

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTOS GENERALES DE MALARIA

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO DEL PARÁSITO.

La malaria es una enfermedad causada por protozoos del género *Plasmodium*, habiendo cinco especies que afecta a humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. Está expandida a nivel mundial, localizándose en áreas tropicales y regiones colindantes (Fig. 1). *P. falciparum*, la especie predominante en África, es la más mortífera. Se estima que en 2015 hubo 212 millones de casos de malaria y alrededor de 429 mil muertes (WHO, 2016c). Aproximadamente el 80% de los casos y el 90% de las muertes ocurren en el continente africano, siendo los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas los más afectados. La enfermedad de la malaria está altamente relacionada con la pobreza, presentando la mayor tasa de mortalidad en aquellos países con menos PIB, siendo las zonas rurales las más afectadas. El trabajo presentado en esta tesis está basado en *P. falciparum*, y por ello la información proporcionada en la introducción será referente a esta especie, a no ser que se especifique lo contrario.

El parásito que causa la malaria es transmitido de humano a humano a través de la picadura de más de 30 especies de mosquito del género *Anopheles*. Cuando un mosquito pica a una persona infectada, adquiere los gametocitos, las formas sexuales y transmisoras del parásito (Fig. 2). Dentro del mosquito tiene lugar el resto de la fase sexual del ciclo, dando lugar a la formación de esporozoitos, la forma infectiva del parásito. Estos serán transmitidos a otro huésped humano a través de una nueva picadura. Dentro del humano tiene lugar el ciclo asexual. Tras la picadura del insecto, los esporozoitos viajan al hígado, donde invaden los hepatocitos y se multiplican durante 6-7 días. *P. vivax* y *P. ovale* pueden desarrollar formas equiescentes, conocidas como hipnozoitos, que pueden despertar y desarrollar la enfermedad tras meses o incluso años de la infección primaria. Después de la maduración en el hígado y bajo la forma de merozoitos, los parásitos son liberados al torrente sanguíneo, donde invadirán los eritrocitos. En el caso de *P. vivax*, el protozoo invade en cambio las formas jóvenes de los eritrocitos: reticulocitos. Dentro del eritrocito, el parásito sufre una serie de transformaciones, evolucionando de un estado a otro y multiplicando su DNA: de la forma de anillo (la cual dura unas 20 horas) pasa a trofozoito y termina en esquizonte,

dando lugar a la formación de merozoitos independientes. Estos serán liberados tras la ruptura del eritrocito al torrente sanguíneo e invadirán nuevos eritrocitos.

Este ciclo intraeritrocítico dura 48 horas y es continuamente repetido, provocando la invasión y ruptura constante de eritrocitos. En infecciones de *P. malariae* el ciclo dura 72 horas, mientras que en *P. knowlesi* solo dura 24 horas. La ruptura de los eritrocitos, que libera productos tóxicos como óxido nítrico (NO), y otros procesos patológicos que ocurren durante el ciclo asexual, son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que suelen empezar con fiebre y escalofríos y pueden derivar a coma y muerte si el paciente no es tratado correctamente.

1.2 CONTROL Y ELIMINACIÓN DE LA MALARIA.

La malaria es una enfermedad prevenible y existen diferentes medidas con este fin, entre ellas:

(i) Control del vector (estrategias medioambientales), mediante el control de larvas, fumigaciones de grandes extensiones de terreno y secado de pantanos. Estas estrategias fueron muy eficaces para la eliminación de la malaria en territorio europeo y en Norte América; sin embargo, resulta más complicado aplicarlas en áreas tropicales.

(ii) Reducción del contacto entre el humano y el vector, utilizando herramientas como las mosquiteras, los repelentes tópicos o la fumigación de casas. Aunque menos complicadas que las estrategias medioambientales, estas técnicas pueden resultar difíciles de implementar entre la población en áreas endémicas. A día de hoy, las mosquiteras impregnadas con insecticida de larga duración son una de las herramientas más eficaces para la disminución de la incidencia de malaria.

(iii) Reducción de la carga parasitaria en humanos: diagnóstico y tratamiento. Diagnosticando y tratando al paciente, aparte de tratar la enfermedad, interrumpimos también la transmisión del parásito de un huésped a otro. En campañas de eliminación, la búsqueda activa de infecciones asintomáticas es clave para este fin. En algunas campañas, además, se trata a individuos posiblemente infectados, sin realizar diagnóstico previo. Se trata de campañas en las que se trata de eliminar el reservorio en una población en concreto, proporcionando el tratamiento a cada individuo (*Mass drug administration* - MDA).

A principios del siglo XX, la incidencia de malaria se extendía también por Europa y Norteamérica (Carter & Mendis, 2002). Campañas de eliminación a nivel regional a finales de los años 40 prepararon el terreno para la aplicación del Programa Global de Erradicación de la Malaria en 1955.

Esta campaña supuso la eliminación de la enfermedad al principio de los años 60 en Europa, Norteamérica, el Caribe y algunas partes de Asia y Sudamérica (Carter & Mendis, 2002). Sin embargo, no se logró el mismo éxito a nivel mundial y hacia el año 1972 las campañas de eliminación fueron abandonadas al considerarse imposible la erradicación de la enfermedad. Este hecho conllevó un aumento de la intensidad de la transmisión en algunas áreas. Después de unas décadas, a partir de los años 90, el interés por el control y la eliminación de la malaria fue reincorporado, con campañas activas como *The Roll Back Malaria initiative* (1998), los Objetivos del Milenio (2000) o la *Malaria Eradication Research Agenda* (malERA) (2007) (Alonso & Tanner, 2013). Gracias a estas iniciativas, en los últimos 20 años la incidencia de la malaria y su mortalidad han disminuido en un 37% y un 58% respectivamente. En 2015, las Naciones Unidas establecieron la Agenda para el Desarrollo Sostenible, donde declararon el objetivo de eliminar la epidemia de malaria para 2030.

A pesar del esfuerzo y los grandes logros conseguidos en las últimas décadas, la malaria continúa siendo un importante problema de salud pública, afectando a la mitad de la población mundial. En áreas de alta transmisión, las intervenciones de control están centradas en reducir la mortalidad y la morbilidad. En aquellas regiones donde se ha conseguido reducir la incidencia, el objetivo es ahora el de la eliminación, centrándose en bloquear la transmisión mediante detección del reservorio humano (infecciones asintomáticas). En aquellos países en los que no ha sido detectado ningún caso de malaria endémica en tres años consecutivos se considera que la enfermedad ha sido eliminada (WHO, 2017b).

1.3 RESISTENCIA A DROGAS.

Actualmente existe una amenaza para el control de la malaria y es la aparición de parásitos que presentan resistencia a los fármacos antimaláricos. La primera aparición documentada de resistencia a un antimalárico fue a quinina en 1844 (Elliotson, 1844). Sin embargo, la resistencia a fármacos no fue una amenaza real hasta 1970, con la aparición de la resistencia a cloroquina, la cual empezó en la región de *Greater Mekon* y se expandió por el resto del mundo (Sa et al, 2009). Así se implementó el uso de sulfadoxina-pirimetamina como tratamiento alternativo, pero pronto los parásitos desarrollaron también resistencia contra esta combinación de medicamentos. Debido a la expansión de parásitos resistentes a lo largo del continente africano, la incidencia de la malaria volvió a aumentar, con el consecuente incremento de la mortalidad infantil en esta región. Con el fin de combatir los parásitos resistentes, se empezaron a utilizar los derivados de artemisinina en Vietnam a principios de los 90, contribuyendo a reducir de nuevo la mortalidad por malaria en la región (Schuftan, 2000). Actualmente, las terapias de combinación de derivados de artemisinina

(conocidos como ACT por su nombre en inglés) son el tratamiento de primera línea recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2016c).

Sin embargo, en 2002, los primeros casos de retraso en la eliminación de parásitos del organismo aparecieron en la frontera entre Tailandia y Camboya, lo que fue indicativo de desarrollo de resistencia a derivados de artemisininas (Dondorp et al, 2009; WHO, 2010) (Fig. 4). Más adelante, se asoció este mecanismo con la presencia de mutaciones en el gen K13 (Ariey et al, 2014; Witkowski et al, 2013). Los parásitos resistentes a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina aparecieron también en esta región y se extendieron al resto de continentes. Por ello, se espera que el mismo patrón ocurra con este mecanismo y la resistencia a derivados de artemisininas. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la resistencia a artemisininas en África podría aparecer de forma independiente y a través de mecanismos diferentes, siendo una constante amenaza para los programas de eliminación y control de la zona (St Laurent et al, 2015; Yang et al, 2017).

2. ADAPTACIÓN DE LOS PARÁSITOS AL AMBIENTE Y REGULACIÓN

EPIGENÉTICA

P. falciparum es un parásito intracelular obligado. El interior del eritrocito, donde habita mayoritariamente durante su paso por el ser humano, supone un medio relativamente estable. Sin embargo, el parásito aún debe adaptarse a algunos factores cambiantes entre huésped y huésped, como la concentración de nutrientes, los episodios de fiebre o el sistema inmune (Mackinnon & Marsh, 2010). Los parásitos de la malaria, al igual que el resto de organismos, tienen sus propias estrategias para adaptarse a estos cambios, entre las cuales la regulación epigenética juega un papel importante.

