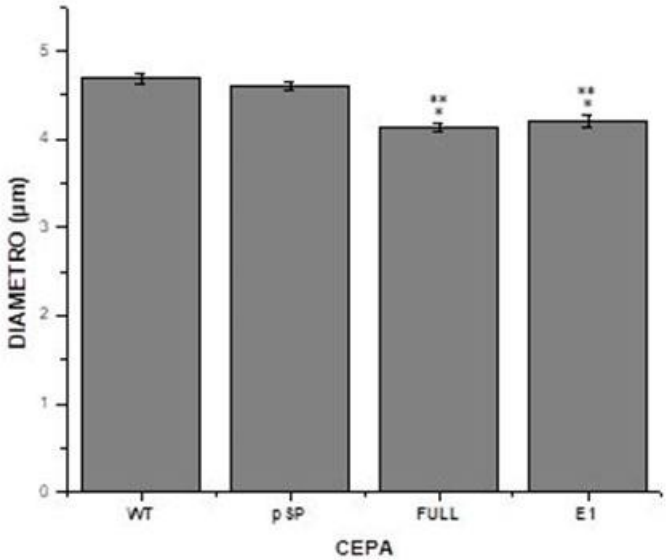


Figura 4-1: Amastigotes axénicos cultivados durante 72h. *Imágenes de microscopía DIC de las cepas WT, pSP, FULL-A y E1. Magnificaciones de 100, 400 y 1000 veces.* ***WT*** *(silvestre),* ***pSP*** *(control vacío),* ***FULL-A*** *(cepa con el constructo pSP72RαneoαGF_LbClC-A) y* ***E1*** *(cepa que se presume Knock down de LbClC-A). La barra representa de 5µm.*

Este dato es interesante porque la cepa pSP, que se asume control de transfección, mostró un comportamiento diferencial con respecto a las otras cepas que no había sido descrito en estudios previos llevados a cabo por el grupo [25, 26].

Transcurridas 72 h se evidenciaba una tasa alta de diferenciación a amastigote valorado por redondeamiento, disminución de la talla y retracción del flajelo en la cepa pSP (Figura 4-1, 72 h, 400X), mientras las demás cepas permanecían con poblaciones altas de formas con morgología promastigote. En esta problación se observaron alta mortalidad, reflejada en la pérdida de motilidad y formación de agregados de parásitos inmóviles que se precipitaron en el fondo del flask (Figura 4-1). No obstante, los amastigotes axénicos medidos son similares para todas las cepas.

A.



B.

parámetro	Amastigote			
	WT	pSP	FULL	E1
Diámetro (µm ± ES)	4,69 ±0,05	4,60 ±0,04	4,13 ± 0,05	4,20 ±0,07

Figura 4-2: Diámetro de amastigotes axénicos a 72h de cultivo. *Las medidas fueron realizadas en imágenes adquiridas con 1000 magnificaciones para las cepas* ***WT****,* ***pSP****,* ***FULL-A*** *y* ***E1****.* ***(A)*** *Gráfica de barras de las medidas obtenidas para amastigotes axénicos de cada especie, reflejadas en la tabla en* ***(B).*** *Se muestran el promedio ± ES de 100 amastigotes.* ***WT*** *(silvestre),* ***pSP*** *(control vacío),* ***FULL-A*** *(cepa con el constructo pSP72RαneoαGF+LbClC-A) y* ***E1*** *(cepa que se presume Knock down de LbClC-A).(n= 100, p=<0,001))*

4.2.2. Infección de la línea celular de macrófagos murinos J774.A1

Los resultados evidencian un porcentaje de infección muy bajo, menos de 10% en todas las cepas, que podría atribuirse al número de pases *in vitro,* más el hecho que estas cepas no han tenido pases por un modelo animal, lo que resultaría en baja infectividad [123-125]. A pesar del bajo porcentaje de infección se evidencia transformación a amastigotes intracelulares, de 1 a 2 por macrófago.

5. Capítulo 5

La cepa de *Leishmania* transfectada con el plásmido *pSP72RαneoαGFP-LbClC-A* sobre-expresa el intercambiador putativo LbClC-A?

Los datos presentados hasta el momento indican que la cepa FULL-A es diferente a las demás cepas estudiadas. Sin embargo, para poder determinar si estas diferencias pueden ser atribuidas a aumento en la expresión de LbClC-A se hicieron análisis por *Western blot* con un anticuerpo específico diseñado en el grupo (García 2016).

5.1. materiales y métodos

5.1.1. Evaluación de los niveles de expresión del intercambiador putativo *LbClC-A* por *Western Blot*

La verificación de la cantidad de proteína se realizó por *Western blot*. Para generar el extracto de proteína total se usaron 1 x 10^{7-8} parásitos que se recolectaron por centrifugación como se describió previamente. Seguido de dos lavados con PBS 1X estéril. El pellet resultante fue resuspendio en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100), en presencia de inhibidores de proteasas (Pierce™ Protease Inhibi Mini Tablets, EDTA Free, Thermo Scientific). Se incubó en hielo por 30 min con agitación con vórtex cada 10 min. La cantidad de proteína total fue cuantificada por el método de Bradford, o por esepctrofotometría a 280 nm.

Aproximadamente 50 μg de extracto de proteína total de cada una de las cepas fueron mezclados con buffer carga (60amM Tris-HCl, 10% de Glicerol, 2% de SDS, 0,5% azul de Bromofenol y 5% de β-mercaptoetanol), calentados durante 15 min a 50-70 °C y servidos en un gel de poliacrilamida discontinuo (SDS-PAGE, gel concentrador 4% y separador 10%). Las proteínas se separaron por electroforesis a 80 V por 30 min y posteriormente a 150 V por 1 h (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad). Luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Blotting Membrane, 0,45 µm, Amershan) a 30 V durante toda la noche a 4 °C (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad). Para minimizar interacciones inespecíficas la membrana fue incubada por 1 h con solución TBS (20mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl) con 5% de leche en polvo descremada a temperatura ambiente (TA). Luego fue expuesta al anticuerpo primario policlonal Anti-ClC-A (Ref. SC1031, GenScript®) toda la noche a 4 °C en diferentes diluciones. Al día siguiente la membrana fue lavada 3 veces durante 3 min con TBS 1X y 1 vez con TBS-T 0,05% (20mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl; 0.05% Tween 20) durante 5 min. Se incubó luego en anticuerpo secundario anti-conejo (Goat anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, INVITROGEN), en una dilución 1/5000 durante 1 h a TA. El revelado se realizó por quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) y las imágenes adquiridas en un ChemiDoc MP, imaging Sistem (BIORAD) o en MYECLTM Imager (Thermo Scientific).

5.1.2. Tipificación de las cepas de Leishmania objeto de estudio

Los reactivos para la tipificación por PCR-RFLP del gen HSP70 fueron amablemente donados por Marcela Parra Muñoz; se siguió la metodología descrita por Cruz y colaboradores en el 2015 [126]. Brevemente, este proceso consta de una PCR anidada y la digestión de los productos de PCR con la enzima HaeIII [126, 127]. Los productos de digestión (10 µL) fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 4% a 50 V durante 4 h y visualizados luego de marcación con SYBR Safe 1X (SYBR® Safe DNA gel Stain, 10000X, INVITROGEN).

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Niveles de expresión de la proteína LbClC-A.

Según análisis bioinformático en el programa libre en línea *Sequence Manipulation Suite* (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) para la determinación del peso teórico de la proteína objeto de estudio, con una secuencia polipeptídica de 768 aa este es 84,14 KDa.

En los ensayos de *western blot* se detectó una banda de peso menor al esperado, ~ 37 KDa, en WT, FULL-A y E1 que no se detecta en pSP (figura 5-1). Esta banda es más intensa en WT que en las otras cepas. Este resultado, inicialmente se atribuyó a proteólisis de la proteína, dado a que es reproducible en diferentes ensayos (regulación negativa), pero dada las diferentes condiciones exploradas para la estandarización de este ensayo, no es posible afirmar si esta banda es debida a un proceso de degradación, proceso proteolítico controlado o inespecificidad. Con el fin de incluir un control positivo para establecer el peso real de la proteína LbClC-A se realizaron alineamientos de la secuencia polipeptídica de esta, frente a diferentes especies de *Leishmania*. Según los alineamientos realizados en NCBI de la secuencia polipeptídica de LbClC-A, contra diferentes cepas de *Leishmania,* evidencia la presencia de proteínas con alta homología en las especies de *L. panamensis, L. amazonensis, L. mexicana, L. infantum y L. donovani* (ANEXO E). En los ensayos de Western blot, se incluyeron extractos de proteína total de *L. panamensis, L. amazonensis,* células HEK y células CHO transfectadas estable con el constructo pmEGFP+LbClC-A, disponibles en nuestro laboratorio para explorar el peso de la proteína.

En estas condiciones se hizo nuevamente un *western blot*. Una banda del peso esperado es detectada en dos extractos diferentes de células HEK-293 que expresa ClC-3, y que presenta la homología más alta con LbCLC-A [27] junto con otras bandas de menor peso. El anticuerpo utilizado reconoce una secuencia de LbClC-A en *L. braziliensis* que es idéntica a *L. panamensis*. Una banda única por debajo de 80 kDa es observada en el extracto total de *L. panamensis*, peso cercano al esperado. Bandas similares son detectadas en dos extractos diferentes de FULL-A que no aparecen en WT donde nuevamente la banda de ~ 37 kDa está presente, y también aparece en FULL-A junto con otras bandas. La ausencia de la banda cercana a 80 kDa en WT es

inespertado, porque el anticuerpo fue diseñado contra la proteína de *L. braziliensis*. La presencia de esta banda en FULL-A podría ser resultado de la expresión de la proteína desde el constructo. En el gel teñido con Coomassie, como control de carga se refleja que la cantidad de proteína sembrada para WT, no es la misma que para los dos carriles de FULL-A, y la diferencia de detección de bandas pueda atribuirse a diferencias en la proteína total cargada, de igual manera el bandeo en los carriles correspondientes a estas dos cepas es diferente. En pSP la banda por debajo de 80 kDa está presente pero llama la atención que el patrón de bandeo no corresponde con ninguno de los otros detectados (figura 5-1), sugiriendo una especie de *Leishmania* diferente.

