

Verificación del Modelo de Silenciamiento Genético en Macrófagos Infectados con Leishmaniasis Visceral

Omar Alexis Becerra Sierra
Universidad EAFIT
Medellín, Colombia
oabecerras@eafit.edu.co

Manuel Eduardo García Jiménez
Universidad EAFIT
Medellín, Colombia
megarciaj@eafit.edu.co

David Andrés Romero Millán
Universidad EAFIT
Medellín, Colombia
dromero1@eafit.edu.co

27 de mayo de 2021

Resumen

En el presente trabajo se analiza un sistema dinámico planteado por Barbosa [1] que describe el comportamiento de ciertas moléculas dentro de un macrófago infectado con Leishmaniasis al administrar una dosis de tetraciclina (antibiótico).

La investigación indica que la Leishmaniasis ataca a los macrófagos del paciente y que el proceso infeccioso se da cuando ciertas proteínas del parásito interactúan con ciertas otras del macrófago [1]. La hipótesis sugiere que es posible modificar la genética del macrófago, a través del uso de antibióticos, para controlar o hasta posiblemente eliminar la infección [1].

La contribución principal de este documento es la verificación de los resultados del modelo planteado para determinar su validez. Para cumplir con este objetivo, se realiza una revisión teórica y una simulación del modelo con el paquete de software Simulink. Los resultados indican que el modelo es consistente con los hallazgos reportados por Barbosa. Estos mismos son congruentes con los principios de silenciamiento genético, por tanto se concluye que el modelo es apto para su utilización en la investigación de Leishmaniasis.

Palabras Claves — Verificación de resultados, Leishmaniasis, Silenciamiento genético, Linealización, Controlador PID, Estimación de parámetros.

Abstract

In this document, we analyze a dynamic system proposed by Barbosa [1] that describes the behavior of certain molecules within a macrophage infected with Leishmaniasis when administering a dose of tetracycline (antibiotic).

The investigation indicates that Leishmaniasis attacks the patient's macrophages and that the infectious process occurs when certain proteins of the parasite interact with certain others of the macrophage [1]. The hypothesis suggests that it is possible to modify the genetics of the macrophage, using antibiotics, to control or even possibly eliminate the infection [1].

The main contribution of this document is to verify the results of the proposed model to determine its validity. To fulfill this objective, a theoretical review and a simulation of the model is carried out with Simulink. The results indicate that the model is consistent with the findings reported by Barbosa. These are coherent with the principles of genetic silencing, so it can be concluded that the model is suitable for use in the investigation of Leishmaniasis.

Keywords — Results verification, Leishmaniasis, Genetic silencing, Linearization, PID controller, Parameter estimation.

1. Introducción

La Leishmaniasis visceral es una enfermedad infecciosa producida por protozoos del género *Leishmania infantum*, transmitidos a través de la picadura del insecto *Lutzomyia longipalpis* [8]. Esta enfermedad

produce una inflamación anormal del hígado y el bazo, conocida también como un síndrome de disfunción multiorgánica, que sin el tratamiento adecuado puede llegar a ser letal para el paciente.

El estudio de la Leishmaniasis es de particular interés en Colombia, ya que según un estudio reciente del Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Rosario [5], Colombia es el país con más especies de parásitos de *Leishmania* en el mundo. **La motivación principal de este trabajo** es la oportunidad de validar un modelo que contribuiría en el futuro a evitar cerca de 1.3 millones de casos en el mundo, donde mueren aproximadamente entre 20.000 y 40.000 personas cada año [5].

El parásito *Leishmania* infecta a los macrófagos, los cuales son unos tipos de glóbulos blancos que participan en la defensa del organismo ante cuerpos o sustancias extrañas [1]. La investigación actual indica que el parásito modifica la expresión genética de los macrófagos, de modo que ciertas proteínas del parásito interactúan con ciertas otras de los glóbulos blancos generando el proceso infeccioso. La hipótesis del trabajo de Barbosa sugiere que es posible silenciar genes específicos del macrófago para reducir o quizás incluso evitar la infección [1].