2.1 MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A CAMBIOS EN EL AMBIENTE.

Los mecanismos de adaptación pueden ser clasificados en: (i) Mutaciones genéticas. Se trata de un proceso lento en el que mutaciones espontáneas e independientes en el ADN son seleccionadas y

transmitidas de generación en generación, confiriendo una ventaja sobre el resto de los individuos de una población. (ii) Variación epigenética. Este mecanismo también es transmisible, pero no depende de la secuencia básica del ADN, si no del estado transcripcional de los genes, el cual varía de activo a reprimido de manera estocástica y se transmite a la siguiente generación mediante la memoria epigenética. Este mecanismo es más rápido y es reversible, permitiendo adaptarse al organismo de forma mucho más maleable a ambientes cambiantes. (iii) Respuesta transcripcional directa. Esta estrategia consiste en la detección de un estímulo y la consiguiente reacción de adaptación al mismo tras el cambio transcripcional de ciertos genes. A diferencia de los otros dos, este es un mecanismo transitorio y no transmisible.

Dentro de las adaptaciones por variación epigenética, existe una estrategia conocida como ***bet-hedging*** (“cubrir la apuesta”). Variaciones en el estado activo y reprimido de los genes implican la transcripción del mismo genoma en diferentes transcriptomas, proporcionando diversos fenotipos que aumentan la plasticidad de las poblaciones de parásitos y favorecen la supervivencia y la adaptación de los mismos. Así, en una población de parásitos genéticamente idénticos, aquellos que presenten la mejor combinación de genes activos y reprimidos sobrevivirán a las condiciones del ambiente dado. Estos parásitos transmitirán su patrón de expresión a la siguiente generación del ciclo asexual, funcionando como una dinámica de selección natural bajo condiciones fluctuantes (Fig. 6). El estado activo o silenciado de los genes cambia estocásticamente a baja frecuencia, previo a ningún cambio en el ambiente. El hecho de que este mecanismo de supervivencia no esté relacionado con ningún cambio a nivel de la secuencia de ADN lo convierte en un mecanismo rápido y reversible. Los ejemplos de genes más estudiados en *P. falciparum* que interviene en *bet-hedging* son *var* y *clag3*, que serán descritos más adelante.

2.2 REGULACIÓN EPIGENÉTICA.

Existe un variado rango de funciones biológicas que vienen reguladas a nivel epigenético: citoadhesión, invasión de eritrocitos, transformación sexual o permeabilidad de membrana, entre otras. La función mejor descrita en *P. falciparum* es la de variación antigénica, en la que interviene los genes de la familia *var*. Esta familia está formada por 60 miembros y codifican para *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1* (PfEMP1), proteínas que son expuestas en la membrana del eritrocito e intervienen en evasión del sistema inmune. Una población de parásitos genéticamente idénticos presentan una variedad de PfEMP1 y aquellos parásitos que expresan el *var* que logra escapar del sistema inmune, serán seleccionados y su patrón de expresión será transmitido a los

parásitos de la siguiente generación del ciclo asexual. De esta forma los parásitos se adaptan a cada huésped.

La regulación epigenética implica cambios a nivel de cromatina, determinando el estado activo o silenciado de los genes por la accesibilidad de los factores de transcripción. Así, cuando la cromatina se encuentra en un estado condensado (heterocromatina), resulta menos accesible, silenciando los genes implicados. Al contrario, en un estado abierto (eucromatina), los genes se encuentran accesibles para la transcripción. Las hebras de DNA se encuentran enrolladas en nucleosomas, los cuales están formados por subunidades de proteínas llamadas histonas. Estas histonas sufren modificaciones moleculares que determinan la accesibilidad de la cromatina. La mayoría de estas modificaciones consisten en acetilación y metilación del extremo amino-terminal de las histonas H3 y H4 (Crowley et al, 2011; Howitt et al, 2009; Jiang et al, 2010; Kafsack et al, 2014; Lopez-Rubio et al, 2007; Lopez-Rubio et al, 2009) (Fig. 7).

Existe un tercer estado de cromatina conocido como heterocromatina facultativa. En esta situación el estado activo o reprimido de los genes varía entre individuos de una misma población. Este estado es transmitido a las siguientes generaciones a través de un proceso conocido como memoria epigenética. Aun siendo heredable, el estado de la cromatina no es permanente: los genes que se encuentran silenciados pueden revertir su estado a activo y viceversa. Este proceso determina la **expresión clonal variante**, una propiedad que está presente en algunas familias de genes. La expresión clonal variante se da en una población de parásitos de mismo origen genético que usan sus genes de forma diferente en el mismo momento del ciclo. Esta propiedad permite a los parásitos presentar diferentes combinaciones de genes en estado activo o silenciado entre la población, confiriendo diferentes fenotipos, jugando un papel importante en la ya descrita estrategia de *bet-hedging*.

Algunos de los genes que presentan expresión clonal variante pertenecen a familias que además presentan expresión mutuamente exclusiva. Esta propiedad implica que sólo uno de los miembros de la familia está expresado en un momento dado. Los mecanismos moleculares que regulan este proceso no están del todo esclarecidos. Cabe señalar que para la activación de uno de los genes es necesario silenciar simultáneamente el resto. Hasta la fecha solo dos familias de genes presentando esta propiedad se han caracterizado: *var* y *clag3*.

3. GENES *clag3*

3.1 RHOPH1/CLAG.

El complejo proteico RhopH, el cual ha sido identificado en estudios de proteómica en merozoitos (Campbell et al, 1984; Holder et al, 1985), se localiza en los *rhoptris*, orgánulos especializados en el extremo apical del merozoito (Fig. 9). RhopH es un complejo de elevado peso molecular formado por tres proteínas (RhopH1, RhopH2, y RhopH3), las cuales son sintetizadas en esquizontes maduros y secretadas, junto con otros contenidos de los *rhoptris*, en el eritrocito a invadir. Cada uno de los tres miembros del complejo RhopH está conservado en todas las especies del género *Plasmodium* y ninguno de ellos tiene significativa homología con proteínas de otros parásitos del filo *Apicomplexa*, excepto por un dominio compartido con RON2 (un ligando invasivo localizado en los *rhoptris* de otros parásitos apicomplejos) (Anantharaman et al, 2007; Kaneko, 2007; Richard et al, 2010).

Mientras que RhopH2 y RhopH3 son proteínas codificadas por un único gen, RhopH1 está formado por la familia de genes *clag*, que contiene cinco miembros: *clag2*, *clag3.1*, *clag3.2*, *clag8* y *clag9* (Kaneko et al, 2001), cuya nomenclatura es acorde al cromosoma en el que están localizados. Los cinco genes presentan nueve exones y están localizados en la región subtelomérica, entre las últimas 150 kb del cromosoma. El análisis filogenético de cepas de parásitos adaptadas al laboratorio procedentes de diferentes continentes reveló que la familia *clag* fue dividida en dos grupos a comienzos del linaje de *Plasmodium* (Kaneko et al, 2005; Nguitrageol et al, 2011; Sharma et al, 2013). El primer grupo contiene un único miembro, *clag9* en *P. falciparum*. La expansión del segundo grupo es bastante variable en el género, siendo *P. falciparum* la especie que cuenta con más miembros: *clag2*, *clag3.1*, *clag3.2*, y *clag8* (Kaneko et al, 2005). Los miembros de este último grupo presentan dominios variantes, localizados en torno a los 1100 residuos a partir del extremo N-terminal de la proteína (Alexandre et al, 2011).

3.2 Parálogos del cromosoma 3: *clag3.1* y *clag3.2*.

clag3.1 y *clag3.2* son los miembros de la familia *clag* más similares entre ellos, pues comparten el 95% de la secuencia de ADN. *clag3.1* y *clag3.2* son genes vecinos, separados solos por 10kb por un gen *pseudovar*, y están localizados en el cromosoma 3, en una región entre 110 y 140 kb de la región subtelomérica. Debido a su localización, existen frecuentes eventos de recombinación, lo que induce que las diferentes áreas entre ambos genes sean además distintas entre cepas, aumentando su diversidad. El dominio más variable se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína, a unos 120 aminoácidos (Alexandre et al, 2011). Esta región será referida como **región hipervariable (HVR)**. Además, recombinaciones a nivel de cromosoma puede producir la formación de un único gen *clag3*

(Chung et al, 2007; Iriko et al, 2008), encontrando parásitos que presentan un solo *clag3* en lugar de dos parálogos. Este gen recombinante contiene el promotor de *clag3.2* y el 3' UTR de *clag3.1*.

Como se ha mencionado anteriormente, *clag3* presentan expresión clonal variante y mutuamente exclusiva: individuos de una población de parásitos genéticamente idénticos expresan uno u otro parálogo y transmiten este patrón a la siguiente generación del ciclo asexual (Cortes et al, 2007). Sin embargo, durante el progreso de esta tesis se han observado patrones de expresión que no corresponden con la regla de expresión mutuamente exclusiva establecida, como expresión de ninguno o de ambos genes al mismo tiempo en condiciones de presión selectiva (Rovira-Graells et al, 2015; Sharma et al, 2013). Aun así, la disrupción de la propiedad de expresión mutuamente exclusiva sólo ocurre de forma transitoria, pues el parásito recupera la expresión de un sólo promotor de *clag3* rápidamente tras eliminar la presión, siendo este el patrón de expresión en condiciones estándar. Este hecho indica que la expresión mutuamente exclusiva no es estricta pero está fuertemente favorecida.

Durante las últimas décadas se han propuesto diferentes roles para las proteínas CLAG y las relacionadas RhopH2 y RhopH3. A raíz de su descubrimiento se pensó que las proteínas CLAG intervienen en citoadherencia, de ahí su nombre (*cytoadherence link asexual gene*) (Barnes et al, 1994). Sin embargo, esta teoría no ha podido ser corroborada por otros grupos (Nacer et al, 2011). Así, si las proteínas CLAG desempeñan una función en citoadherencia queda todavía en entredicho. Otra propuesta para la función de las CLAG ha sido la invasión de eritrocitos, idea suscitada por su localización en los *rhoptis*, donde encontramos otros componentes que sí intervienen (Cooper et al, 1988; Coppel et al, 1987; Etzion et al, 1991; Gardiner et al, 2004; Kaneko et al, 2001). Recientemente, en el laboratorio de Sanjay Desai (NIH, Washington) se propuso por primera vez el rol de CLAG3 en la formación o regulación del canal transmembrana *Plasmodium surface anion channel* (PSAC) (Nguitragool et al, 2011). Este canal está situado en la membrana del eritrocito del huésped y es responsable del incremento de permeabilidad a diversos solutos en el eritrocito infectado (Kutner et al, 1985; Neame & Homewood, 1975; Overman, 1948). Con posterioridad, diferentes estudios han confirmado la participación de los genes *clag3* en la modulación de la permeabilidad de membrana, adquisición de nutrientes y selectividad de transporte (Nguitragool et al, 2011; Pillai et al, 2012; Sharma et al, 2013), apoyando la hipótesis de su participación en la formación de PSAC.