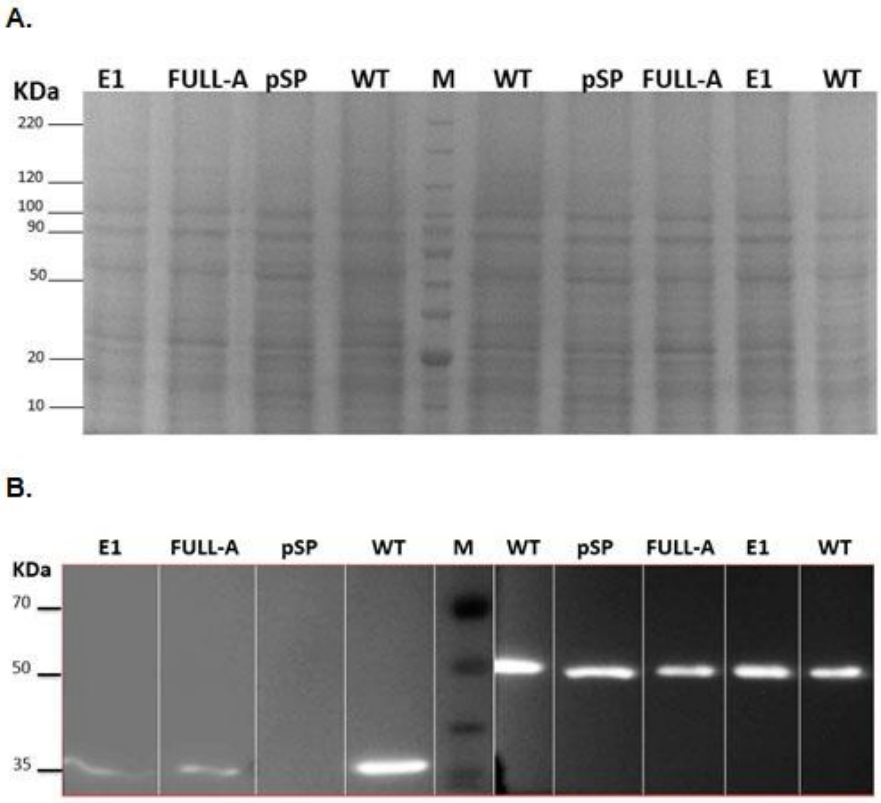


Figura 5-1: Niveles de expresión de la proteína LbClC-A y α-tubulina. (A) *gel de acrilamida/bisacrilamida teñido con azul de Coomassie, usado como control de carga.* ***(B)*** *Western blot, marcaje con anti-ClC-A.* ***M:*** *marcador de peso molecular (Gel teñido con Azul de Coomassie BenchMark™ Unstained Protein Ladder Protocol, INVITROGEN; Blot: HyperPAGE Prestained Protein Marker, BIOLINE);* ***WT:*** *EPT de la cepa Wild type;* ***pSP:*** *EPT de la cepa control vacío,* ***FULL:*** *EPT de la cepa transfectada con el constructo de sobre-expresión y* **E1:** EPT de la cepa knockdown de ClC-A. *Lado derecho α–tubulina, lado izquierdo ClC-A.*

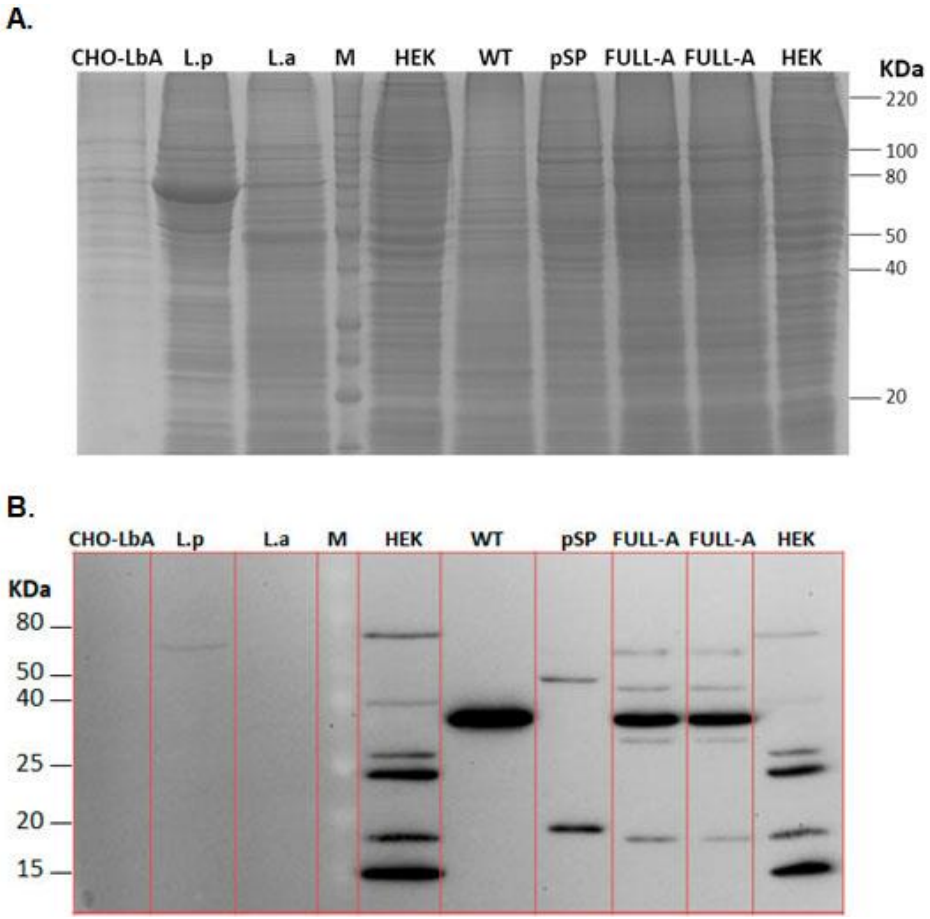


Figura 5-2: Niveles de expresión de la proteína LbClC-A. (A) *gel de acrilamida/bisacrilamida teñido con azul de Coomassie, usado como control de carga.* ***(B)*** *Western blot, marcaje con anti-ClC-A.* ***CHO-LbA:*** *EPT células CHO transfectadas con LbClC-A;* ***L.p:*** *EPT de L. panamensis;* ***L.a:*** *EPT de L. amazonensis;* ***M:*** *marcador de peso molecular (Gel teñido con Azul de Coomassie: BenchMark™ Unstained Protein Ladder Protocol, INVITROGEN; Blot: HyperPAGE Prestained Protein Marker, BIOLINE);* ***HEK:*** *EPT de células HEK-293 (células embrionarias de riñón humano);* ***WT:*** *EPT de la cepa silvestre;* ***pSP:*** *EPT de la cepa control vacío y* ***FULL-A:*** *cepa transfectada con el constructo de sobre-expresión.*

5.2.2. Tipificación de las cepas objeto de estudio

Dados los resultados encontrados y la posibilidad que pudieran atribuirse a diferencias en las especies de las cepas en estudio fue necesario hacer la tipificación correspondiente.

Para ésta se amplificó la secuencia del gen HSP70 por *PCR* anidada. El amplicón obtenido fue digerido con la enzima de restricción HaeIII. El bandeo de la digestión para la cepa *L. panamensis* corresponde con el de esta especie (figura 5-3). Los fragmentos

detectados para *L. amazonensis* apoyan que esta especie está bien codificada. La cepa pSP tiene un patrón compatible con *L. mexicana* en tres ensayos independientes. En cuando a las cepas WT, FULL-A y E1, estas parecen corresponder con la misma especie.

Con la metodología *PCR-RFLP* no se pudo determinar la especie de las cepas utilizadas en este estudio, donde sólo se dedujo subgénero *Leishmania.* Por esta razón se secuenciaron los productos de PCR del gen HSP70 (CORPOGEN). Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el programa en línea MUSCLE, con las reportadas en GenBank para *Leishmania donovani* (número de acceso:JX312712.1), *Leishmania major* (números de acceso: HF586346.1, HF586345.1, FN395023.1, FN395024.1 y FN395022.1), *Leishmania aethiopica* (números de acceso: FN395021.1, FN395020.1, FN395019.1 y FN395018.1) y *Leishmania tropica* (números de acceso:HF586348.1, HF586347.1, HF395026.1 y HF395025.1), que poseían las secuencias parciales más completas. Con base en estos análisis se concluye que WT y FULL-A pertenecen a *Leishmania Leishmania tropica*. Los resultados de los alineamientos se muestran en el ANEXO F. En vista que el bandeo observado para E1 es igual a WT y FULL-A se asume que ésta es de la misma especie.

Estos datos indican entonces que los resultados del control de transfección pSP no permiten comparación por ser una especie diferente a WT, FULL-A y E1. La cepa pSP generada en el laboratorio no se pudo descongelar con éxito por lo que se solicitó una aliquota a otro grupo al que se le compartieron las cepas del grupo y el plásmido *pSP72RαneoαGFP* y se asume que se electroporó *L. mexicana*. Con respecto a E1 los resultados obtenidos ponen en discusión la conclusión de Zapata que ésta corresponde a un *knock down* de LbClC-A, la eficacion de un constructo diseñado para disminuir la expresión de la proteína LbClC-A en la especie *Leishmania (V.) braziliensis*, puede no tener la misma eficacia *en Leishmania (L.) tropica*, teniendo en cuenta que en los resultados mostrados en el presente trabajo, no se evidencia la presencia de la banda del tamaño esperado para esta proteína, aunque los alineamientos muestran la presencia de una proteína homologa con el 87% de identidad. FULL-A, es entonces una

cepa que expresa una proteína de otra especie de *Leishmania*, pero que no se sabe si es funcional.

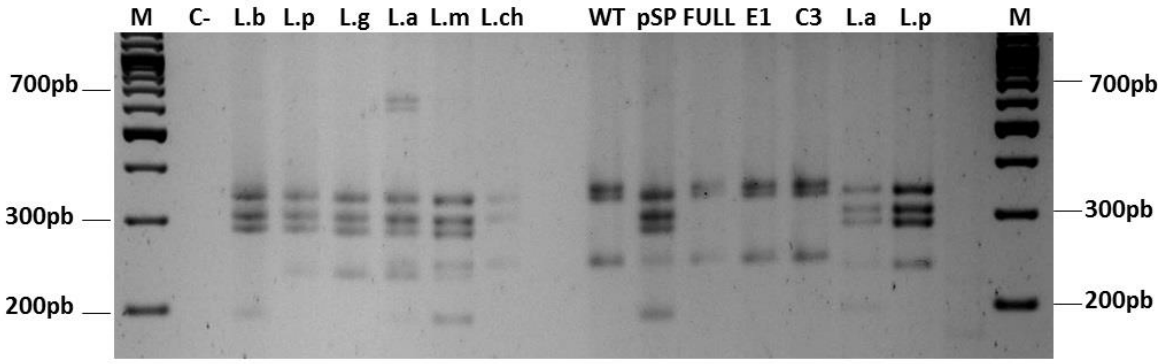


Figura 5-3: Digestión productos de PCR HSP70 (1378pb) con la enzima HaeIII. M: marcador de peso molecular 100pb (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific); **C-:** control negativo; **L.b:** cepa de referencia *L. (V). braziliensis* (MHOM/BR/84/LTB300); **L.p:** cepa de referencia *L.(V). panamensis* (MHOM/PA/71/LS94); **L.G:** cepa de referencia *L. (V). guyanensis* (MHOM/GF/LEM85); **L.a:** cepa de referencia *L. (L). amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269); **L.m:** cepa de referencia *L. (L). mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21); **L.ch:** cepa de referencia *L. (L). chagasi* (MHOM/BR/74/PP75a); **WT:** cepa *wild type* usada en los experimentos, **pSP:** cepa control, vector vació, **FULL:** cepa con el constructo de sobre-expresión y **E1:** cepa con *Knock down* del LbClC-A. Las últimos carriles marcados como L.a y L.p corresponde a las cepas WT del laboratorio.