Actualmente, el Grupo de Investigación de Modelado y Control de Sistemas Biológicos de la Universidad Nacional de Colombia está experimentando con el silenciamiento genético de un cultivo de macrófagos [1]. Este grupo utiliza el antibiótico tetraciclina para modificar la expresión de ciertos genes con el objetivo de modular la infección. La expresión del gen es medida a través de la proteína verde fluorescente (GFP), la cual es introducida junto al gen de prueba para analizar la efectividad del silenciamiento [1].

El presente trabajo se basa en las investigaciones desarrolladas por el Grupo de Investigación de Modelado y Control de Sistemas Biológicos de la Universidad Nacional de Colombia y en la tesis de Maestría en Ingeniería y Automatización Industrial de la Doctora Nathalie Andrea Barbosa Roa. La doctora Barbosa desarrolló un sistema dinámico para simular las concentraciones de cinco poblaciones de moléculas dentro de un macrófago infectado por *Leishmaniasis* cuando se aplican unas ciertas dosis de antibiótico. **El resultado esperado** es que el modelo represente fielmente la dinámica real, es decir, que cuando se aplique antibiótico se aumente proporcionalmente la concentración de la proteína verde fluorescente hasta que las moléculas se saturen y luego las concentraciones retornen a su estado inicial.

Los resultados esperados se extraen de los hallazgos experimentales sobre la línea celular desarrollada por el grupo de investigación. Debido a que el modelo planteado refleja la dinámica de dicha línea particular no se dispone de resultados científicos externos para realizar la comparación, por tanto la **validación del modelo** se realizará únicamente a partir de los resultados reportados.

Debido a las características del modelo planteado, se determinó que su validación se realizaría en un paquete de software de simulación que permitiera la ejecución de diversos escenarios y apoyara en la identificación de estabilidad y opciones de control.

2. Metodología

2.1. Contextualización

Los macrófagos son células que hacen parte del sistema inmune y por tanto participan en la protección del organismo. Estos glóbulos blancos, como cualquier otra célula, necesitan ciertas proteínas para funcionar correctamente. Estas proteínas son sintetizadas por los ribosomas a partir del ARN mensajero. El ARN mensajero es generado en el proceso de transcripción a partir de la información contenida en el ADN [1].

Como se mencionó previamente, la infección por *Leishmaniasis* se da cuando interactúan proteínas del macrófago con las proteínas del parásito. Los investigadores plantean que es posible controlar la infección modificando la concentración de algunas proteínas del macrófago [1]. El Grupo de Investigación de Modelado y Control de Sistemas Biológicos de la Universidad Nacional de Colombia se dio a la tarea de trabajar al respecto.

Los investigadores de la Universidad Nacional seleccionaron un gen del macrófago a silenciar (modular). La hipótesis es que este gen es responsable de la síntesis de las proteínas que pueden llegar a

estar en contacto con las moléculas del parásito [1]. Cuando este gen se expresa, la célula produce más proteína, en el caso contrario, cuando se reprime, la célula disminuye la tasa de síntesis [1].

El grupo de investigación cultivó macrófagos infectados, y los modificó genéticamente para que estos fueran capaces de producir una molécula llamada represor de tetraciclina [1]. La molécula reprime la expresión del gen mencionado previamente, reduciendo la concentración de las proteínas. Adicionalmente añadieron ARN mensajero de la proteína verde fluorescente (GFP) junto a este mismo gen, de modo que cuando el gen se expresa también se produce la proteína verde fluorescente, esto con el objetivo de facilitar la identificación del evento [1].

La concentración de la molécula represor de tetraciclina puede ser controlada aplicando dosis de tetraciclina (antibiótico) [1]. Cuando la tetraciclina entra en contacto con los represores, una fracción de estos últimos se inactiva y pierde la propiedad de inhibir el gen de prueba [1].