3.3 ROL DE *clag3* EN TRANSPORTE DE SOLUTOS: PSAC.

El nicho intraeritrocítico de los estadios asexuales de la malaria ofrece protección al parásito frente al sistema inmune del huésped (Hafalla et al, 2011). Sin embargo, al mismo tiempo existe una falta

de nutrientes dentro de la célula, algunos de los cuales son imprescindibles para la supervivencia del parásito. Debido a esto, el parásito necesita desarrollar un sistema de transporte y adquisición de nutrientes (Desai et al, 2000; Homewood & Neame, 1974; Kutner et al, 1982; Staines et al, 2007). Desde hace décadas se han descrito incrementos en la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos infectados hacia algunos solutos (azúcares, aminoácidos, purinas, vitaminas) (Elford et al, 1985; Ginsburg et al, 1985; Homewood & Neame, 1974; Overman, 1948). A estos sistemas de transporte los denominaron “nuevas rutas de permeación” (***new permeation pathways***) (**NPPs**) (Elford et al, 1985; Ginsburg et al, 1985; Saliba & Kirk, 2001).

La naturaleza de este canal o canales ha estado en discusión durante varios años. Mientras que algunos autores defendían la idea de diferentes canales codificados por el huésped humano y activados por el parásito (Bouyer et al, 2011; Staines et al, 2007; Winterberg et al, 2012), otros han propuesto la existencia de un único canal codificado por el parásito (Alkhalil et al, 2004; Baumeister et al, 2006; Desai et al, 2000; Kirk et al, 1994). Este canal es el denominado PSAC. Fue en 2011 cuando, gracias a estudios usando inhibidores químicos del canal, análisis de un cruce entre dos líneas de parásitos y experimentos con parásitos transfectados, se descubrió que las proteínas CLAG3.1 y CLAG3.2 intervienen en la formación del PSAC activo, esencial para el transporte de numerosos solutos en el eritrocito infectado (Nguitragool et al, 2011). El mismo grupo describió más tarde un dominio transmembrana en CLAG3, estando la HVR expuesta en la superficie de la misma (Nguitragool et al, 2014). De este modo se confirmó que PSAC es un canal codificado por el parásito, situado en la membrana del eritrocito infectado y que es responsable del transporte de un amplio espectro de solutos. Todavía no se ha conseguido definir con precisión la estructura y funcionalidad de PSAC; los genes *clag3* están relacionados con el canal, pero no se sabe claramente si las proteínas conforman el canal por sí solas o si necesitan de otras proteínas para la formación o regulación del mismo, como por ejemplo otros miembros de la familia *clag*. Un estudio reciente ha observado que para la formación de un canal activo es necesaria la transferencia de todo el complejo RhopH desde los rhoptries del merozoito al nuevo eritrocito infectado (Ito et al, 2017).

Entre los compuestos que cruzan la membrana del eritrocito hay también sustancias que presentan toxicidad para el parásito. La mayoría de fármacos antimaláricos tienen su acción en los estadios asexuales del parásito, teniendo que atravesar la membrana del eritrocito para alcanzarlo. Muchos de los fármacos pueden acceder a la célula por difusión a través de la membrana, pero otros requieren transporte facilitado. Se ha demostrado que los antibióticos fosmidomicina y blasticidina (BS) y la proteasa leupeptina (LEUP), entre otros compuestos antimaláricos, requieren de los NPP para llegar a la célula (Baumeister et al, 2011; Biagini et al, 2003; Hill et al, 2007; Lisk et al, 2008; Stead et al, 2001). Además, análisis computacionales sugieren que otros compuestos también requerirían transporte facilitado (Basore et al, 2015). Recientemente se ha demostrado además que

P. falciparum puede adquirir resistencia a BS y LEUP a través de alteraciones en la actividad del PSAC (Hill & Desai, 2010; Hill et al, 2007; Lisk et al, 2008). Estos parásitos mostraron también variación en la permeabilidad a otros compuestos que requieren PSAC para su acceso a la célula, como sorbitol y alanina. Estos resultados establecen que PSAC participa en la adquisición de algunos compuestos tóxicos, por lo que podría desempeñar un papel en el desarrollo de resistencia a fármacos mediante cambios en la permeabilidad del canal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los genes *clag3* codificados por el parásito, regulados a nivel epigenético y con expresión clonal variante, determinan la formación del principal canal para el transporte de solutos al eritrocito infectado (PSAC). Por lo tanto, nuestra hipótesis inicial es que los parásitos de *P. falciparum* pueden modificar la permeabilidad de la membrana a solutos específicos mediante la regulación epigenética de la expresión de los genes *clag3*. Este fenómeno puede ser relevante para la adaptación del parásito a las condiciones fluctuantes en el ambiente, como la presencia de compuestos tóxicos. De esta forma, los parásitos podrían desarrollar resistencia a los medicamentos antipalúdicos al alterar la permeabilidad de la membrana eritrocitaria.

Para explorar esta hipótesis, el objetivo general de esta tesis es caracterizar los genes *clag3*, con particular interés en su regulación epigenética y su efecto sobre la permeabilidad de los eritrocitos infectados, con el fin de estudiar la importancia de este potencial mecanismo de resistencia a fármacos.

Los objetivos detallados de esta tesis doctoral son los siguientes:

Objetivo 1. Explorar el papel de los cambios en la expresión de *clag3* en la adquisición de resistencia al antibiótico BS.

Objetivo 2. Estudiar las dinámicas de expresión de *clag3* in infecciones humanas de *P. falciparum*, con especial interés en la propiedad de la expresión mutuamente exclusiva y su memoria epigenética después de pasar por etapas de transmisión.

Objetivo 3. Identificar las regiones polimórficas específicas de los genes *clag3* que determinan las propiedades de transporte.

Objetivo 4. Identificar fármacos susceptibles a fracaso terapéutico por resistencia del parásito a través de cambios epigenéticos en los genes *clag3*.

RESULTADOS

ARTÍCULO 1. CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN LOS GENES CLAG3 MEDIAN RESISTENCIA A BLASTICIDINA S EN PARÁSITOS DE LA MALARIA

En experimentos realizados en nuestro laboratorio antes del comienzo de esta tesis, se observó que la selección con BS de parásitos transfectados comportaba un cambio en el patrón de expresión de los genes *clag3*. Para estudiar si este fenómeno estaba relacionado con el desarrollo de resistencia al fármaco por parte de los parásitos, llevamos a cabo una serie de experimentos: selección de parásitos con diferentes concentraciones de BS, estudio de los patrones de expresión de *clag3* y análisis de la resistencia a BS.

Resistencia a BS está asociada a cambios en expresión de *clag3*.

Con el fin de determinar si cambios en la expresión de los genes *clag3* determinan resistencia a BS, seleccionamos parásitos de la línea 10G (un subclón de 3D7 que en condiciones normales expresan *clag3.2*), con diferentes concentraciones del fármaco, abarcando desde la IC₅₀ en 10G hasta tres veces más esta concentración (0.2, 0.3, 0.4 y 0.6 µg/mL). Al cabo de 3 y 6 semanas, los parásitos fueron recolectados para la extracción de ARN. Después de medir los niveles de expresión mediante qPCR observamos que los patrones de expresión en los parásitos mantenidos de forma paralela se mantuvieron estables; sin embargo, en cultivos seleccionados con 0.2, 0.3 y 0.4 µg/mL de BS (a partir de ahora 10G-0.2, 10G-0.3 y 10G-0.4, respectivamente) la mayoría de parásitos expresaban *clag3.1* en lugar de *clag3.2*. El ratio de expresión *clag3.1* vs *clag3.2* cambió en un rango de magnitud de 100. Estos resultados indican que, al menos en esta cepa, CLAG3.2 media la adquisición de BS de forma más eficiente que CLAG3.1. La selección de parásitos con 0.6 µg/mL BS (10G-0.6) resultó además en una reducción general de los niveles de expresión de ambos genes. Decidimos entonces aplicar a los parásitos seleccionados con 0.6 µg/mL una concentración que fuera 10 veces superior a la IC₅₀: 2 µg/mL. Estos parásitos no requirieron un proceso de adaptación adicional. El análisis mediante qPCR reveló que la expresión de los genes *clag3* fue prácticamente anulada en esta nueva línea (10G-0.6-2), siendo 40 veces menor que en el cultivo control.

En conjunto, estos resultados indican que el cambio de expresión de *clag3.2* a *clag3.1* limita la entrada de BS a baja concentración, mientras que la resistencia a concentraciones más elevadas requiere la reducción de expresión de ambos genes, lo que comprometería la formación del canal PSAC.

Estabilidad de los patrones de expresión de *clag3* en la ausencia de BS.