5.2.3. Proteína homóloga de LbClC-A en *L. (L.) tropica*

Los alineamientos hechos con la herramienta ofrecida por la base de datos del NCBI (Blastp) mostraron proteínas homólogas de LbClC-A tanto en la subespecie *Viannia* como en *Leishmania*, pero difieren en el porcentaje de identidad: 98% *L. (V.) panamensis*; 99% *L. (L.) amazonensis*; 96% *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani* y *L. (L.) major* y 85% para *L. (L.) mexicana*, en esta base datos no se encontraron homologías con *L. (L.) tropica*, contrario a lo encontrado en la base de datos TritrypDB, en donde los alineamientos arrojaron una proteína de 772aa, con 87% de identidad, que posee la secuencia del péptido de inmunización, que varía en 2aa, como en otras especies del subgénero *Leishmania*, lo que hace posible que el anticuerpo diseñado contra la proteína de *L. (V.) braziliensis*, reconozca proteínas homólogas en otras especies de Leishmania. (ANEXO E)

No obstante se llevó a cabo la detección del gen de la proteína LbClC-A por PCR convencional con los *primers* previamente diseñados para amplificar el gen *LbClC-A* de *L. (V.) braziliensis*. Las condiciones fueron 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 mM de dNTPs, 0,3 µM

de cada *primer* (Fw: GAGATGACGGAAGCAGGC y Rv: GCGGTGGTGGGCAGT) y 0,05 U de taq polimerasa (Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase,Thermo Scientific). El perfil térmico usado fue: 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min y 30 s, 60 °C durante 2 min, 72 °C por 2 min y 30 s, un ciclo de elongación final a 72 °C por 5 min, en un termociclador S1000™ (Thermal Cycler, BIORAD).

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con SYBR Safe 1X (SYBR® Safe DNA gel Stain, 10000X, INVITROGEN), a 80 V durante 1 h. Como control positivo se usó DNA de una cepa de referencia de *L. (V.) braziliensis*. La banda del tamaño esperado de 2307 pb aparece en el control positivo (C+) y en FULL-A. Llama la atención en WT un producto de amplificado ~ 600 pb que no aparece en pSP (figura 5-4). Los *primers* diseñados para LbClC-A no amplifican la secuencia del gen homólogo en las especies de *Leishmania* del subgénero *Leishmania*. Si este producto de menos peso se asocia con LtClC-A requiere secuenciación del mismo.

Los resultados obtenidos indican la presencia en la cepa FULL-A del gen *LbClC-A*. La detección de una banda por *Western blot* al peso esperado podría indicar expresión de la proteína, pero este dato debe ser confimardo por secuenciación. Si la proteína es funcional no se puede concluir.

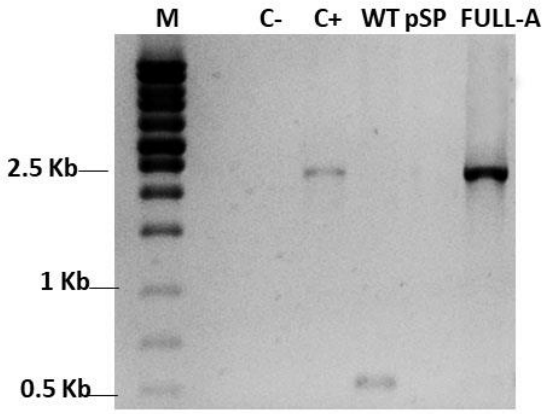


Figura 5-4: Amplificación del gen LbClC-A por PCR. M: marcador de peso molecular 1Kb (1Kb Ladder DNA Marker, Axygen), C-: control negativo, C+ cepa de referencia *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/84/LTB300), WT: *L. (L.) tropica*, pSP: *L. (L.) mexicana* y FULL-A: *L. (L.) tropica*. Tamaño del fragmento esperado: 2307pb.

6. Discusión

Por lo menos 21 de las especies de *Leishmania* descritas [38, 42] son patógenas para humanos y ellas conllevan a una variedad de diferentes manifestaciones clínicas según el agente causal y aunque entre las especies se comparten características generales del ciclo de vida y los vectores que las transmiten [128], también difieren en cuanto a morfología, tasa de crecimiento y condiciones de cultivo, tanto para promastigotes como para amastigotes axénicos [107, 108].

En este estudio se encontró que la cepa pSP no puede ser considerada control de transfección con el vector, ya que pertenece a una especie diferente de *Leishmania*. Por otro lado al comparar las características de FULL-A con respecto a la cepa WT, se evidencian cambios morfológicos, de crecimiento y fisiológicos con respecto a esta cepa. En este estudio se utilizó la cepa E1 [25], que parece ser *L. (L.) tropica*, pero tiene un tratamiento diferente a la cepa FULL-A. E1 es una cepa transfectada con un plásmido diseñado para silenciamiento de la proteína LbClC-A y resultados previos indican alteraciones en su tasa de crecimiento, cambios morfológicos e incapacidad para regular cambios de volumen y transformarse a amastigotes en infecciones *in vitro* de macrófagos J774.A1. Dados los hallazgos del presente trabajo y teniendo en cuenta que esta cepa se presumía *L. (V.) braziliensis*, se asumió una disminución en la expresión de la proteína LbClC-A. No obstante no es posible afirmar que el interferente diseñado tenga la capacidad de bloquear la expresión de la proteína LtClC-A,. FULL-A también tiene alteraciones en la tasa de crecimiento, siendo menor que E1, si bien morfológicamente son similares, y se encuentran diferencias en la respuesta a retos hipo-osmóticos, con respecto a WT. Con base en lo anterior, es difícil afirmar que los cambios encontrados para cada cepa,no son producto del proceso de transfección o al tratamiento en sí.

En cuanto a la diferenciación a amastigotes axénicos, tanto WT, como FULL-A y E1, presentan baja transformación. En contraste para pSP esta tasa fue alta en las condiciones utilizadas en el presente estudio. Esto puede estar dado porque cada especie tiene condiciones óptimas de temperatura, pH y medio utilizado, que influyen en el rendimiento de la transformación. Bahrami y colaboradores en el 2011, realizaron un estudio en donde establecieron condiciones óptimas para la diferenciación a amastigotes de *L. (L.) tropica* en medio BHI suplementado con 20% de suero fetal bovino a pH 4,5, incubados a 37 °C, en presencia de 5% de CO_2 y reportan que a pH 5,5 los amastigotes crecen más lento [129] lo cual es congruente con lo encontrado en este trabajo. Sin embargo, otro estudio propone como condiciones óptimas para el desarrollo de amastigotes de esta especie medio RPMI pH 5,5, cultivados a 36 °C (90% de transformación y los amastigotes continúan dividiéndose, permitiendo de 2 a 3 pases) y no a 37 °C con pH 5,5, porque a esta temperatura los amastigotes no se dividen y además no es posible realizar pases continuos [130]. Estas son condiciones similares a las de este trabajo exceptuando la temperatura que para nuestro caso fue menor. Dado que *L. (L.) tropica* además de producir leismaniosis cutánea, tiene la capacidad de generar la forma visceral, supone toleracia a rangos más altos de temperatura comparada con las especies que inducen la forma cutánea. Por tanto se sugiere usar temperaturas mayores para indicr deiferenciación a amastigote.

El anticuerpo diseñado contra la proteína LbClC-A, está dirigido contra un péptido de 15 aa que está presente en las proteínas homólogas en las otras especies de *Leishmania* y aunque difieren en dos o tres aminoácidos que podrían influir en la afinidad del anticuerpo por la proteína, existe la posibilidad de que este la reconozca. En el *Western blot* de la figura 5-3, en el carril que corresponde a FULL-A (por duplicado) aparece una banda ~ 80 KDa, que podría corresponder a la proteína ClC-A. Llama la atención que en el carril correspondiente a WT esta banda no aparece, lo que indica que FULL-A podría estar expresando la proteína LbCLC-A. En WT solo aparece la banda de ~ 37KDa con mayor intensidad que el FULL-A.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

En el presente estudio se generó la cepa estable FULL-A de *L. (L.) tropica* que expresa el plásmido *pSP72RαneoαGFP+LbClC-A*, es resistente al antibiótico G418 y expresa la proteína fluorescente GFP. Esta cepa tiene una tasa de crecimiento inferior con respecto al control WT, presenta diferencias morfológicas en su forma promastigote, forma rosetas más rápido, y tiene una tasa de diferenciación a amastigotes axénicos inferior bajo las condiciones evaluadas en este trabajo.

7.2. Recomendaciones

Es necesario realizar el control con el plásmido vacío de la misma cepa transfectada con el constructo de sobre-expresión para descartar que los cambios encontrados aquí no sean producto del proceso de transfección, si bien, E1 con un constructo diferente presenta características morfológicas similares a la cepa FULL-A, también tiene características de crecimiento que difieren, y además una tasa de respuesta a los retos hipo-osmóticos que difiere en algunos aspectos, pero con algunas similitudes, haciendo difícil esclarecer que se debe al solo proceso de transfección. Es importante desarrollar los controles para cada experimento, en las mismas condiciones y partiendo del mismo cultivo, para evitar las dificultades expuestas en este trabajo.

Se sugiere hacer electroporación del constructo de sobreexpresión en la especie *L. (V.) braziliensis* para estudiar el efecto de la sobreexpresión de la proteína LbCLC-A en estos parásitos, dado que aunque en todas las especies de Leishmania exista una alta similitud en estas proteínas pueden diferir en expresión y función, y en principio el diseño experimental fue hecho para esta cepa.