2.2. Descripción del Sistema

La célula produce el represor de tetraciclina debido a la modificación genética realizada por el grupo de investigación [1]. El represor es una molécula que se sintetiza a una cierta tasa conocida η . La concentración de esta molécula se divide en dos, la población activa y la población inactiva. La población activa es aquella que efectivamente puede reprimir el gen, la población inactiva es aquella que entró en contacto con la tetraciclina y perdió sus propiedades [1]. El represor tiene una cierta tasa de degradación δ_3 y una tasa de reactivación v (cuando se pierde el efecto de la tetraciclina).

La tetraciclina es un antibiótico que no se produce naturalmente dentro de la célula, así que entra al sistema mediante una dosis [1]. La concentración de tetraciclina puede degradarse orgánicamente o puede saturarse cuando entra en contacto con el represor.

El represor de tetraciclina reduce el proceso de transcripción del ARN mensajero del gen de prueba y por tanto también del gen que produce la proteína verde fluorescente [1]. Cuando se reduce la transcripción también se reduce la síntesis de las proteínas asociadas, es decir, cuando se reduce el ARN mensajero GFP se reduce también la tasa de producción de la proteína verde fluorescente [1].

La concentración del antibiótico (tetraciclina) determina entonces la cantidad de proteína sintetizada en los ribosomas [1].

A continuación, se describen las entradas, salidas y estados del sistema.

Entradas

- Dosis de tetraciclina (u).
- Concentración inicial del represor activo de tetraciclina (TR_0).
- Concentración inicial del represor inactivo de tetraciclina (TRi_0).
- Concentración inicial de tetraciclina (Tet_0).
- Concentración inicial del ARN mensajero de la proteína verde fluorescente ($ARNmGFP_0$).
- Concentración inicial de la proteína verde fluorescente (GFP_0).

Estados

- Concentración del represor activo de tetraciclina (TR).
- Concentración del represor inactivo de tetraciclina (TRi).
- Concentración de tetraciclina (Tet).
- Concentración del ARN mensajero de la proteína verde fluorescente ($ARNmGFP$).
- Concentración de la proteína verde fluorescente (GFP).

Vale la pena mencionar que no se identifican salidas diferentes a los estados.

El funcionamiento del sistema se resume en la siguiente figura.

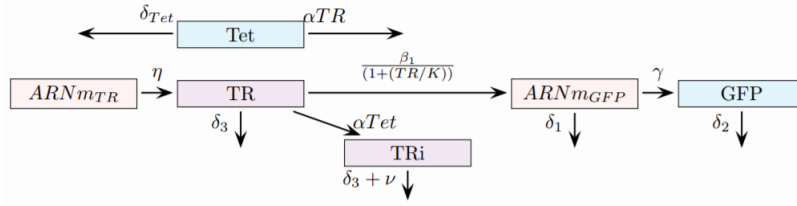


Figura 1: Sistema de Silenciamiento Genético de Macrófagos [1]

En la figura anterior (Figura 1) se visualiza la dinámica de cinco poblaciones, que representan a los cinco estados indicados previamente.

2.3. Descripción del Modelo Matemático

El modelo de silenciamiento genético representa las dinámicas de cinco poblaciones de moléculas dentro del macrófago: TR , $ARNm_{GFP}$, GFP , TRi y Tet . El modelo se presenta a continuación.

$$\begin{aligned}\frac{dTR}{dt} &= -\delta_3 TR - \alpha \cdot TR \cdot Tet + \eta ARNm_{m_{TR}} + vTRi \\ \frac{dTRi}{dt} &= -\delta_3 TRi + \alpha \cdot TR \cdot Tet - vTRi \\ \frac{dTet}{dt} &= -\delta_{tet} Tet - \alpha \cdot TR \cdot Tet + \delta_3 TRi + \zeta u + vTRi \\ \frac{dARNm_{m_{GFP}}}{dt} &= -\delta_1 ARNm_{m_{GFP}} + \frac{\beta_1}{1 + \left(\frac{TR}{K}\right)^n} \\ \frac{dGFP}{dt} &= -\delta_2 GFP + \gamma ARNm_{m_{GFP}}\end{aligned}$$

Las poblaciones de moléculas son:

- Represor de Tetraciclina Activo (TR) e Inactivo (TRi).
- Tetraciclina (Tet).
- ARNm asociado a la producción de la proteína verde fluorescente ($ARNm_{GFP}$).
- Proteína verde fluorescente (GFP).