Con el fin de comprobar los patrones de expresión en las nuevas líneas, mantuvimos los cultivos en ausencia de droga por dos semanas y medimos los niveles de expresión de *clag3*. Los niveles de *clag3* en 10G-0.2, 10G-0.3 y 10G-0.4 no cambiaron, confirmando que la expresión de *clag3.1* es un patrón estable en condiciones de cultivo. Sin embargo, 10G-0.6 recuperó los niveles de expresión, indicando que la reducción de la expresión de *clag3* conlleva una desventaja para los parásitos. Esta idea viene reforzada por la observación de una tasa de invasión más reducida en las líneas que presentan niveles bajos de expresión de *clag3*.

Los patrones de expresión de *clag3* están asociados con cambios en la sensibilidad a BS.

Después comparamos el efecto de inhibición del crecimiento de BS en la línea original 10G y en las líneas creadas mediante selección con BS. Encontramos que la sensibilidad al fármaco disminuía a medida que aumentaba la concentración de fármaco usada para la selección. Los parásitos seleccionados con concentraciones de 0.2 a 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraron un modesto pero progresivo aumento de su IC_{50} . 10G-0.6 mostró una elevada resistencia y 10G-0.6-2 resultó ser prácticamente insensible al antibiótico, incluso a concentraciones muy elevadas del fármaco (siendo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la concentración testada más alta), indicando que la represión de la expresión de ambos genes bloquea la entrada de la droga en la célula.

Expresión de otros genes *clag* en parásitos seleccionados con BS.

La participación de otros genes *clag* en la formación del PSAC no ha sido determinada hasta la fecha. Analizamos la expresión de *clag2*, *clag8* and *clag9* en todas las líneas seleccionadas y sólo encontramos reducción en los niveles de expresión de *clag2*, aunque esta disminución no presentaba una correlación con las concentraciones de fármaco usadas para la selección. Además, *clag2*, al igual que *clag3.1* y *clag3.2*, presenta expresión variante clonal y se encuentra silenciado en 10G; así, podemos concluir que los niveles de expresión observados son en realidad niveles residuales. Para estudiar la posible asociación entre *clag2* y la resistencia a BS, seleccionamos con 0.3 y 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BS la línea 1.2B, que es isogénica a 10G pero que sí presenta expresión de *clag2* (Cortés et al., 2007; Rovira-Graells et al., 2012). No observamos diferencias en los niveles de expresión de *clag2* entre los cultivos seleccionados y el control. Así, debido a que los parásitos pueden desarrollar resistencia a BS sin variar los niveles de *clag2*, *clag8* y *clag9*, llegamos a la conclusión de que estos genes parecen no estar involucrados en el transporte de BS en eritrocitos infectado, al menos en parásitos con un origen genético de 3D7 y a concentraciones moderadas.

La resistencia a BS es paralela a resistencia a lisis por sorbitol.

El transporte de sorbitol en eritrocitos infectados, lo que resulta en la lisis de la célula, requiere la actividad del PSAC (Nguiragool et al, 2011; Wagner et al, 2003). Para comprobar que nuestras cepas resistentes a BS presentaban realmente el transporte a través de PSAC impedido, analizamos el nivel de lisis de eritrocitos en parásitos seleccionados con BS y en la línea control 10G tras el tratamiento con sorbitol al 5%. La proporción de parásitos resistentes a sorbitol fue baja en 10G-0.2 y 10G-0.3, pero fue del 14% en 10G-0.4, consistente con la presencia de parásitos altamente resistentes a BS en esta población. En 10G-0.6 y 10G-0.6-2 los niveles de resistencia a sorbitol fueron del y más del 70%, consistente con la significativa reducción en los niveles de expresión de *clag3*. Estos resultados confirman la defectuosa actividad de PSAC en estos parásitos y la relación entre resistencia a BS, expresión de *clag3*, NPPs y PSAC.

La resistencia a BS y los cambios en la expresión de *clag3* no están asociados con cambios a nivel genético.

El alto grado de similitud entre *clag3.1* y *clag3.2* (95%) puede resultar en recombinación de ambos genes. Para excluir la posibilidad de que los cambios en la expresión de *clag3* observados tras la selección con BS fuesen mediados a nivel genético mediante eventos de reestructuración en el *loci* de *clag3*, analizamos el ADN genómico de las líneas seleccionadas mediante amplificación del gen completo (*long PCR*), pero no encontramos diferencias en referencia a la línea control. También excluimos la posibilidad de pérdida de alguno de los genes analizando el número de copias del gen mediante qPCR (relativo a un gen esencial). Además, secuenciación (*next-generation sequencing*) de los genomas completos de la línea control 10G y dos de las líneas adaptadas (10G-0.2 y 10G-0.6) no reveló ninguna diferencia a nivel genético asociada con la selección a BS en el *loci* de *clag3* o de otros miembros de la familia. Estos resultados sugieren que cambios en la expresión de *clag3* asociados con resistencia a BS no están mediados por reestructuraciones a nivel genético o mutaciones en la secuencia de *clag3*. Considerando que la expresión de *clag3* está regulada a nivel epigenético (Comeaux et al, 2011; Crowley et al, 2011), concluimos que cambios epigenéticos en la expresión de *clag3*, y no mutaciones, son los responsables de la resistencia a BS en nuestras líneas adaptadas.

ARTÍCULO 2. EXPRESIÓN DE LOS GENES CON EXPRESIÓN CLONAL VARIANTE *CLAG3* EN INFECCIONES HUMANAS

A pesar de los estudios concluidos en la regulación de *clag3* y tras haberse demostrado que desempeñan roles de gran importancia biológica, como el transporte de nutrientes por el parásito, poco se sabe del papel que juegan en infecciones naturales. Por ello, realizamos un estudio en el que analizamos las dinámicas de expresión de *clag3* en parásitos provenientes de muestras de pacientes que presentaban malaria no complicada por *P. falciparum* que acudían a clínicas en Amberes (Bélgica) y en Gambia y en infecciones experimentales. Estos experimentos nos permitieron saber más sobre la naturaleza de estos genes, en cuanto a dinámicas de expresión y funcionalidad.

Los parásitos expresan predominantemente *clag3.2* en infecciones naturales de malaria.

De las 40 muestras recogidas en total entre pacientes de Bélgica y Gambia, con el fin de reducir la complejidad del análisis solo analizamos muestras que presentaban infecciones simples (un solo clon presente) o con un claro clon predominante. Aquellos aislados que presentaban un único gen *clag3*, producto de la recombinación de *clag3.1* y *clag3.2*, fueron también excluidos. De las 20 muestras restantes, secuenciamos la HVR de los dos genes para diseñar *primers* específicos para cada gen y aislado (debido a la gran similitud entre ambos genes y que sus zonas polimórficas son también distintas entre cepas) y los usamos para analizar expresión de *clag3* mediante qPCR. Todos los aislados mostraron expresión predominante de uno de los parálogos, consistente con la propiedad de expresión mutuamente exclusiva observada en los parásitos cultivados en el laboratorio (Comeaux et al, 2011; Cortes et al, 2007; Nguitragool et al, 2011; Pillai et al, 2012). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de los parásitos adaptados al laboratorio, los cuales presentan expresión predominante de *clag3.1* (Comeaux et al, 2011; Nguitragool et al, 2011), observamos expresión predominante de *clag3.2* en aislados de campo.

Adaptación de aislados de campo a condiciones de cultivo o a baja presión de droga está asociado con cambios en la expresión de *clag3* dependientes de aislado.

Dos de los aislados, P04 y P12, fueron mantenidos en condiciones de cultivo durante 17 y 13 semanas, respectivamente, con monitorización regular de la expresión de *clag3*. En el aislado P12 los parásitos que expresaban *clag3.2* fueron progresivamente reemplazados por parásitos que expresaban *clag3.1*. Por el contrario, en el aislado P04 la mayoría de parásitos mantuvieron la expresión de *clag3.2* a lo largo del experimento. Después, seleccionamos los mismos aislados con una concentración no letal de BS, la cual, al menos en parásitos de origen 3D7, selecciona individuos

que expresan *clag3.1* (Mira-Martinez et al, 2013). En esta situación, en el aislado P04 se seleccionaron rápidamente parásitos que expresaban *clag3.1* y tras 10 semanas de selección prácticamente desplazaron cualquier expresión de *clag3.2*. Sin embargo, BS tuvo el efecto contrario en el aislado P12, favoreciendo la supervivencia de aquellos parásitos que expresaban *clag3.2*; mientras condiciones normales de cultivo en este aislado resulta en selección de parásitos expresando *clag3.1*, esto no ocurrió en presencia de la droga. Estos resultados indican una ventaja selectiva conferida por la expresión de uno de los dos parálogos de *clag3* bajo diferentes condiciones, siendo específica de aislado y dependiendo probablemente de la secuencia de los genes *clag3*.

El análisis de las secuencias de CLAG3 identifica dominios específicos de parálogo.

Con el fin de obtener indicios de qué regiones de la secuencia determinan una ventaja de fenotipo conferida por la expresión de una u otra proteína, analizamos secuencias de CLAG3 accesibles en bases de datos públicas y las que obtuvimos de nuestros aislados P04 y P12. De este modo identificamos un dominio que era diferente entre CLAG3.1 y CLAG3.2 pero conservado en cada una de las proteínas entre todas las líneas analizadas. Esta región hidrofóbica, la cual probablemente corresponde a un péptido señal o a un dominio transmembrana, es un candidato para determinar propiedades generales de CLAG3 que, bajo condiciones normales de infección en humano, confiere una ventaja selectiva a parásitos expresando CLAG3.2. En otras posiciones, los polimorfismos no son específicos de parálogo; la misma secuencia puede ser encontrada tanto en CLAG3.1 como en CLAG3.2 en diferentes líneas, lo que probablemente se debe a los frecuentes eventos de recombinación que se dan entre ambos parálogos. Sin embargo, el análisis filogenético de las secuencias completas de CLAG3 confirmó que CLAG3.1 y CLAG3.2 quedan separadas en dos clados, como se había descrito previamente (Sharma et al, 2013). Por el contrario, análisis de la HVR no mostró una separación entre las secuencias correspondientes a CLAG3.1 y CLAG3.2, lo que indica que la secuencia HVR de CLAG3.1 puede ser tan similar a la HVR de CLAG3.2 como a la HVR de otro CLAG3.1 y viceversa. Las secuencias de HVR quedaron también separadas en dos clados, incluyendo cada uno secuencias tanto de un parálogo como de otro. Esta observación indica que probablemente algunas características fenotípicas, como la permeabilidad a BS que están asociadas a expresión de *clag3.1* en unos aislados y expresión de *clag3.2* en otros, dependen de polimorfismos en la HVR u otras posiciones donde los polimorfismos nos son específicos de parálogo.