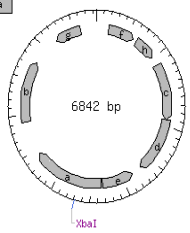
A.Anexo A: Digestiones *in silico* del plásmido *pSP72RαNEOαGFP* con las enzimas XbaI y BamHI

Circular Sequence: pSP72R-Neo--G

Sequence digested with: XbaI

Cleavage code	Enzyme name code
blunt end cut	Available from NEB
5′ extension	Has other supplier
3′ extension	Not commercially available
cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	#: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site

ORFs:
a: 357 aa
b: 286 aa
c: 268 aa
d: 264 aa
e: 159 aa
f: 134 aa
g: 133 aa
h: 108 aa



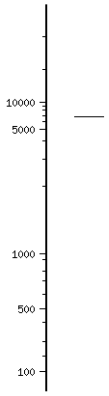
Custom Digest

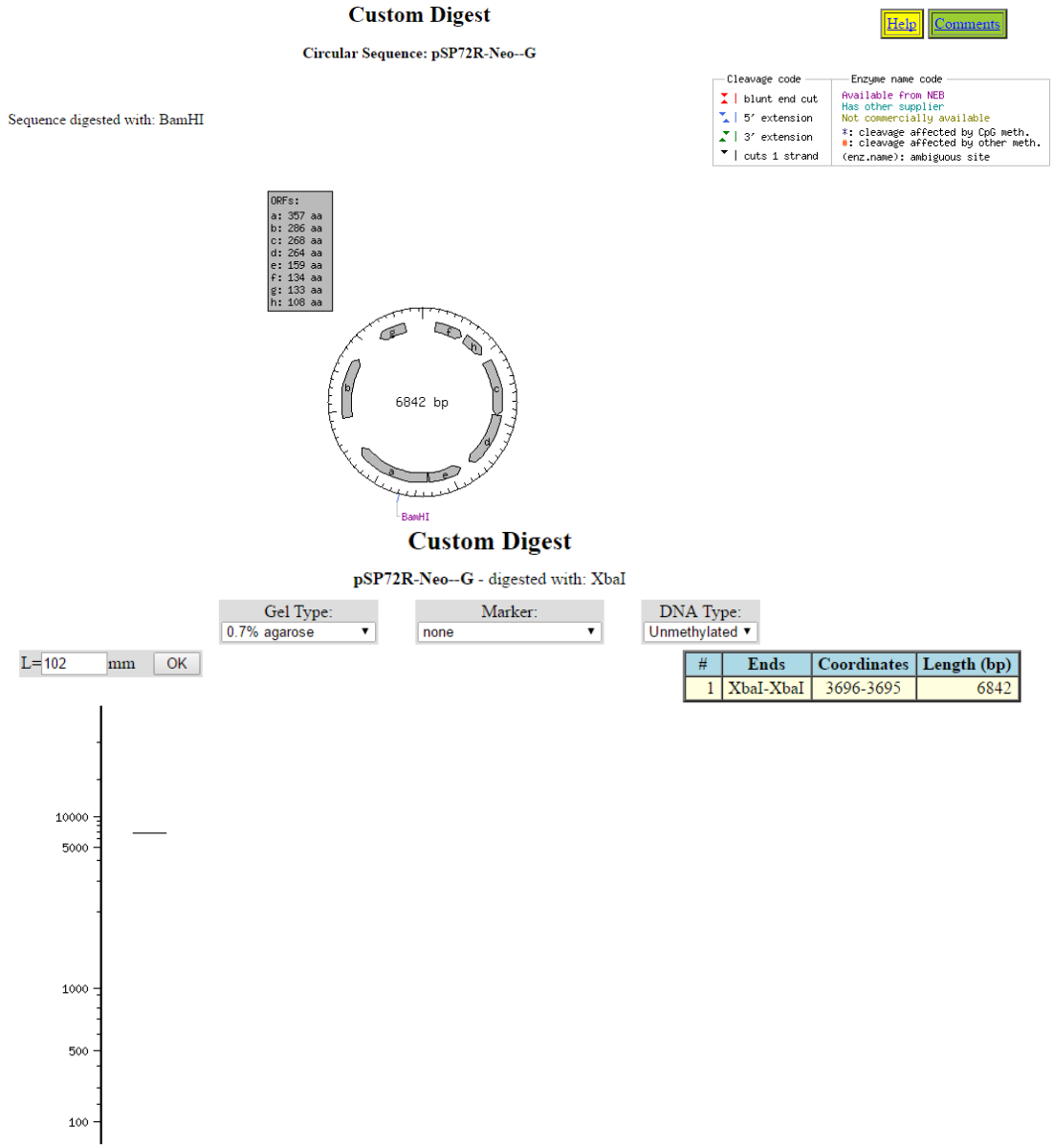
pSP72R-Neo--G - digested with: BamHI

Gel Type: 0.7% agarose
Marker: none
DNA Type: Unmethylated

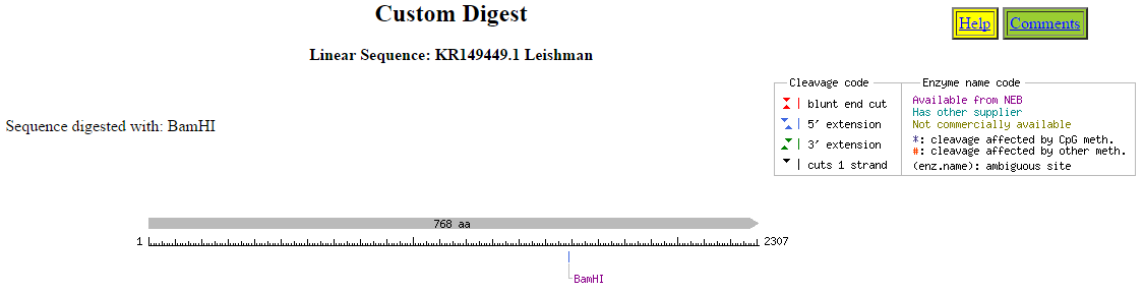
L= 102 mm OK

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	BamHI-BamHI	3690-3689	6842





DIGESTION SECUENCIAS DE CIC-A REPORTADA EN EL GENBANK()



Custom Digest

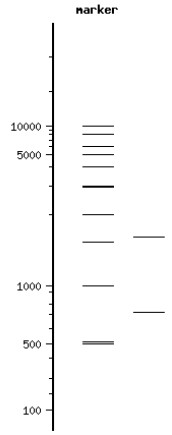
KR149449.1 Leishman - digested with: BamHI

Gel Type: 0.7% agarose

Marker: 1 kb DNA Ladder

DNA Type: Unmethylated

L= 102 mm OK



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-BamHI	1-1589	1589
2	BamHI-(RightEnd)	1590-2307	718

B. Anexo B: Confirmación de la presencia del plásmido *pSP72RαNEOαGFP por PCR*

A continuación se muestran los primers usados para la confirmación de la presencia de los componentes del plasmido *pSP72RαNEOαGFP,* en las diferentes cepas objeto de estudio.

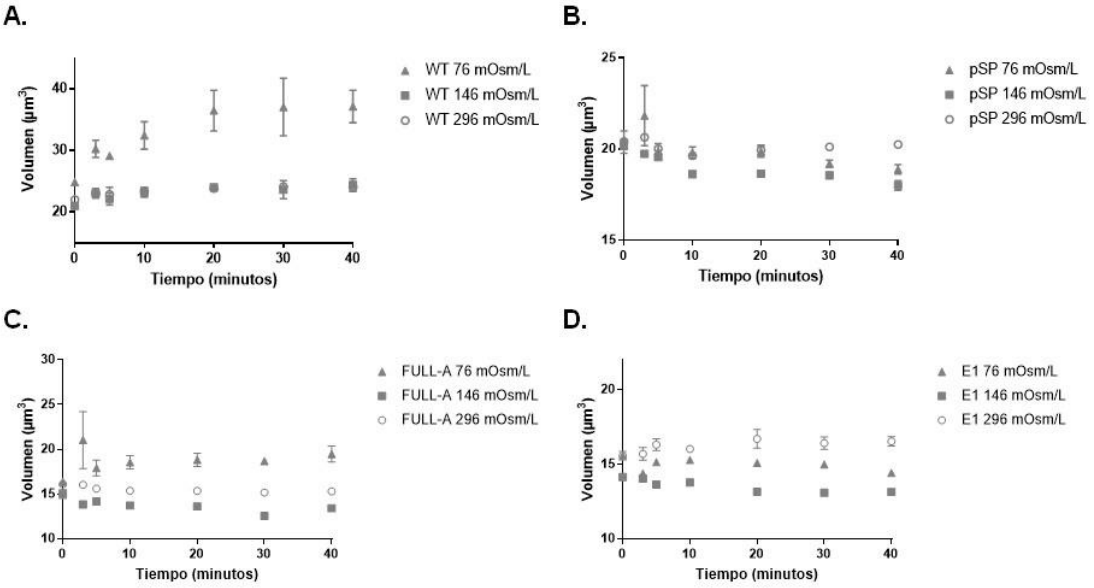
Primer	Secuencia 5'-3'	Producto de PCR
NEO-Fw	TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC	380pb
NEO-Rv	CGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAG	
GFP PSP72-Fw	GCAAGCTGACCCTGAAGTTC	205pb
GFP PSP72-Rv	GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC	
pSP72_4980_Fw	GTTTTCGTTCCACTGAGCGT	931pb
pSP72_5900_Rv	AGATCTGCCGGTCTCCCTAT	

Condiciones de amplificado

Reactivo	Concentracion
Buffer	1X
$MgCl_2$	1.5 mM
dNTPs	200 µM
Fw	0.2 µM
Rv	0.2 µM
Taq	0.04U
DNA	200ng

Perfil térmico		
Temperatura	**Tiempo**	**Ciclos**
94°C	5min	1
94°	1min	30
55°C (GFP y 4980-5900) 68°C (NEO)	1min	
72°C	1min	
72°C	5min	1

C. Anexo C: Retos osmóticos representados por cepas



Retos osmóticos. (A) WT, cepa silvestre, **(B) pSP,** cepa control vector vació, **(C) FULL-A,** cepa con el constructo de sobreexpresión, **(D) E1,** cepa con el constructo de interferencia.

D. ANEXO D: secuencia peptídica de la proteína *LbClC-A (número de acceso* GenBank: ALG38030.1*).*

>ALG38030.1 putative CLC anion/proton exchanger A [Leishmania braziliensis]

MTEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTTHSPYGEK
RPAYSFQGEAFLAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSLCCVDSNECDEYYSW
GEFFLGRDNHVVAFVDFVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGYHVKRYLGGWT
LITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGII**SGAFPSYQQETKERE**LITAGAGGGMAVAFGAP
VGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVLFQSRVDLWHTGCIVQFSINHRHNWHFFELPMFAVI
GCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKHVKQWRLAEVTVVAAITGVVNFLTPYSSGGMLELLGDCFQDCT
PDSSIEMCEGSDVRAFFSLLVTATAKFAMFTYTVGTFLPAGILVPSLTIGALYGRAFGMMFRSLQET
YAGSYIFTECYHQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTTCLAIIMFELTGSLEYMVPIIVGILCAKA
AGEAVGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVYKNKQFTVLTAYGLQVRDINELVTRMNVT
GFPVVESASDTTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSXYIRFKTAPSNSQDPNFLEVNLTNVLES
CLLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERRE
LARQRRRREVATAVIDRTTTASAVRATAHHR

E. Anexo E: Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la proteína LbClC-A (ALG38030.1) y *Leishmania* (*taxid*: 5658)