2.3.1. Represor de Tetraciclina

Representa la concentración del represor de tetraciclina dentro del macrófago. El represor de tetraciclina es una molécula que disminuye la tasa de transcripción del gen a silenciar, reduciendo así la producción de la proteína asociada [1].

A continuación, se presenta la ecuación que describe la dinámica del represor de tetraciclina activo:

$$\frac{dTR}{dt} = -\delta_3 TR - \alpha \cdot TR \cdot Tet + \eta ARNm_{m_{TR}} + vTRi$$

La concentración del represor activo en cada instante depende de cuatro (4) factores:

1. Número de moléculas degradadas, asociado al parámetro δ_3 (refleja la vida media de la proteína).

2. Número de moléculas inactivadas cuando el represor entra en contacto con la tetraciclina, asociado al parámetro α .
3. Número de moléculas producidas en la transcripción del ARNm del represor, asociado al parámetro η .
4. Número de moléculas reactivadas, es decir, aquellas que se encuentran nuevamente disponibles para reprimir el gen cuando se pierde el efecto del antibiótico, asociado al parámetro ν .

A continuación, se presenta la ecuación que describe la dinámica del represor de tetraciclina inactivo:

$$\frac{dTRi}{dt} = -\delta_3 TRi + \alpha \cdot TR \cdot Tet - \nu TRi$$

La concentración del represor inactivo en cada instante depende de tres (3) factores de los ya mencionados: el número de moléculas degradadas, el número de moléculas inactivadas, y el número de moléculas reactivadas. Las moléculas del represor que se inactivan pasan a hacer parte de esta población.

2.3.2. Tetraciclina

Representa la concentración de tetraciclina dentro el macrófago. La tetraciclina es un antibiótico que inhibe la producción de proteínas bacterianas [7]. Como se indicó previamente, la tetraciclina entra en contacto con el represor e inactiva una fracción de dichas moléculas. Las moléculas inactivas ya no actúan como represores del gen de prueba.

A continuación, se presenta la ecuación que describe la dinámica de la tetraciclina:

$$\frac{dTet}{dt} = -\delta_{tet}Tet - \alpha \cdot TR \cdot Tet + \delta_3 TRi + \zeta u + \nu TRi$$

La concentración de tetraciclina en cada instante depende de cinco (5) factores:

1. Número de moléculas degradadas, asociado al parámetro $\delta_{tet}Tet$ (refleja la vida media del antibiótico).
2. Número de moléculas saturadas cuando la tetraciclina entra en contacto con el represor, asociado al parámetro α .
3. Número de moléculas producidas en la degradación del represor inactivo, asociado al parámetro δ_3 .
4. Aplicación de la dosis externa del antibiótico, asociada al parámetro ζ .
5. Número de moléculas producidas en la reactivación de los represores de tetraciclina, asociado al parámetro ν .

2.3.3. ARNm asociado a la producción de la proteína verde fluorescente

Representa la concentración del ARN mensajero asociado a la producción de la proteína verde fluorescente dentro del macrófago. Como se indicó previamente, la manera de determinar el nivel de expresión del gen de trabajo es a través de la proteína verde fluorescente (GFP) [1]. Al inicio del experimento se introdujo ARN mensajero de esta proteína junto al gen de prueba, de modo que cuando se expresa este gen también se expresa el gen GFP y se produce la proteína verde fluorescente. La efectividad del silenciamiento genético puede analizarse a partir de la concentración de esta proteína [1].

El ARNm GFP es producido en la transcripción del ADN de la célula y luego este es tomado por los ribosomas para sintetizar la proteína verde fluorescente [1].