Expresión de *clag3* en parásitos obtenidos de infecciones experimentales en humanos.

También analizamos patrones de expresión de *clag3* en parásitos provenientes de muestras de sangre tomadas de voluntarios que participaron en un estudio CHMI (por sus siglas en inglés *controlled human malaria infection*) (Gomez-Perez et al, 2015). En este estudio, esporozoitos

criopreservados provenientes de NF54 (una línea adaptada a laboratorio de la que proviene 3D7) fueron usados para la infección de sujetos sanos no expuestos previamente a malaria. En muestras recogidas de 6 voluntarios, en el momento de diagnóstico por microscopía (entre 12 y 15 días post-infección), observamos mayores niveles de *clag3.2* que de *clag3.1*, contrario al patrón típicamente observado en NF54 en condiciones de cultivo, que expresa casi exclusivamente *clag3.1*. Después readaptamos a condiciones de cultivo los parásitos obtenidos en dos de esas muestras. En ambos casos observamos un aumento progresivo en el ratio de niveles de *clag3.1* sobre *clag3.2*, reflejando selección de parásitos que expresan *clag3.1*. Estos resultados indican que la expresión de *clag3.1* confiere una ventaja adaptativa en condiciones de cultivo en parásitos de origen NF54.

Los patrones de expresión de *clag3* son reseteados durante los estadios de transmisión del parásito.

Los patrones de expresión de *clag3* observados en parásitos obtenidos de los voluntarios del CHMI pueden explicar dos escenarios diferentes pero no excluyentes: i) selección de parásitos que expresan *clag3.2* en condiciones de sangre humana; ii) reseteo de los patrones de expresión durante los estadios de transmisión del parásito. Para distinguir entre las dos posibilidades, analizamos la expresión de *clag3* en muestras de sangre tomadas 9 días después de la inyección de los esporozoítos en dos de los voluntarios. Considerando que el desarrollo del estadio hepático del parásito dura entre 6 y 7 días (Sauerwein et al, 2011), los parásitos tomados el día 9 han estado en sangre periférica durante sólo un ciclo de multiplicación. A pesar de esto, observamos niveles similares de expresión en ambos genes a día 9, un patrón similar al observado en el día del diagnóstico. Este resultado es inconsistente con un escenario de sólo selección de parásitos expresando *clag3.2* y apoya la idea de que los patrones de expresión de *clag3* son reseteados cuando el parásito atraviesa las fases de transmisión.

Niveles de transcripción de *clag2*, *clag8*, y *clag9* no mostraron diferencias significativas entre los diferentes aislados ni entre las diferentes condiciones.

También analizamos niveles de expresión de *clag2*, *clag8* y *clag9* en todas las muestras descritas en este estudio. Encontramos muy poca variación en los niveles de transcripción. Incluso *clag2*, que presenta expresión variante clonal, estaba expresado a niveles similares en todas las muestras.

ARTÍCULO 3. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIMALÁRICOS QUE REQUIEREN CLAG3 PARA SU INGRESO EN ERITROCITOS INFECTADOS POR *P. FALCIPARUM*

Después de haber estudiado el nuevo mecanismo de resistencia desde diferentes aspectos (patrones de expresión de *clag3* en cepas de laboratorio, en infecciones humanas, su comportamiento en condiciones de cultivo y bajo presión de BS, etc.), decidimos estudiar más a fondo el impacto que este mecanismo de resistencia puede tener en infecciones naturales. Debido a que BS es una droga que no se usa en el tratamiento contra la malaria, por su alta toxicidad en células humanas, consideramos oportuno explorar si existen otros compuestos que podrían verse afectados por este mecanismo, bien entre aquellos que se utilizan actualmente o entre aquellos compuestos que están todavía en procesos de investigación.

Los parásitos 10G-0.6-2 son una herramienta válida para investigar el transporte a través de PSAC que contiene CLAG3

Anteriormente demostramos que la línea de parásitos 10G-0.6-2, derivada de la línea 10G seleccionada con altas concentraciones de BS, muestra una expresión drásticamente reducida de los dos genes *clag3* (Mira-Martinez et al, 2013). Para demostrar que la línea 10G-0.6-2 es una herramienta válida para identificar fármacos que requieren CLAG3 para atravesar la membrana del eritrocito infectado, realizamos ensayos de inmunofluorescencia (IFA) usando anticuerpos anti-CLAG3 en líneas derivadas de 10G seleccionadas con diferentes concentraciones de BS, es decir, 10G (control), 10G-0.4, 10G-0.6 y 10G-0.6-2, que mostraron niveles aumentados de resistencia a BS (Mira-Martinez et al, 2013).

Mientras que el 100% de los parásitos en la línea control 10G expresa CLAG3, la expresión se reduce al 88% en 10G-0.4, 26.2% en 10G-0.6 y 2.4% en 10G-0.6-2, indicando que en cultivos 10G-0.6-2 la gran mayoría de los parásitos no expresan CLAG3 a niveles detectables. Al incluir en el análisis solo los esquizontes que expresan el marcador tardío AMA1, podemos determinar inequívocamente que la ausencia de señal de CLAG3 es atribuible al silenciamiento epigenético y no al estadio del parásito. Estos resultados muestran que la proporción de eritrocitos infectados que expresan CLAG3 (CLAG3.1 o CLAG3.2) se correlaciona negativamente con el nivel de BS y la resistencia al sorbitol en líneas seleccionadas por BS, de acuerdo con resultados previos (Mira-Martinez et al, 2013), demostrando que los parásitos 10G-06-2 son una herramienta apropiada para identificar compuestos que requieren CLAG3 para ingresar en la célula.

Los parásitos con transporte deficiente a través PSAC debido al silenciamiento de los genes *clag3* son resistentes a algunos compuestos antipalúdicos

Con el objetivo de identificar compuestos antipalúdicos y medicamentos que requieren el producto de genes *clag3* para un transporte eficiente a través de PSAC en la membrana de eritrocitos infectados, comparamos la IC₅₀ para DOXY, FOSMI, LEUP, LUM, PENTA, AZ, T3 y T16 entre 10G y 10G-0.6-2. Los parásitos 10G expresan predominantemente CLAG3.2, que en parásitos con historial genético de 3D7 determina transporte de BS más eficiente que CLAG3.1, mientras que la gran mayoría de los parásitos en la línea 10G-0.6-2 tienen silenciados ambos genes *clag3*, lo que determina un fenotipo deficiente de PSAC impermeable a compuestos estructuralmente diversos como BS, sorbitol y L-Alanina (aminoácido canónico) (Mira-Martinez et al, 2013). Las curvas de respuesta a fármacos para las líneas del parásito 10G y 10G-0.6-2 muestran que la sensibilidad de BS, LEUP, T3 y T16 era menor en cultivos 10G-0.6-2 que en 10G. Cultivos de 10G-0.6-2 mostraron un aumento de 3 veces en su IC₅₀ para T3 en comparación con cultivos 10G (IC₅₀ para 10G y 10G-0.6-2 fueron 25.48 vs 81.08nM) y un aumento de 2 veces en su IC₅₀ para T16 (9.96 vs 18.03nM respectivamente). Esto es comparable al aumento de 3,6 veces observado en la IC₅₀ para LEUP (2,9 frente a 10,6 µM) pero menor que el aumento de 7,7 veces para BS (0,5 frente a 3,88 µM en 10G frente a 10G-0,6-2). Estos resultados respaldan la idea de que los cambios epigenéticos en la expresión de *clag3* determinan la sensibilidad BS, LEUP, T3 y T16. Por otro lado, la IC₅₀ para DOXY, FOSMI, LUM, PENTA y AZI no fueron significativamente diferentes entre los parásitos 10G y 10G-0.6-2, lo que indica que estos compuestos no requieren la expresión de genes *clag3* para un transporte eficiente a través de la membrana

Selección de parásitos con DOXY, FOSMI, LEUP, BS, T3 y T16

Hemos demostrado previamente que en la línea 10G, la resistencia a BS a baja concentración se asoció con un cambio de la expresión de *clag3.2* a *clag3.1*. Aquí investigamos si los parásitos 10G también pueden adquirir resistencia a las concentraciones letales de DOXY, FOSMI, LEUP, T3 y T16 por cambios epigenéticos en la expresión de los genes *clag3*. Estos medicamentos se seleccionaron en base a nuestros experimentos previos de IC₅₀; seleccionamos fármacos con diferencias significativas de IC₅₀ entre los parásitos 10G y 10G-0.6-2 y dos fármacos (DOXY y FOSMI) sin diferencias significativas de IC₅₀ para probar adicionalmente si los experimentos de selección son una herramienta más sensible para detectar cambios en la expresión de *clag3*.