ALINEAMIENTOS (Blastp 2.7.1, NCBI)			
PROTEINA	**COVERTURA**	**IDENTIDAD**	**# de ACCESO**
Putative CLC anion/proton exchanger A [Leishmania braziliensis]	100%	100%	ALG38030.1
768aa >ALG38030.1 putative CLC anion/proton exchanger A [Leishmania braziliensis] MTEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQG EAFLAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSLCCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVVAFVD FVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPF VHIGACVGGII**SGAFPSYQQETKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGV TAVLFQSRVDLWHTGCIVQFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKHVKQWRLAEVTV VAAITGVVNFLTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFSLLVTATAKFAMFTYTVGTFLPAGILV PSLTIGALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECYHQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTTCLAIIMFELTGSL EYMVPIIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVYKNKQFTVLTAYGLQVRDINEL VTRMNVTGFPVVESASDTTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSXYIRFKTAPSNSQDPNFLEVNLTNVLESC LLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERRELARQRRRRE VATAVIDRTTTASAVRATAHHR			
ClC-type chloride channels, putative [Leishmania panamensis]	100%	98%	XP_010696661.1
768aa >XP_010696661.1 CLC-type chloride channel, putative [Leishmania panamensis] MTQAGGGCGGTGVGGDDEAITRLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQG EAFLAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSLCCVDGNECDEYYSWGEFFLGRDNHVVAFVD FVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPF VHIGACVGGII**SGAFPSYQQETKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGV TAVLLQSRVDLWHTGCIVQFSINYRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKHVKQWRLAEVTV VAAITGVVNFLTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFSLLVTATAKFAMFTYTVGTFLPAGILV PSLTIGALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECYHQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTICLAIIMFELTGSL EYMVPIIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVYKNKQFTVLTAYGLQVRDINEL VTRMNVTGFPVVESASDTTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSTYTRFKTAPSHSQDPNFLEVNLTNVLESC LLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERRELARQRRRRE			

VATAVIDRTTTTSAVRATAHHR

Putative CLC anion/proton exchanger A [Leishmania panamensis]	**97%**	**99%**	**ALG38032.1**

745aa
>ALG38032.1 putative CLC anion/proton exchanger A, partial [Leishmania panamensis]
MTEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQG
EAFLAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSLCCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVVAFVD
FVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPF
VHIGACVGGIISGAFPSYQQETKERELITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGVTAVL
FQSRVDLWHTGCIVQFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKHVKQWRLAEVTVVAAI
TGVVNFLTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFSLLVTATAKFAMFTYTVGTFLPAGILVPSLT
IGALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECYHQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTTCLAIIMFELTGSLEYMV
PIIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVYKNKQFTVLTAYGLQVRDINELVTRM
NVTGFPVVESASDTTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSTYIRFKTAPSNSQDPNFLEVNLTNVLESCLLQV
EPECSVKKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERRELARQRRRR

Putative CLC anion/proton exchanger A [Leishamania amazonensis]	98%	99%	ALG38031.1

754aa
>ALG38031.1 putative CLC anion/proton exchanger A, partial [Leishmania amazonensis]
MTEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSYTEAAERAAMRRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQG
EAFLAALACGIALGCLGVISDACARWVSAFRSGICANFFWLDRSLCCVDSNECDEYYSWGEFFLGRDNHVVAFVD
FVMYVGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGYHVKRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPF
VRIGACVGGII**SGAFPSYQQETKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKALMAALICGV
TAVLFQSRVDLWHTGCIVQFSINHRHNWHFFELPMFAVIGCFGGFMGSTFSVINLHICRWRKKHVKQWRLAEVTV
VAAITGVVNFLTPYSSGGMLELLGDCFQDCTPDSSIEMCEGSDVRAFFSLLVTATAKFAMFTYTVGTFLPAGILV
PSLTIGALYGRAFGMMFRSLQETYAGSYIFTECYHQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTTCLAIIMFELTGSL
EYMVPIIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIVIEENKLPYLDPKKEFYLDFSAKDVYKNKQFTVLTAYGLQVRDINEL
VTRMNVTGFPVVESASDTTLLGYAPTKKMMRAIQVAAVRNRDVSLSTYIRFKTAPSNSQDPNFLEVNLTNVLESC
LLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHIVVCRYAKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERRELARQRRRRE
VATAVIDR

Putative CLC-type chloride channel [Leishmania infantum JPCM5]	95%	86%	XP_001462631.1

770aa
>XP_001462631.1 putative CLC-type chloride channel [Leishmania infantum JPCM5]
MHSSLPMAEQMARAGGGGGAASGADEGITNLVVNVPEADWATIDCISSHTEAAERAAMWRRHSVTAAASSSYGDT
WSVYSPEGEAFFAAMACGIVLGCLGVFSDACAHWVSAFRSGICANFFWLGRNMCCVDSRECGEYYSWGEFFLGRD
NHVVAFVDFVMYVSFSTMAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGHHVKRYLGGWTLITKVVGMCFSTGSGL
TVGKEGPFVHIGACVGGII**SGALPSYQQEAKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKAL
MAALICGVTAVLLQSRVDLWHTGRIVQFSVNYQHNWHFFELPMFAAIGCFGGFIGSTFSVVNLHVGRWRKRHLRQ
WRIVEVAVVAAVTAVVNFLTPYGSGSMLELLGDCFQDCTPNGTIEMCEDSDMRAFFSLLVTATAKFAMFSYTVGT
FLPAGILVPSLTIGALYGRAFGMMFRALQETYASSYIFTECYDQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTICLAII
MFELTGSLEYMVPVIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIGIEENKLPYLDPKKEFYLDFVAQNVYGNKQFTVLTAYGL
QVRDINELVTKMNVTGFPVVESPSDMTLLGYAPAKKIVRALQVAAARNSDVNLNTYIRFKTTPSHSREATFLEVD
LTNILESCLLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHILVCRYSKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERCER
VRQERHHEAATAAVDVAPVAARYN

CLC-type chloride channel, putative [Leishmania donovani]	95%	86%	XP_003857831.1

770aa

>XP_003857831.1 CLC-type chloride channel, putative [Leishmania donovani]
MHSSLPMAEQMARAGGGGGAASGADEGITNLVVNVPEADWATIDCISSHTEAAERAAMWRRHSATAAASSSYGDT
WSVYSPEGEAFFAAMACGIVLGCLGVFSDACAHWVSAFRSGICANFFWLGRNMCCVDSRECGEYYSWGEFFLGRD
NHVVAFVDFVMYVSFSTMAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGHHVKRYLGGWTLITKVVGMCFSTGSGL
TVGKEGPFVHIGACVGGII**SGALPSYQQEAKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKAL
MAALICGVTAVLLQSRVDLWHTGRIVQFSVNYQHNWHFFELPMFAAIGCFGGFIGSTFSVVNLHVGRWRKRHLRQ
WRIVEVAVVAAVTAVVNFLTPYGSGSMLELLGDCFQDCTPNGTIEMCEDSDMRAFFSLLVTATAKFAMFSYTVGT
FLPAGILVPSLTIGALYGRAFGMMFRALQETYASSYIFTECYDQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTICLAII
MFELTGSLEYMVPVIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIGIEENKLPYLDPKKEFYLDFVAQNVYGNKQFTVLTAYGL
QVRDINELVTKMNVTGFPVVESPSDMTLLGYAPAKKIVRALQVAAARNSDVNLNTYIRFKTTPSHSREATFLEVD
LTNILESCLLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHILVCRYSKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERCER
VRQERHHEAATAAVDVAPVAARHN

Putative CLC-type chloride channel [Leishmania major strain Friedlin]	95%	86%	XP_003721538.1

772aa
>XP_003721538.1 putative CLC-type chloride channel [Leishmania major strain Friedlin]
MHSSLPMAEQTARAGGGGGGGAGNGADESITNLVVNVSEADWATIDCIRSHTEAAERAAMWRRHSATAAASSSYG
DKWSVYSPEGEAFFAAMACGIVLGCLGVFSDACAHWVSAFRSGICANFFWLGRNMCCVDCRECGEYYSWGEFFLG
RDNHVVAFVDFVMYVSFSTMAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGHHVKRYLGGWTLITKVVGMCFSTGS
GLTVGKEGPFVHIGACVGGII**SGALPSYQQEAKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFK
ALMAALICGVTAVLLQSRVDLWHTGRIVQFSVNYQHNWHFFELPMFAAIGCFGGFMGSTFSVVNLHVGRWRKKHL
RQWRIVEVAVVAAVTGVVNFLTPYGSGSMLELLGDCFQDCTPSGTMEMCEDSDLRAFFSLLVTATAKFAMFAYTV
GTFLPAGILVPSLTIGALYGRAFGMMFRALQETYASSYIFTECYDQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTICLA
IIMFELTGSLEYMVPVIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIGIEENKLPYLDPKKEFYLDFVAKDVYGNKQFTVLTAY
GLQVRDINELVTKMNVTGFPVVESLSDVTLLGYAPVKKIVRALQVAAARNSDMNLNTYIRFKTKPSHSRDATFLE
VDLTGILESCLLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHIFVCRYSKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERR
ERVQQGRHHEAATAAVDVAPVAARYN

Putative CLC-type chloride channel [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	92%	85%	XP_003871543.1

770aa
>XP_003871543.1 putative CLC-type chloride channel [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]
MAEQMARAGAGGSGGSGGSGGSGGDEGITNLVVNVREADWATIDCISSHTEAAERAAMRRRHSAAAAASSSYGDT
WSVYSPEGEAFFAAMACGIVLGCLGVFSDACAHWVSAFRSGICANFFWLGRNMCCVDSRECGEYYSWGEFFLGRD
NHVVAFVDFVMYVSFSTMAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGHHVKRYLGGWTLITKVVGMCFSTGSGL
TVGKEGPFVHIGACVGGII**SSALPSYQQEAKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKAL
MAALICGVTAVLLQSRVDLWHTGRIVQFSVNYQHSWHFFELPAFAAIGSFGGFAGSAFSVVNLRVGRWRKKHLSQ
WRIVEVAVVAAVTGVVNFLTPYGSGSMLELLGDCFQDCTPNGTIEMCEDGDMRAFFSLLVTATAKFAMFAYTVGT
FLPAGILVPSLTIGALYGRAFGMMFRALQETYASSYVFTECYDQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTICLAII
MFELTGSLEYMVPVIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIGIEENKLPYLDPKREFYLDFVAKNVYGNKQFTLLTAYGL
QVRDINELVTKMNVTGFPVVESPSDMTLLGYAPAKRLVRAIQMAAARNSDVNLGTYIRFKTTPSHSHDATFLEVD
LTDILESCLLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHILVCRYSKFEGFISKKDFIDFMRVKEREENMEDDELERERRER
VRQGRRHETATAAVDVAPVAAQYR

Secuencia péptido de inmunización: SGAFPSYQQETKERE, la parte de la secuencia que está en **negrilla** corresponde a lo que es igual y las letras **subrayadas** es en donde difiere.(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

ALINEAMIENTOS (Blastp, TritypDB)

PROTEINA	Punto isoeléctrico	Peso molecular	Longitud proteína	Identidad
LTRL590_010006800 **CLC-type chloride channel, putative** ***L. tropica***	6.34	83780 Da	772aa	87%

MHSSLPMAEQTVRAGGGGGGGAGSGADDGITNLVVNVSEADWATIDCISSHTEAAERAAMWRRHSATAAASSSYG
DTWSVYSPEGEAFFAAMACGIVLGCLGVFSDACAHWVSAFRSGICANFFWLGRSMCCVDSRECGEYYSWGEFFLG
RDNHVVAFVDFVMYVSFSTMAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAEVKTIVSGHHVKRYLGGWTLITKVVGMCFSTGS
GLTVGKEGPFVHIGACVGGII**SGALPSYQQEAKERE**LITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFALEDVSTSYNFKA
LMAALICGVTAVLLQSRVDLWHTGRIVQFSVNYQHNWHFFELPMFAAIGCFGGFMGSTFSVVNLHVGRWRKKHLR
QWRIVEVAVVAAVTGVVNFLTPYGSGSMLELLGDCFQDCTPNGTIEMCEDGDMRAFFSLLVTATAKFAMFAYTVG
TFLPAGILVPSLTIGALYGRAFGMTFRALQETYASSYIFTECYDQDLCVIPGVYAIVGAAAMLTGVTHMTICLAI
IMFELTGSLEYMVPVIVGILCAKAAGEAVGVKGTYEIGIEENKLPYLDPKKEFYLDFVAKNVCGNKQFTVLTAYG
LQVRDINELVTKMNVTGFPVVESPSDMTLLGYAPAKKIVRALQVAAARNSDMNLNTHIRFKTTPSHSRDATFLEV
DLTDILESCLLQVEPECSVKKLLYLFKSLGTHHIFVCRYSKFEGFISKKDFINFMRVKEREENMEDDELERERRE
RVRQGRHHEAATAAVDVAPVAARYN

Alineamientos realizados en TritypDB de la secuencia de la proteína LbClC-A reportada en el Genbank (número de acceso: **ALG38030.1**) frente a las secuencias codificantes reportadas en TritypDB para *L. (L.) tropica*, muestran una proteína homologa (LTRL590_010006800). La secuencia en **negrilla** muestra la secuencia peptídica contra la que está dirigida el anticuerpo, las letras **subrayadas** representan las variaciones con respecto a la secuencia de *L. (V.) braziliensis* (SGAFPSYQQETKERE). (http://tritrypdb.org/tritrypdb/).

F. Anexo F: Alineamientos con secuencias de referencia (*Genbank*) del gen HSP70, de las cepas de *L. donovani, L. major, L. aethiopica y L. tropica,* para la determinación de la especie de *Leishmania.*

```
171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1      -----------AAAACATGAGCCAGAAGAAGGT----GCATGGCTGCTTTGCGCTAGGTAG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1      AGGCAGGACATGCAGC-----------AGAGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
JX312712.1                         ---------------------------------GCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
HF586346.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
HF586345.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395023.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395024.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395022.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
HF586347.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395025.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395021.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCCGGC-CTGG--AG
HF586348.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395026.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395020.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395019.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
FN395018.1                         -----CGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGC-CTGG--AG
                                    *** *  ***  ** ** *  **

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1      GTGCTGCGCATGAGCAAGGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1      GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
JX312712.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
HF586346.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCAGCGGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAGGGC
HF586345.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCAGCGGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAGGGC
FN395023.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCAGCGGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAGGGC
FN395024.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCAGCGGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAGGGC
FN395022.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCAGCGGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAGGGC
HF586347.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
FN395025.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
FN395021.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
HF586348.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
FN395026.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
FN395020.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
FN395019.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
FN395018.1                         GTGCTGCGCATCATCAACGAGCCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGC
                     *********** * *** *********** ***************** ************

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1      GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1      GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
JX312712.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
HF586346.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTG
HF586345.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTG
FN395023.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTG
FN395024.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTG
FN395022.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTG
HF586347.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
FN395025.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
FN395021.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
HF586348.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
FN395026.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
FN395020.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
FN395019.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
FN395018.1                         GACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTCGATGTG
                     ******************************************************** ******

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1      ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1      ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
JX312712.1                         ACGCTGTTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACGCAC
HF586346.1                         ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGATACACAC
HF586345.1                         ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGATACACAC
FN395023.1                         ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGATACACAC
```

```
FN395024.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGATACACAC
FN395022.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGATACACAC
HF586347.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
FN395025.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
FN395021.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
HF586348.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
FN395026.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
FN395020.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
FN395019.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
FN395018.1                      ACGCTGGTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACACAC
                        ****** ********************************************** ** ***

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1   CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
JX312712.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
HF586346.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
HF586345.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395023.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395024.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395022.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
HF586347.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395025.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395021.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
HF586348.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395026.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395020.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395019.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
FN395018.1                      CTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGC
                        ****************************************************************

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1   AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
JX312712.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
HF586346.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
HF586345.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395023.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395024.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395022.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
HF586347.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395025.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395021.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
HF586348.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395026.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395020.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395019.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
FN395018.1                      AAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCG
                        ****************************************************************

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1   TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
JX312712.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
HF586346.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
HF586345.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395023.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395024.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395022.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
HF586347.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395025.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395021.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
HF586348.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395026.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395020.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395019.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
FN395018.1                      TGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCG
                        ****************************************************************

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1   CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
JX312712.1                      TTGTTCGAGAACGTTGACTTACAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
HF586346.1                      CTGTTCGAGAACATTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
HF586345.1                      CTGTTCGAGAACATTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395023.1                      CTGTTCGAGAACATTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395024.1                      CTGTTCGAGAACATTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395022.1                      CTGTTCGAGAACATTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
HF586347.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395025.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395021.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
HF586348.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395026.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395020.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395019.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
FN395018.1                      CTGTTCGAGAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGC
                        *********** ******* ***************************************

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1   GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
JX312712.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
HF586346.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
HF586345.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395023.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395024.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395022.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
HF586347.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395025.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395021.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
HF586348.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395026.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395020.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395019.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
FN395018.1                      GGCGACCTGTTCCGCAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATG
                        ****************************************************************

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
JX312712.1                      GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
HF586346.1                      GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
HF586345.1                      GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395023.1                      GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395024.1                      GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395022.1                      GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
```

```
HF586347.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395025.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395021.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
HF586348.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395026.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395020.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395019.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
FN395018.1                          GACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTG
                   ************************************************************

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1       CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1       CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
JX312712.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
HF586346.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
HF586345.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395023.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395024.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395022.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
HF586347.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395025.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395021.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
HF586348.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395026.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395020.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTAAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395019.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
FN395018.1                          CAGTCCCTCGTGTCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGAC
                   ************************************** *********************

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1       GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1       GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
JX312712.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
HF586346.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
HF586345.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395023.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395024.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395022.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
HF586347.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395025.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395021.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
HF586348.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395026.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395020.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395019.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
FN395018.1                          GAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCCTTCATCCTGACGGGCGGCAAGAGCAAG
                   ******************** ***************************************
```

SNP solo presente en *L. tropica*

```
171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1       CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1       CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
JX312712.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
HF586346.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
HF586345.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
FN395023.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
FN395024.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
FN395022.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
HF586347.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
FN395025.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
FN395021.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACGGCC
HF586348.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
FN395026.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
FN395020.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
FN395019.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
FN395018.1                          CAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCGCTGACGCTGGGCATCGAGACAGCC
                   ********************************** ********************** ***

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1       GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1       GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
JX312712.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
HF586346.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
HF586345.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395023.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395024.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395022.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
HF586347.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395025.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395021.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
HF586348.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395026.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395020.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395019.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
FN395018.1                          GGCGGCGTGATGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCAAGAAGAGCCAG
                   ***************************************** *****************

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1       ATCTTCTCAACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAA
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1       ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
JX312712.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
HF586346.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
HF586345.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395023.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395024.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395022.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
HF586347.1                          ATCTTCTCAACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395025.1                          ATCTTCTCAACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395021.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
HF586348.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395026.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395020.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395019.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
FN395018.1                          ATCTTCTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGAG
                   ******** ***********************************************************

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1       CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCCGGGCATCCCGC
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1       CGCGCGATGACGAAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
JX312712.1                          CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
HF586346.1                          CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
HF586345.1                          CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395023.1                          CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395024.1                          CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395022.1                          CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
```

```
HF586347.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395025.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395021.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
HF586348.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395026.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395020.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395019.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
FN395018.1                      CGCGCGATGACG-AAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCGACCTGTCC-GGCATCCCGC
                   ************ ************************************ **********

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   CGGCGCCGCGCGGCGTTACCGCAGATCGAGGTTGACGTTCGACCT-GGACGCAAACCGCA
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAAATCGGAGGTGACGTTCGACCTGGGACGCAAACGGCA
JX312712.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
HF586346.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
HF586345.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395023.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395024.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395022.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
HF586347.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395025.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395021.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
HF586348.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395026.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395020.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395019.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
FN395018.1                      CGGCGCCGCGCGGCG-TACCGCAGATCGAGG-TGACGTTCGACCT-GGACGCAAACGGCA
                   ************ * * ***** ****  * ************* ****** *** ***

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   TCCTGAAACGTGTTCG-CGGAAGGAG-AAGGCCACC-GGCGAGCGCAAACCAGATCACCA
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   TCCTG-AACGTGTCCGCCGGAAGGAGAAAGGGCACCGGGCAAGCGCAACCAGGATCACCA
JX312712.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
HF586346.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
HF586345.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395023.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395024.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395022.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
HF586347.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395025.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395021.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
HF586348.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395026.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395020.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395019.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
FN395018.1                      TCCTG-AACGTGTCCG-CGGA-GGAG-AAGGGCACC-GGCAAGCGCAA-CCAGATCACCA
                   ***** ******* ** **** **** **** **** *** ******* *  ********

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1   TCAACAACGAACAGGGGCCGGGTTGAACCAAGGACGATAATCGAGCCTCATGGTTCAAAC
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   TCACCAACGAAAAGGGGCC-GGCTGAAACAAGGAACAAAATCCAACGCCATGGTG-GAAC
JX312712.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
HF586346.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
HF586345.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395023.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395024.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395022.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
HF586347.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395025.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395021.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
HF586348.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395026.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395020.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395019.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
FN395018.1                      TCACCAACG-ACAAGGGCC-GGCTGAG-CAAGGACGA-GATCGAGCG-CATGGT--GAAC
                   *** ***** * * ***** ** ***  ******  *  *** * *  ******   ***

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   GACGCCGATGAAGTTACCGA-GGAGGGGACGAACCAGGCCCCCTCGCCGCCCCCGGTGGA
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1   GACGCCGATGAAATTTCCGAGGGAGGAACGAACAAGGCTCCACCGCCAACCCCGCGTTGGA
JX312712.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGGGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
HF586346.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
HF586345.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395023.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395024.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395022.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
HF586347.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395025.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395021.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
HF586348.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395026.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395020.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395019.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
FN395018.1                      GACG-CGATGAAGT--ACGA-GGAGG-ACG-ACAAGGCC-CAGCGCGACCCGCGTGG----
                   **** ******* *   *** ** ** *** **  ***  *  ***   * ** *

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   AGGCGAAGAAACCGCCCTGGGAAAAACTACGCCGTAACT-CGAATAA--GAAAACAGCCG
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1   AGGCCAAAAAACCGGCCCGGGAGAAACTACCCGTTACTCCCATGAAAGAAACA----CG
JX312712.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
HF586346.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
HF586345.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395023.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395024.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395022.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
HF586347.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395025.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395021.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTAAGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
HF586348.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395026.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395020.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395019.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
FN395018.1                      AGGCAAAGAA--CGGCCTGG--AGAACTACGC--GTACT-CGATGAA--GAACA----CG
                   **** ** **  ** ** **    *****  *    *** * *  **   ** *    **

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   TTAAGCGGACCTCAAAAATTGTTCCGCGGGAAGCCTGGGAGAAAATGG--CAGAAA--GG
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1   CTCCACCGAACTCCAAAAAGTGTTCCGGGCAAAACTTGGGAAAAATAGGCCCACAAAGGG
JX312712.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGACGATAG--CGACAA--GG
HF586346.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGACGATAG--CGACAA--GG
HF586345.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGACGATAG--CGACAA--GG
FN395023.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGACGATAG--CGACAA--GG
FN395024.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGACGATAG--CGACAA--GG
FN395022.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGACGATAG--CGACAA--GG
HF586347.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGATAG--CGACAA--GG
FN395025.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGATAG--CGACAA--GG
```

```
FN395021.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGGATAG--CGACAA--GG
HF586348.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGGATGG--CGACAA--GG
FN395026.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGGATGG--CGACAA--GG
FN395020.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGGATAG--CGACAA--GG
FN395019.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGGATAG--CGACAA--GG
FN395018.1                      CTCAGCG--ACTCGAA----CGTGTCCGGCAAGCT----GGAAGGATAG--CGACAA--GG
                  *   *    *** **      *    ** **        *  ** *  *   **  **

171106-073 I22 1 Hsp70 Fw.ab1   ACGCACCCTCTTTAAAACCGGGGAATTTCCC---------------TT------------
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   CCCCCCTTT------AAAAAAAGAG-----------------------GAAAACCACCCT
JX312712.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGACGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
HF586346.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGCGGCGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
HF586345.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGCGGCGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395023.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGCGGCGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395024.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGCGGCGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395022.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGCGGCGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
HF586347.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395025.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395021.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
HF586348.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395026.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395020.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395019.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
FN395018.1                      CCACGCT--------GAACAAGGAGATCGACGTGGTGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCA
                                 * * *          *     **

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   ------------------------------------------------------------
171106-073_M22_2_Hsp70_Fw.ab1   G-----------------------------------------------------------
JX312712.1                      GGAGGCGACGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGC-----------
HF586346.1                      GGAGGCGACGAAGGAGGAGTACGAGCACAGGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
HF586345.1                      GGAGGCGACGAAGGAGGAGTACGAGCACAGGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395023.1                      GGAGGCGACGAAGGAGGAGTACGAGCACAGGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395024.1                      GGAGGCGACGAAGGAGGAGTACGAGCACAGGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395022.1                      GGAGGCGACGAAGGAGGAGTACGAGCACAGGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
HF586347.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395025.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395021.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
HF586348.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395026.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395020.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395019.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC
FN395018.1                      GGAGGCGGCGAAGGAGGAGTACGAGCACAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCC

171106-073_I22_1_Hsp70_Fw.ab1   ------------ (query)
171106-073 M22 2 Hsp70 Fw.ab1   ------------ (query)
JX312712.1                      ------------ (L.donovani)
HF586346.1                      GATCATGACCAA (L. major)
HF586345.1                      GATCATGACCAA (L. major)
FN395023.1                      GATCATGACCAA (L.major)
FN395024.1                      GATCATGACCAA (L.major)
FN395022.1                      GATCATGACCAA (L.major)
HF586347.1                      GATCATGACCAA (L.tropica)
FN395025.1                      GATCATGACCAA (L.tropica)
FN395021.1                      GATCATGACCAA (L.aethiopica)
HF586348.1                      GATCATGACCAA (L.tropica)
FN395026.1                      GATCATGACCAA (L.tropica)
FN395020.1                      GATCATGACCAA (L.aethiopica)
FN395019.1                      GATCATGACCAA (L.aethiopica)
FN395018.1                      GATCATGACCAA (L.aethiopica)
```