Para abordar esta cuestión, seleccionamos cultivos de 10G con concentraciones de drogas que van desde aproximadamente el IC₅₀ hasta el IC₈₀. Los parásitos se mantuvieron por un máximo de 14 semanas. Los cultivos seleccionados con BS (650 nM), que se usaron como control positivo, pasaron de la expresión predominante de *clag3.2* a *clag3.1* después de solo 3 semanas de selección de BS

consistente con resultados previos (Mira-Martinez et al, 2013). Por el contrario, los parásitos no seleccionados mantenidos en paralelo no revelaron un cambio importante. Cultivos de 10G y 3D7 seleccionados con T3 o T16 mostraron una disminución en los niveles de expresión de ambos genes *clag3* después de solo 2 semanas. Como se esperaba de este resultado, en cultivos 10G seleccionados con T3, la gran mayoría de los parásitos fueron negativos para la expresión de CLAG3 por IFA y resistentes a la lisis de sorbitol (datos no mostrados), similar a la línea 10G-0.6-2. Estos resultados son consistentes con los valores de IC₅₀ incrementados observados para estos fármacos en la línea 10G-0.6-2, y demuestran que la captación de T3 y T16 por eritrocitos infectados requiere CLAG3. Estos resultados también indican que la concentración de los fármacos utilizados para la selección es probablemente demasiado alta para permitir la adaptación mediante la expresión de un gen *clag3* específico.

Por otro lado, los cultivos seleccionados con FOSMI, DOXY y LEUP a diferentes concentraciones no mostraron alteraciones claras en la expresión de los genes *clag3* en comparación con los cultivos control, indicando que estos fármacos no requieren el producto de los genes *clag3* para cruzar la membrana de los eritrocitos infectados o que CLAG3.1 y CLAG3.2 tienen una eficacia similar para su transporte.

La línea de parásitos 10G-0.6-2 adquiere algunos compuestos a través de las NPP a pesar de sus niveles dramáticamente reducidos de expresión de CLAG3.

Teniendo en cuenta que estudios anteriores demostraron que la absorción de FOSMI o PENTA depende de las NPP (Baumeister et al, 2011; Stead et al, 2001) y que la absorción de otros compuestos como DOXY, LUM, AZI se prevé fuertemente que también requerirán NPPs (Basore et al, 2015), los resultados de los experimentos de selección con estos fármacos y especialmente la comparación de la IC₅₀ entre 10G y 10G-0.6-s fueron de alguna manera inesperados. Para probar la posibilidad de que el transporte de compuestos específicos a través de la membrana celular está activo en la línea 10G-0.6-2, a pesar de sus niveles reducidos de CLAG3, comparamos la captación de 5-ALA entre la línea 10G-0.6-2 y la línea parental 10G. Se ha observado previamente que 5-ALA ingresa a los RBC infectados mediante NPPs y que requiere componentes del complejo RhopH para su transporte, lo que sugiere que usa PSAC (Sherling et al, 2017). Observamos que todos los RBC infectados adquirieron 5-ALA en cultivos 10G y 10G-0.6-2, lo que indica que las proteínas CLAG3 no son esenciales para la adquisición de algunos compuestos específicos a través de PSAC. Este resultado sugiere que, en ausencia de CLAG3, otras proteínas pueden formar canales PSAC que son capaces de mediar en la captación de compuestos que requieren NPP, como 5-ALA, aunque estos canales no pueden mediar en la absorción normal de otros compuestos como BS, sorbitol, alanina, T3 o T16.

DISCUSIÓN

1. UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA RESISTENCIA A FÁRMACOS: REGULACIÓN EPIGENÉTICA

Como se ha mencionado en la introducción, los organismos pueden adaptarse a través de diferentes mecanismos a los cambios en el entorno: mutaciones genéticas, regulación epigenética y respuesta transcripcional directa. En *P. falciparum*, la adaptación a la presencia de drogas se debe principalmente a mutaciones genéticas. De hecho, todos los mecanismos de resistencia a antimaláricos descritos hasta la fecha se deben a mutaciones puntuales o reordenamientos a nivel genético. En este contexto, el nuevo mecanismo descrito en esta tesis es el primer ejemplo de mecanismo de resistencia a medicamentos en *P. falciparum* que no está relacionado con mutaciones genéticas.

Una diferencia significativa entre ambos tipos de mecanismos de adaptación es el tiempo requerido por el parásito para adaptarse a las nuevas condiciones. Mientras que para que una población de parásitos se vuelva resistente a un fármaco por mecanismos dependientes del ADN, una serie de eventos debe suceder (acumulación de mutaciones aisladas, reproducción, selección, transmisión), un mecanismo que se regula a nivel epigenético permite en una población de *P. falciparum* desarrollar resistencia en pocos ciclos de la fase asexual. Además, los cambios adaptativos regulados a nivel epigenético son reversibles, lo que permite que los parásitos se adapten rápidamente a diferentes condiciones ambientales.

El desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los parásitos está suponiendo un problema en las actuales campañas de eliminación. La exposición continua a fármacos selecciona parásitos que presentan un fenotipo resistente debido a mutaciones genéticas. Esta situación se da sobretodo en parásitos expuestos a bajas concentraciones del fármaco, por ejemplo en casos de tratamiento defectuoso, tratamientos no completados o administración masiva de medicamentos. Esta situación permite a los parásitos sobrevivir, adaptándose a la presencia del fármaco y transmitiendo el mecanismo de resistencia. La acumulación de mutaciones independientes responsables de diferentes mecanismos de resistencia a fármacos está dando lugar a la creación de parásitos que presentan resistencia a más de un fármaco a la vez, como a ambos fármacos de un ATC (por ejemplo, parásitos mutantes de K13 que presentan múltiples copias de *pfmdr1*, muestran resistencia a la combinación artesunato-mefloquina (Lim et al, 2009). De esta manera, con la exposición continua a medicamentos, estamos seleccionando *súper-parásitos* que serán más difíciles de combatir a lo largo del tiempo.

Hasta la fecha, solo se ha descrito la selección de parásitos que presentan resistencia a medicamentos debido a mutaciones. Sin embargo, sabiendo que la adaptación a través de mecanismos epigenéticos ocurre con más facilidad, deberíamos preguntarnos si la selección de fenotipos que determinan resistencia a fármacos a nivel epigenético puede ser un problema en un contexto de eliminación. La selección de patrones de expresión de genes *clag3* ocurre dentro de una sola infección (como ocurre en la selección de parásitos que expresan *clag3.2* en sangre humana). Como observamos en nuestros experimentos, la memoria epigenética se reinicia después de que el parásito pase por la fase sexual del ciclo, lo que significa que no hay transmisión del patrón de transcripción de *clag3* de un huésped a otro. Por lo tanto, en caso de que el mecanismo de resistencia a medicamentos descrito aquí sucediera en infecciones naturales, solo podríamos seleccionar parásitos resistentes en una misma infección, en el mismo individuo. Este hecho enfatiza la importancia de este mecanismo como un proceso rápido.

Sin embargo, incluso no siendo transmisible, no debemos subestimar la importancia de dicho mecanismo. Recientemente, un estudio describió un fenómeno comparable relacionado con la resistencia a atovacuona (Goodman et al, 2016), que está asociado a mutaciones en *cytb*. Los parásitos que presentan esta mutación no son capaces de continuar el ciclo en la fase sexual; por lo tanto, la mutación no se transmite a otros huéspedes humanos. A pesar de ser heredable pero no transmisible, este mecanismo es una cuestión de importancia: la mutación responsable del desarrollo del fenotipo resistente emerge rápidamente, con parásitos mutantes observados incluso en áreas de África sin antecedentes de exposición a atovacuona (Ingasia et al, 2015). Este hecho sugiere que las mutaciones de *cytb* pueden ocurrir durante la replicación asexual. De este modo, existe una selección rápida de alelos resistentes a atovacuona durante el régimen atovacuona-proguanil (Malarone®) (Cottrell et al, 2014; Goodman et al, 2016).

2. DINÁMICAS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *CLAG3*.

Como se ha explicado anteriormente, los genes *clag3* presentan expresión clonal variante. Si bien hemos observado un papel funcional para esta propiedad en experimentos de laboratorio al seleccionar parásitos con compuestos tóxicos, todavía no hemos encontrado un rol claro en infecciones naturales. Los parásitos provenientes de pacientes infectados expresaban *clag3.2*. Esto sugiere que en la sangre humana, los parásitos que expresan *clag3.2* se seleccionan al comienzo del ciclo intra-eritrocitario, ya que cuando son liberados del hígado hay una mezcla de parásitos que expresan tanto uno como el otro parálogo. Entonces, ¿cuál es la razón por la que existen dos parálogos?

En nuestro estudio con muestras de campo, la población de estudio fue muy limitada: pacientes con malaria no complicada. Entre la población estudiada no encontramos diferencias en la expresión de *clag3* entre adultos y niños, o entre pacientes que presentan una primera infección de malaria frente a aquellos con exposición repetitiva (que presentan diferentes niveles de inmunidad contra la malaria). Los parásitos procedentes de pacientes que habían estado expuestos a fármacos serían los más interesantes para nuestro estudio. En nuestros experimentos tratamos de analizar la expresión de *clag3* en este tipo de muestras; sin embargo, la maduración de estos parásitos no fue posible, impidiendo continuar con el análisis (datos no mostrados). Tampoco pudimos estudiar si existen diferencias según la condición nutricional, otra característica interesante para nuestras investigaciones. Los próximos estudios sobre la expresión de *clag3* en infecciones naturales deben incluir pacientes infectados con *P. falciparum* que presenten fenotipos variados, como severidad de la enfermedad, y descubrir el patrón fisiológico, tóxico, clínico, etc. que desencadena la selección de parásitos que expresan *clag3.1* en infecciones naturales.