Bibliografía

1. OMS, *Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis*, 2010.
2. Frézard, F., C. Demicheli, and R.R. Ribeiro, *Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs.* Molecules, 2009. **14**(7): p. 2317-2336.
3. Haldar, A.K., P. Sen, and S. Roy, *Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions.* Molecular biology international, 2011. **2011**.
4. Croft, S.L., *Monitoring drug resistance in leishmaniasis.* Tropical medicine & international health, 2001. **6**(11): p. 899-905.
5. Singh, S. and R. Sivakumar, *Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis.* Journal of infection and chemotherapy, 2004. **10**(6): p. 307-315.
6. Mishra, J., A. Saxena, and S. Singh, *Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future.* Current medicinal chemistry, 2007. **14**(10): p. 1153-1169.
7. Gluenz, E., M.L. Ginger, and P.G. McKean, *Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle.* Current opinion in microbiology, 2010. **13**(4): p. 473-479.
8. Ramírez, C.A., J.M. Requena, and C.J. Puerta, *Alpha tubulin genes from Leishmania braziliensis: genomic organization, gene structure and insights on their expression.* BMC genomics, 2013. **14**(1): p. 454.
9. Glaser, T.A., et al., *pH homeostasis in Leishmania donovani amastigotes and promastigotes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(20): p. 7602-6.
10. Antoine, J.C., et al., *Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH.* Infect Immun, 1990. **58**(3): p. 779-87.
11. Lukacs, G.L., O.D. Rotstein, and S. Grinstein, *Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ "leak".* J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24540-8.
12. Zilberstein, D. and M. Shapira, *The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites.* Annual Reviews in Microbiology, 1994. **48**(1): p. 449-470.
13. Handman, E., *Cell biology of Leishmania.* Advances in parasitology, 1999. **44**: p. 1-39.
14. Vieira, L. and Z.I. Cabantchik, *Bicarbonate ions and pH regulation of Leishmania major promastigotes.* FEBS Lett, 1995. **361**(1): p. 123-6.

15. Zilberstein, D. and D.M. Dwyer, *Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite Leishmania donovani.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(6): p. 1716-20.
16. Marchesini, N. and R. Docampo, *A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in Leishmania mexicana amazonensis.* Mol Biochem Parasitol, 2002. **119**(2): p. 225-36.
17. Lamb, F.S., J.G. Moreland, and F.J. Miller, Jr., *Electrophysiology of reactive oxygen production in signaling endosomes.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(6): p. 1335-47.
18. DiFranco, M., et al., *Incorporation of ion channels from the plasma membrane of Leishmania mexicana into planar bilayers.* Acta científica venezolana, 1995. **46**(3): p. 206.
19. Lagos ML, Moran O, and C. M, *Leishmania amazonensis: Anionic currents expressed in oocytes upon microinjection of mRNA from the parasite.* Experimental parasitology, 2007. **116**(2): p. 163-170.
20. Garzón, C., W. Stuhmer, and M. Camacho, *Corrientes aniónicas de Leishmania expresadas en ovocitos de Xenopus laevis luego de la inyección de mRNA.* Biomédica, 2009. **29**: p. 177-178.
21. Jentsch, T.J., *Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology.* The Journal of physiology, 2015. **593**(18): p. 4091-4109.
22. Miller, C., *In the beginning: a personal reminiscence on the origin and legacy of ClC-0, the 'Torpedo Cl− channel'.* The Journal of physiology, 2015. **593**(18): p. 4085-4090.
23. Camacho, M. and Y. Lozano, *¿ ESTÁN LOS CLC DE LEISHMANIA ASOCIADOS CON LA ADAPTACIÓN DEL PARÁSITO A CAMBIOS DE pH Y/O DE OSMOLARIDAD?* Acta Biológica Colombiana, 2016. **21**(1Supl): p. 265.
24. Echeverri, A.M., *Estudio de un mutante funcional de la proteína LbClCA de Leishmania braziliensis mediante electrofisiología*, 2015, Universidad Nacional de Colombía, Maestia en ciencias Bioquimica, Departamento de Quimica,Facultad de Ciencias.
25. Zapata Lesmes, A.C., *IMPACTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESION DE UN TRANSPORTADOR DE LA FAMILIA CLC SOBRE EL CICLO DE VIDA in vitro DE PARÁSITOS DEL GENERO Leishmania*, 2015, PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, FACULTAD DE CIENCIAS.
26. García Otálora, M.A., *Caracterización funcional de un canal de cloruro CLC de Leishmania*, 2016, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.
27. Lozano Jiménez, Y.Y., *Estudio de un canal de cloruro de leishmania y su importancia en la fisiología del parásito*, 2012, Universidad Nacional de Colombia.
28. Greene, J.R., et al., *The GEF1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth.* Molecular and General Genetics MGG, 1993. **241**(5): p. 542-553.
29. Viviescas Maldonado, M.A., *Estudio fisiológico de un transportador aniónico de Leishmania mediante complementación de una línea knock out de Saccharomyces cerevisiae*, 2014, Universidad Nacional de Colombia.
30. Rizo, S., *Localización y exploración funcional de la proteína LbCLC-A de Leishmania braziliensis.*, 2015, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

31. Salud, O.P.d.l., *Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas*, 2016, OPS Washingtón DD.
32. INS, G.d.E.T.p.v., *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Leishmaniasis.* 2014.
33. Goto, H. and J.A. Lindoso, *Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2010. **8**(4): p. 419-33.
34. Boecken, G., et al., *[Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany].* J Dtsch Dermatol Ges, 2011. **9 Suppl 8**: p. 1-51.
35. Zaghi, D., et al., *New World cutaneous leishmaniasis: current challenges in diagnosis and parenteral treatment.* J Am Acad Dermatol, 2011. **64**(3): p. 587-92.
36. Vannier-Santos, M.A., A. Martiny, and W. de Souza, *Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading.* Curr Pharm Des, 2002. **8**(4): p. 297-318.
37. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle.* International journal for parasitology, 2003. **33**(10): p. 1027-1034.
38. Santos, A., et al., *Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. Vol. 74. 2013: Springer Science & Business Media.
39. Claborn, D.M., *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*2014: inTech.
40. Sacks, D.L. and P.V. Perkins, *Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes.* Science, 1984. **223**(4643): p. 1417-9.
41. Zilberstein, D., *32. Adaptation of Leishmania species to an acidic environment.* Biochemical Protozoology As A Basis For Drug Design, 1991: p. 349.
42. Dostálová, A. and P. Volf, *Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview.* Parasites & vectors, 2012. **5**(1): p. 276.
43. Shapira, M., J.G. McEwen, and C.L. Jaffe, *Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in Leishmania.* EMBO J, 1988. **7**(9): p. 2895-901.
44. Glaser, T.A., et al., *pH homeostasis in Leishmania donovani amastigotes and promastigotes.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(20): p. 7602-7606.
45. Lukacs, G., O. Rotstein, and S. Grinstein, *Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H (+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+" leak".* Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(36): p. 24540-24548.
46. Gil, C., *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Vol. 60. 2017: Royal Society of Chemistry.
47. Van der Ploeg, L.H., S.H. Giannini, and C.R. Cantor, *Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa.* Science, 1985. **228**(4706): p. 1443-6.
48. Eperon, S. and D. McMahon-Pratt, *Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of Leishmania panamensis and L. braziliensis.* J Protozool, 1989. **36**(5): p. 502-10.
49. Teixeira, D.E., et al., *The cell biology of Leishmania: how to teach using animations.* PLoS Pathog, 2013. **9**(10): p. e1003594.
50. Ilg, T., D. Harbecke, and P. Overath, *The lysosomal gp63-related protein in Leishmania mexicana amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum.* FEBS letters, 1993. **327**(1): p. 103-107.
51. Mukkada, A.J., et al., *Enhanced metabolism of Leishmania donovani amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth.* Science, 1985. **229**(4718): p. 1099-1101.

52. Zilberstein, D., et al., *Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in Leishmania promastigotes.* Molecular and biochemical parasitology, 1991. **45**(1): p. 175-178.
53. Padan, E. and S. Schuldiner, *Intracellular pH and membrane potential as regulators in the prokaryotic cell.* Journal of Membrane Biology, 1987. **95**(3): p. 189-198.
54. Madshus, I.H., *Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells.* Biochemical Journal, 1988. **250**(1): p. 1.
55. Zilberstein, D., H.W. Sheppard, and D.M. Dwyer, *The plasma membrane H+-ATPase of Leishmania donovani promastigotes*, in *Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections*1987, Springer. p. 183-188.
56. Zilberstein, D. and D.M. Dwyer, *Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan Leishmania donovani.* Biochemical Journal, 1988. **256**(1): p. 13-21.
57. Zilberstein, D., H. Philosoph, and A. Gepstein, *Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of Leishmania donovani.* Molecular and biochemical parasitology, 1989. **36**(2): p. 109-117.
58. Vieira, L., et al., *The role of anions in pH regulation of Leishmania major promastigotes.* J Biol Chem, 1994. **269**(23): p. 16254-9.
59. Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik, *Ion channels in innate and adaptive immunity.* Annual review of immunology, 2015. **33**: p. 291-353.
60. Zheng, J. and M.C. Trudeau, *Handbook of ion channels*2015: CRC Press.
61. Jentsch, T.J., et al., *Molecular structure and physiological function of chloride channels.* Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 503-68.
62. Scheel, O., et al., *Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins.* Nature, 2005. **436**(7049): p. 424-427.
63. Dutzler, R., et al., *X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity.* Nature, 2002. **415**(6869): p. 287-294.
64. Jentsch, T.J., K. Steinmeyer, and G. Schwarz, *Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes.* Nature, 1990. **348**(6301): p. 510.
65. Friedrich, T., T. Breiderhoff, and T.J. Jentsch, *Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(2): p. 896-902.
66. Kornak, U., et al., *Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man.* Cell, 2001. **104**(2): p. 205-215.
67. Jentsch, T.J., *Chloride and the endosomal–lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters.* The Journal of physiology, 2007. **578**(3): p. 633-640.
68. Koch, M.C., et al., *The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia.* Science, 1992. **257**(5071): p. 797-800.
69. Steinmeyer, K., et al., *Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice.* Nature, 1991. **354**(6351): p. 304-308.
70. Thiemann, A., et al., *A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells.* Nature, 1992. **356**(6364): p. 57-60.
71. Gründer, S., et al., *Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume.* Nature, 1992. **360**(6406): p. 759-762.
72. Jordt, S.E. and T.J. Jentsch, *Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel.* The EMBO Journal, 1997. **16**(7): p. 1582-1592.

73. Bösl, M.R., et al., *Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell–cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl− channel disruption.* The EMBO journal, 2001. **20**(6): p. 1289-1299.
74. Kieferle, S., et al., *Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(15): p. 6943-6947.
75. Uchida, S., et al., *Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(6): p. 3821-3824.
76. Obermüller, N., et al., *The swelling-activated chloride channel ClC-2, the chloride channel ClC-3, and ClC-5, a chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulations of renal epithelial cells.* Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(3): p. 635.
77. Borsani, G., et al., *Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein.* Genomics, 1995. **27**(1): p. 131-141.
78. Jentsch, T.J., et al., *Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family.* The Journal of Physiology, 1995. **482**(P): p. 19S.
79. Weylandt, K.-H., et al., *Human ClC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(20): p. 17461-17467.
80. Kawasaki, M., et al., *Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells.* Neuron, 1994. **12**(3): p. 597-604.
81. Fisher, S.E., et al., *Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis).* Human Molecular Genetics, 1994. **3**: p. 2053-2059.
82. Steinmeyer, K., et al., *Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(52): p. 31172-31177.
83. Vandewalle, A., et al., *Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001. **280**(2): p. C373-C381.
84. Günther, W., et al., *ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(14): p. 8075-8080.
85. Novarino, G., et al., *Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis.* Science, 2010. **328**(5984): p. 1398-1401.
86. Jentsch, T.J., *CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology.* Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2008. **43**(1): p. 3-36.
87. Neagoe, I., et al., *The late endosomal ClC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression.* Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(28): p. 21689-21697.
88. Leisle, L., et al., *ClC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl−/1H+-exchanger and requires Ostm1 for transport activity.* The EMBO Journal, 2011. **30**(11): p. 2140-2152.

89. Jentsch, T.J., et al., *Physiological functions of CLC Cl− channels gleaned from human genetic disease and mouse models.* Annu. Rev. Physiol., 2005. **67**: p. 779-807.
90. Mohammad-Panah, R., et al., *The chloride channel ClC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(31): p. 29267-29277.
91. Schwake, M., T. Friedrich, and T.J. Jentsch, *An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl− channel mutated in Dent's disease.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(15): p. 12049-12054.
92. Kida, Y., et al., *Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant.* Histochemistry and cell biology, 2001. **115**(3): p. 189-194.
93. Graves, A.R., et al., *The Cl-/H+ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes.* Nature, 2008. **453**(7196): p. 788-792.
94. Lv, Q.-d., et al., *Cloning and molecular analyses of the Arabidopsis thaliana chloride channel gene family.* Plant Science, 2009. **176**(5): p. 650-661.
95. Iyer, R., et al., *A biological role for prokaryotic ClC chloride channels.* Nature, 2002. **419**(6908): p. 715-718.
96. Miyazaki, H., et al., *Molecular Cloning of CLC Chloride Channels inOreochromis Mossambicusand Their Functional Complementation of YeastCLCGene Mutant.* Biochemical and biophysical research communications, 1999. **255**(1): p. 175-181.
97. Huang, M.-E., J.-C. Chuat, and F. Galibert, *A voltage-gated chloride channel in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Journal of molecular biology, 1994. **242**(4): p. 595-598.
98. Salas-Casas, A., et al., *Identification and functional characterization of EhClC-A, an Entamoeba histolytica ClC chloride channel located at plasma membrane.* Molecular microbiology, 2006. **59**(4): p. 1249-1261.
99. Laban, A., et al., *Stable expression of the bacterial neo r gene in Leishmania enriettii.* 1990.
100. Gourbal, B., et al., *Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(30): p. 31010-31017.
101. Rochette, A., et al., *Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in Leishmania spp.* Molecular and biochemical parasitology, 2005. **140**(2): p. 205-220.
102. Atayde, V.D., E. Ullu, and N.G. Kolev, *A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem–loop RNA.* Molecular and biochemical parasitology, 2012. **184**(1): p. 55-58.
103. Ausubel, F.M., et al., *Short protocols in molecular biology. Hoboken*, 1999, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
104. Barak, E., et al., *Differentiation of Leishmania donovani in host-free system: analysis of signal perception and response.* Molecular and biochemical parasitology, 2005. **141**(1): p. 99-108.
105. Snyderman, R., et al., *Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774. 1.* The Journal of Immunology, 1977. **119**(6): p. 2060-2066.

106. Chang, K., *Human cutaneous lieshmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites.* Science, 1980. **209**(4462): p. 1240-1242.
107. da Silva, I.A., et al., *In Vitro Metacyclogenesis of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages.* BioMed research international, 2015. **2015**.
108. Zakai, H.A., M. Chance, and P. Bates, *In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana.* Parasitology, 1998. **116**(4): p. 305-309.
109. Muskus, C.E. and M.M. Villa, *Metaciclogénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania.* Biomedica, 2002. **22**(2): p. 167-77.
110. Späth, G.F. and S.M. Beverley, *A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation.* Experimental parasitology, 2001. **99**(2): p. 97-103.
111. Marcum, K. and C. Murdoch, *Salt tolerance of the coastal salt marsh grass, Sporobolus virginicus (L.) Kunth.* New Phytologist, 1992. **120**(2): p. 281-288.
112. Vanderberg, J. and R. Gwadz, *Malaria: Pathology, Vector Studies, and Culture, vol. 2*, 1980, Academic Press, New York.
113. Lloyd, J.B., *Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery.* Advanced drug delivery reviews, 2000. **41**(2): p. 189-200.
114. Lefurgey, A., et al., *Leishmania donovani amastigotes mobilize organic and inorganic osmolytes during regulatory volume decrease.* Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005. **52**(3): p. 277-289.
115. DARLING, H.N. and J. BLUM, *Changes in the Shape of Leishmania major Promastigotes in Response to Hexoses, Proline, and Hypo-osmotic Stress.* Journal of Eukaryotic Microbiology, 1990. **37**(4): p. 267-272.
116. !!! INVALID CITATION !!!
117. LeFurgey, A., P. Ingram, and J.J. Blum, *Compartmental responses to acute osmotic stress in Leishmania major result in rapid loss of Na+ and Cl−.* Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2001. **128**(2): p. 385-394.
118. Inbar, E., et al., *A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen Leishmania donovani regulates amino acid homoeostasis and osmotic stress responses.* Biochemical journal, 2013. **449**(2): p. 555-566.
119. Al-Bashir, N., M. Rassam, and B. Al-Rawi, *Axenic cultivation of amastigotes of Leishmania donovani and Leishmania major and their infectivity.* Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 1992. **86**(5): p. 487-502.
120. Balanco, J., et al., *Axenic cultivation and partial characterization of Leishmania braziliensis amastigote-like stages.* Parasitology, 1998. **116**(2): p. 103-113.
121. Bates, P., *Axenic culture of Leishmania amastigotes.* Parasitology Today, 1993. **9**(4): p. 143-146.
122. EPERON, S. and D. McMAHON-PRATT, *I. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of Leishmania panamensis and L. braziliensis.* Journal of Eukaryotic Microbiology, 1989. **36**(5): p. 502-510.
123. Moreira, D., et al., *Impact of continuous axenic cultivation in Leishmania infantum virulence.* PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(1): p. e1469.

124. Ali, K., et al., *Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to Leishmania mexicana.* Parasite immunology, 2013. **35**(12): p. 441-456.
125. Segovia, M., et al., *Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of Leishmania major promastigotes.* Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 1992. **86**(4): p. 347-354.
126. Cruz-Barrera, M.L., et al., *Improving Leishmania species identification in different types of samples from cutaneous lesions.* Journal of clinical microbiology, 2015. **53**(4): p. 1339-1341.
127. Garcia, L., et al., *Culture-independent species typing of neotropical Leishmania for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes.* Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(5): p. 2294-2297.
128. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle.* Int J Parasitol, 2003. **33**(10): p. 1027-34.
129. Bahrami, S., et al., *In vitro cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of Leishmania tropica.* Trop Biomed, 2011. **28**(2): p. 411-417.
130. Nasereddin, A., et al., *Characterization of Leishmania (Leishmania) tropica axenic amastigotes.* Acta tropica, 2010. **113**(1): p. 72-79.