Otra de las peculiaridades de *clag3* es que presentan expresión mutuamente exclusiva. Actualmente sabemos que esta propiedad no es completamente estricta (Mira-Martinez et al, 2013; Rovira-Graells et al, 2015; Sharma et al, 2013). Sin embargo, no expresar ninguno de los *clag3* o expresar ambos al mismo tiempo constituye un coste de eficacia biológica para el parásito. Esta característica también se ha observado en parásitos que presentan resistencia a los medicamentos a través de mutaciones genéticas. Algunos parásitos resistentes presentan mutaciones adicionales conocidas como mutaciones compensadoras. Si *P. falciparum* pudiera desarrollar resistencia a medicamentos en infecciones naturales mediante el silenciamiento de *clag3* (teniendo así alterado el transporte a través de PSAC), los parásitos necesitarían entonces una forma alternativa para la adquisición de nutrientes, como reforzar otras rutas ya existentes. Las mutaciones compensadoras podrían ser un mecanismo para lograr este fin. Así, seleccionaríamos parásitos con una combinación de mutaciones genéticas y una regulación epigenética específica. Otro procedimiento para compensar la falta de nutrientes podría ser la respuesta directa, aumentando la capacidad de una ruta ya existente o alterando el metabolismo del parásito para disminuir las necesidades nutricionales. Sin embargo, la posibilidad más plausible es que los parásitos que presentan resistencia a fármacos mediante el silenciamiento de *clag3* permanezcan en un estado latente, similar a lo que ocurre en parásitos que presentan resistencia a artemisininas. Los parásitos que no expresan *clag3* disminuirían así su tasa de metabolismo, reduciendo su necesidad de nutrientes y evitando la entrada de compuestos tóxicos al mismo tiempo. Algo similar se ha observado en parásitos con falta de isoleucina en el medio, un aminoácido esencial para *P. falciparum*. Los autores observaron que los parásitos respondieron a esta falta de nutrientes frenando su crecimiento, y este estado de latencia se invirtió con la re-suplementación del nutriente (Babbitt et al, 2012).

Todavía es necesario seguir investigando para llegar a una mejor comprensión de las dinámicas de expresión de *clag3* y su efecto en el transporte y la resistencia a los medicamentos. Una tarea pendiente sería imitar de forma más precisa las condiciones naturales en nuestros experimentos, ya que sabemos que variaciones de ciertos factores podrían influir en la expresión de los genes *clag3* y la viabilidad del parásito (Desai, 2013; Mancio-Silva et al, 2017). Los experimentos en el laboratorio podrían llevarse a cabo por ejemplo usando el PGIM, un RPMI modificado que contiene algunos de los nutrientes esenciales para el parásito en concentraciones fisiológicas (Pillai et al, 2012). Cultivar en este medio cepas de laboratorio que expresan *clag3.1* (3D7-ITM) y cepas que expresan *clag3.2* (10G) y la comparación de los efectos en la tasa de invasión y posibles cambios en el patrón de expresión de *clag3*, nos daría una idea de cómo la regulación de *clag3* se ve afectada por la concentración de nutrientes. También se debería continuar la investigación en la dinámica de expresión de *clag3* en infecciones naturales. Sin embargo, los estudios *clag3* en aislados de campo tienen una complicación singular: *clag3.1* y *clag3.2* son idénticos en un 95% a nivel de secuencia. Además, las áreas del gen que son diferentes entre ellos (HVR) también lo son entre los diversos aislados. Así, cuando estudiamos la dinámica de *clag3* en infecciones naturales en nuestro estudio, tuvimos que diseñar cebadores específicos para el análisis por qPCR. Por lo tanto, una tarea adicional para simplificar próximos estudios sería diseñar cebadores universales específicos para *clag3.1* y *clag3.2* (en curso). Las áreas conservadas que se encuentran en el extremo N-terminal (NtCR) parecen ser una buena opción para comenzar el diseño de estos cebadores estándar. Ahora que ya hemos confirmado que la expresión mutuamente exclusiva se cumple en infecciones naturales, con la implementación de cebadores universales también podríamos analizar muestras con multiplicidad de infección mayor que 2, para identificar más fácilmente un fenotipo que selecciona parásitos que expresan *clag3.1*. Por otro lado, para confirmar la existencia de parásitos que no expresan genes *clag3* en aislados de campo, podríamos realizar experimentos de IFA en parásitos procedentes de muestras de sangre de pacientes infectados tras la maduración de los parásitos. Mediante el análisis con qPCR detectamos la expresión del gen que está activo, pero no podemos detectar parásitos que tienen sus genes en un estado reprimido. De esta manera, incluso si este patrón de expresión es poco común, podríamos localizar parásitos que no presenten CLAG3 funcional y confirmar la existencia de este patrón en infecciones naturales.

3. PSAC: UN CANAL CODIFICADO POR EL PARÁSITO SITUADO EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO INFECTADO

Otra característica del mecanismo de resistencia a fármacos descrito en esta tesis es que implica un canal codificado por el parásito situado en la membrana del eritrocito humano (PSAC), el cual hasta ahora no ha estado involucrado en ningún otro mecanismo de resistencia. PSAC es un objeto de estudio atractivo, ya que es responsable del transporte de nutrientes al interior de la célula. Estudiar la posibilidad de bloquear el canal como un objetivo antimalárico encontrando un compuesto que bloquee el PSAC y que no sea tóxico para las células humanas, proporcionaría una innovadora herramienta antipalúdica. Algunos trabajos se han hecho con este propósito. En el laboratorio de Sanjay Desai (NIH, Washington) se realizó un cribado para detectar nuevos inhibidores de PSAC (Pillai et al, 2010). Los autores presentaron nuevos compuestos que interactúan directamente con uno o más sitios en el PSAC. Como concluyeron, por un lado, estos inhibidores pueden usarse como puntos de partida para el desarrollo de nuevos medicamentos antipalúdicos; por otro lado, estos compuestos son una buena herramienta para investigar el canal en sí.

PSAC presenta eficiencia de transporte específica para ciertos solutos, siendo capaz de discernir entre compuestos estructuralmente similares (Alkhalil et al, 2004; Cohn et al, 2003; Desai et al, 2000). En nuestros experimentos, llegamos a la conclusión de que esta eficiencia específica viene determinada por la HVR. Durante los experimentos de selección de parásitos con BS observamos que la membrana de los eritrocitos parece variar su permeabilidad a un compuesto específico de acuerdo con el parálogo de *clag3* que se expresa (siendo *clag3.1* el parálogo menos eficiente para el transporte de BS en parásitos 10G). Sin embargo, la presión con el mismo compuesto (BS) dio como resultado la selección de parásitos con diferentes patrones de expresión de *clag3* cuando trabajábamos con parásitos que presentan una base genética diferente, al menos para BS. Por ejemplo, en parásitos P04 observamos una selección de aquellos que expresan *clag3.1* después de aplicar la presión con BS, en consonancia con nuestros resultados previos con parásitos 10G; sin embargo, los parásitos de P12 siguieron expresando *clag3.2* bajo la selección de BS. Curiosamente, cuando llevamos a cabo el análisis filogenético de las regiones HVR de *clag3.1* y *clag3.2*, observamos que la presión con BS resultó en la selección de parásitos que expresan el parálogo *clag3* que comparte el mismo clado con 3D7-*clag3.1*, el seleccionado en nuestros experimentos anteriores con parásitos 10G (10G es un subclón de 3D7): 3D7-*clag3.1*, P04-*clag3.1* y P12-*clag3.2* están situados en el mismo clado del árbol filogenético de las secuencias de HVR (Figura 3 Mira-Martínez et al., 2017. Artículo 2). Estos resultados sugieren que la secuencia de HVR podría determinar la permeabilidad específica de soluto. Para seguir estudiando esta correlación, hoy en día se pueden realizar estudios utilizando la tecnología recientemente desarrollada de CRISPRcas9. El intercambio de secuencias de HVR entre ambos genes en líneas de parásitos ya estudiadas y los consiguientes experimentos de selección en las mismas condiciones nos darían más información sobre los factores determinantes de la preferencia de expresión de uno u otro parálogo ante la presencia de determinados solutos.

Los resultados de nuestros estudios con BS proporcionan una demostración de que *P. falciparum* puede desarrollar resistencia a fármacos por alteraciones transcripcionales transmitidas por mecanismos epigenéticos. BS es un antibiótico que no se utiliza clínicamente para tratar las infecciones de malaria debido a su alta toxicidad para las células humanas. Sin embargo, PSAC podría ser utilizado por otras drogas relevantes para el tratamiento antipalúdico. Por esta razón, investigamos si otros fármacos que están en uso o en desarrollo para el tratamiento de la malaria requieren el mismo canal de transporte (PSAC) y, por lo tanto, si están sujetos a un potencial fracaso terapéutico a través del mismo mecanismo. Para nuestros experimentos seleccionamos algunos compuestos para los que se espera un transporte facilitado a través de la membrana (Basore et al, 2015; Biagini et al, 2003; Le Roch et al, 2008). Entre estos, solo tres de ellos (T3, T16 y LEUP) y nuestro control positivo (BS) mostraron evidencia de requerir proteínas CLAG3 para alcanzar su diana. Para confirmar si los parásitos pueden volverse resistentes mediante la regulación de los genes *clag3*, llevamos a cabo más experimentos de selección. Los parásitos seleccionados con T3 y T16 redujeron los niveles de expresión de ambos *clag3* tras sólo tres semanas de selección. Ya hemos demostrado que la propiedad de expresión mutuamente exclusiva se puede interrumpir y, además, sospechamos que este patrón existe también en infecciones naturales, pudiendo seleccionarse en condiciones que favorezcan este fenotipo. Así, medicamentos que se vean afectados por este mecanismo de resistencia, podrían seleccionar parásitos con el fenotipo menos permeable al compuesto.

El transporte del resto de los fármacos que probamos no parece verse afectada por la represión de los genes *clag3*, incluso si sus propiedades físicas predijeron que requieren de un canal para entrar en la célula. Para tratar de averiguar una explicación a estos resultados, primero demostramos con experimentos IFA que la línea 10G-0.6-2 no presenta proteínas CLAG3 en la superficie del eritrocito, lo que demuestra que nuestra línea es una herramienta adecuada para probar la funcionalidad de CLAG3 (Mira-Martínez et al, en preparación) Sin embargo, existe la posibilidad de que otras proteínas participen en la formación o regulación del canal, como otros miembros de la familia *clag*. Estos fármacos podrían estar usando una ruta de transporte diferente no conformada por genes *clag3*, sino por *clag8* o *clag9* (10G-0.6-2 presenta *clag2* silenciado). Se sabe que el complejo RhopH está formado por RHOPH2, RHOPH3 y una de las proteínas CLAG (Kaneko et al, 2005). Una posibilidad sería que ambos el complejo y el canal estuviesen formados por otra proteína CLAG, definiendo un canal con diferentes propiedades (Fig. 18). Por lo tanto, incluso si hemos demostrado que nuestra línea de parásitos 10G-06-2 es válida para analizar parásitos con proteínas CLAG3 no funcionales, no podemos confirmar que estos fármacos no usen PSAC a menos que aseguremos que otras proteínas no están involucradas en la formación de un canal de PSAC funcional.

Con el fin de comprobar si otras proteínas están involucradas en la formación del PSAC, llevamos a cabo un experimento para probar la funcionalidad de PSAC en nuestra línea de parásitos usando ácido 5-aminolevulínico (5-ALA). Este compuesto es absorbido por eritrocitos infectados a través de PSAC (Beck et al, 2014; Sigala et al, 2015; Staines et al, 2004) y convertido a protoporfirina IX fluorescente (PPIX) (Sigala et al, 2015). Inesperadamente, observamos que 10G (expresión mayoritaria de *clag3.2*) y 10G-0.6-2 (ambos *clag3* silenciados) importaron 5-ALA al mismo nivel, lo que sugiere que otras proteínas, probablemente otros miembros de la familia CLAG, participan en la formación de PSAC. Una herramienta más adecuada para obtener evidencia de qué medicamentos requieren PSAC para alcanzar su diana sería las recién creadas líneas de parásito condicional para *rhop2* y *rhop3* (Counihan et al, 2017; Ito et al, 2017; Sherling et al, 2017). Utilizando estas líneas, los autores observaron que las proteínas RhopH2 y RhopH3 son necesarias para la formación de todo el complejo RhopH y un PSAC funcional. Por lo tanto, en ausencia de RhopH2 y RhopH3 no se puede formar PSAC, siendo estas líneas una herramienta excelente para determinar qué fármacos usan el PSAC para ingresar a la célula. Sin embargo, nuestra línea 10G-0.6-2 sigue siendo útil para investigar qué fármacos pueden verse afectados por cambios en la regulación epigenética de *clag3*, único mecanismo demostrado en esta familia de genes.

Los resultados de nuestros experimentos en 10G-0.6-2 sugieren que otros genes *clag* también podrían desempeñar un papel en la formación y/o regulación del canal. La posibilidad más plausible es que otros miembros de la familia *clag* participen en la formación de canales independientes, en los cuales CLAG3 no estarían involucrados (Fig. 19). Para estudiar la participación de otros genes *clag* en el transporte de soluto y la formación de PSAC, estudiamos niveles de transcripción de otros genes *clag* en nuestra línea 10G-0.6-2 (la cual presenta los genes *clag3* silenciados y no transporta BS (Mira-Martinez et al, 2013)). No observamos diferencias en la expresión de *clag2*, *clag8* o *clag9*.

Hasta la fecha, *clag2* es el único miembro de la familia *clag*, aparte de *clag3*, que ha sido propuesto en la formación del PSAC (Sharma et al, 2013). Contrario a nuestros resultados, en Sharma et al., 2013 los autores observaron una disminución de los niveles de *clag2* en una línea de parásitos que, de forma análoga a nuestra línea 10G-0.6-2, se creó mediante selección con BS y no expresa *clag3*. Los autores concluyeron que *clag2* también está involucrado en la formación o regulación de canales, participando en el mecanismo de resistencia a BS. Sin embargo, *clag2* presenta expresión clonalmente variante, como los genes *clag3* (Cortes et al, 2007). Los parásitos 10G no expresan *clag2*, por lo que nosotros no la misma observación en la línea 10G-0.6-2. Por ello, seleccionamos con BS parásitos 1.2B, una línea isogénica con 10G pero que tiene el gen *clag2* en estado activo (Cortes et al, 2007; Rovira-Graells et al, 2012). No observamos ninguna reducción en los niveles de expresión de *clag2* después de la selección con esta línea. Aun así, es posible que *clag2* presente diferentes propiedades dependiendo de la línea parasitaria y su historial genético, como lo hacen

los genes *clag3*. En el estudio realizado por Sharma y sus colegas se utilizaron parásitos de la línea FCB para sus experimentos, mientras que nosotros usamos parásitos de la línea genética de 3D7 (línea 10G). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que los diferentes resultados obtenidos en los dos estudios se deban a las diferencias a nivel de secuencia de *clag2* entre las dos líneas.

Para comprender mejor el papel de otros genes *clag* en la actividad de PSAC, también investigamos sus niveles de expresión en infecciones humanas (tanto naturales como experimentales) (Mira-Martinez et al, 2017). Observamos que *clag2*, *clag8* y *clag9* se encontraban en estado activo en todas las muestras analizadas en nuestro estudio. Además, los aislados de campo expresaron estos genes al mismo nivel cuando los adaptamos a condiciones de cultivo. No encontramos tampoco diferencias en los niveles de transcripción en las muestras del estudio CHMI en comparación con la línea parental NF54 mantenida en condiciones de cultivo. Así, los otros genes *clag* se expresan todos en humanos y en condiciones de laboratorio en la población estudiada. Estos resultados sugieren que. Sin embargo, hay estudios que sugieren que estos genes no son esenciales para la supervivencia del parásito. En primer lugar, *clag2* presenta expresión clonalmente variante y algunas líneas de parásitos adaptadas a laboratorio no expresan este gen. Por otro lado, se han observado deleciones espontáneas del locus de *clag9* durante la adaptación de cepas de parásitos al cultivo in vitro en otros estudios (Day et al, 1993) y también se han generado por transfección líneas *knockout* de *clag9* (Nacer et al, 2011; Trenholme et al, 2000), demostrando que este gen no es esencial. Una posible explicación de que *clag8* y *clag9* se expresen siempre es que no presentan expresión clonalmente variante; podría ser que no fuese posible silenciar estos genes mediante modificaciones en el nivel de cromatina. La razón por la que *clag2* presenta una variante de expresión clonal y se silencia en algunas líneas de parásitos adaptadas al laboratorio aún se desconoce. Es posible que en infecciones *clag2* también se encuentre silenciado en algunos parásitos que sin embargo no podemos detectar con el análisis mediante qPCR, como ocurre con parásitos que no expresan *clag3*. Así, ensayos de inmunofluorescencia, como los realizados para CLAG3 pero con anticuerpos para CLAG2 (Artículo 3), podrían ser realizados en parásitos de campo tras ser madurados en el laboratorio.

CONCLUSIONES

1. Los parásitos de la malaria pueden adquirir resistencia a BS por cambios epigenéticos en la expresión de los genes *clag3*. Estos resultados demuestran que los parásitos pueden adquirir resistencia a compuestos tóxicos por cambios en la regulación epigenética de sus genes.
2. La expresión de genes *clag3* alternativos da como resultado diferente eficacia de transporte de algunos solutos a través de PSAC, alterando la sensibilidad del parásito a los fármacos. La resistencia a altas concentraciones de fármaco requiere el silenciamiento simultáneo de ambos genes *clag3*, un patrón de expresión inesperado que no se había descrito previamente.
3. La selección de parásitos con patrones transcripcionales de *clag3* que confieren una ventaja en una situación determinada juega un papel en la adaptación a la presencia de compuestos tóxicos, siendo un ejemplo de adaptación mediante *bet-hedging* en parásitos de la malaria.
4. *P. falciparum* en infecciones naturales expresa uno de los dos parálogos de *clag3*, consistente con la propiedad de expresión mutuamente excluyente previamente observada en parásitos adaptados al laboratorio. Además, los parásitos expresan preferentemente el mismo parálogo en infecciones humanas: *clag3.2*, al menos en la población estudiada.
5. La memoria epigenética de *clag3* sufre un reinicio después de que los parásitos pasen por estadios de transmisión; cuando los parásitos salen del hígado humano expresan uno u otro parálogo indistintamente. La selección natural se aplica a aquellos parásitos que expresan el parálogo que confiere alguna ventaja en el entorno de la sangre: *clag3.2*. Aún no hemos determinado si existe alguna condición natural en la que la expresión de *clag3.1*, ambos o ninguno de los genes *clag3* sea más favorable.
6. Existen regiones conservadas en cada parálogos en las secuencias de CLAG3 en el extremo N-terminal (NtCR). Estas regiones probablemente contribuyan a la preferencia de expresión de CLAG3.2 en infecciones humanas.
7. La presencia del mismo compuesto tóxico en el medio selecciona parásitos que expresan *clag3.1* o *clag3.2*, dependiendo de la línea del parásito. Esta observación sugiere que la eficacia específica en el transporte de solutos que presentan los genes *clag3* está determinada por la herencia genética del parásito, probablemente definida por las regiones más polimórficas (HVR).
8. Además de BS, la absorción de otros compuestos antipalúdicos, como T3, requiere la expresión de genes *clag3*; por lo tanto, podría verse afectado por el mecanismo de resistencia a los

medicamentos descrito en esta tesis. Otros compuestos que se sospecha que usan PSAC pueden alcanzar su diana a pesar de la ausencia de proteínas CLAG3, lo que sugiere que otros genes, como otros miembros de la familia *clag*, están involucrados en la actividad del canal.