A continuación, se presenta la ecuación que describe la dinámica del ARNm asociado a la producción de la proteína verde fluorescente:

$$\frac{dARN_{m_{GFP}}}{dt} = -\delta_1 ARN_{m_{GFP}} + \frac{\beta_1}{1 + \left(\frac{TR}{K}\right)^n}$$

La concentración de ARNm GFP en cada instante depende de dos (2) factores:

1. Número de moléculas degradadas, asociado al parámetro δ_1 (refleja la vida media de la molécula).
2. Número de moléculas producidas bajo el efecto del represor de tetraciclina.

La concentración de ARNm GFP se ve afectada negativamente por la concentración del represor de tetraciclina. Cuando aumenta la concentración del represor, disminuye la producción de ARNm GFP, y cuando disminuye, la producción de ARN GFP aumenta. Según lo anterior, se espera que ante una dosis de antibiótico (tetraciclina) se reduzca la concentración de represor activo y se aumente la concentración de ARN GFP, reflejando así la expresión del gen de prueba [1].

2.3.4. Proteína verde fluorescente

Representa la concentración de proteína verde fluorescente dentro del macrófago. Esta proteína es sintetizada en los ribosomas del macrófago a partir del ARN mensajero disponible [1].

A continuación, se presenta la ecuación que describe la dinámica de la proteína verde fluorescente:

$$\frac{dGFP}{dt} = -\delta_2 GFP + \gamma ARNm_{GFP}$$

La concentración de proteína GFP en cada instante depende de dos (2) factores:

1. Número de moléculas degradadas, asociado al parámetro δ_2 (refleja la vida media de la molécula).
2. Número de moléculas sintetizadas por los ribosomas a partir del ARNm, asociado al parámetro γ .

2.3.5. Parámetros del Modelo

A continuación, se presenta una tabla con los parámetros utilizados en el modelo.

Parámetros	Valor
δ_1	0.06931
δ_2	0.00193
δ_3	0.1733
δ_{Tet}	0.00136
ζ	10000
α	$1,0 \times 10^{-6}$
η	3
κ	29.97576
n	2
β_1	1
γ	20
ν	0.1

Cuadro 1: Parámetros del Modelo [1]

2.4. Diagrama de Bloques

A continuación, se presentan los diagramas de bloques del sistema dinámico. El modelo se conforma por cinco ecuaciones distintas que fueron representados como subsistemas.

En la siguiente figura se presenta la macro-sistema dinámico.

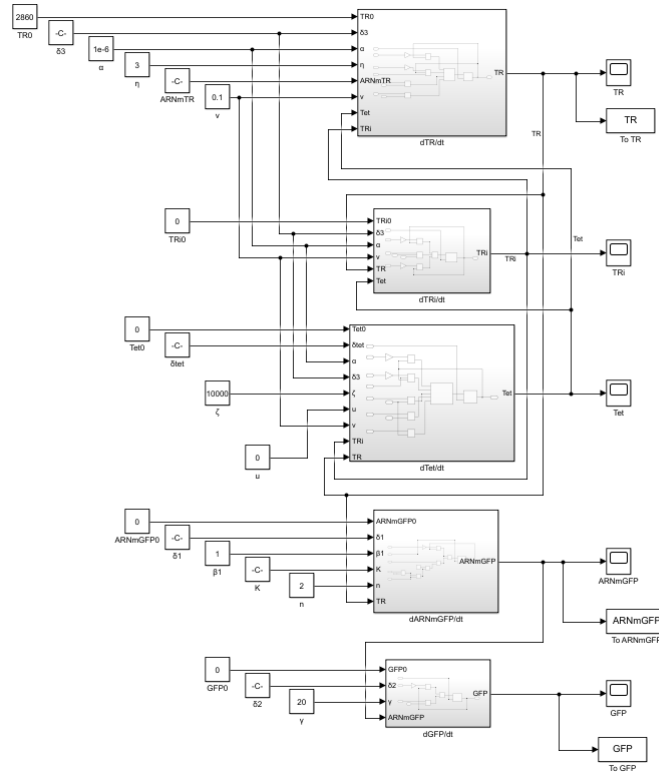


Figura 2: Macro-Sistema Dinámico

En la siguiente figura se presenta el subsistema que representa el comportamiento del represor activo de tetraciclina.

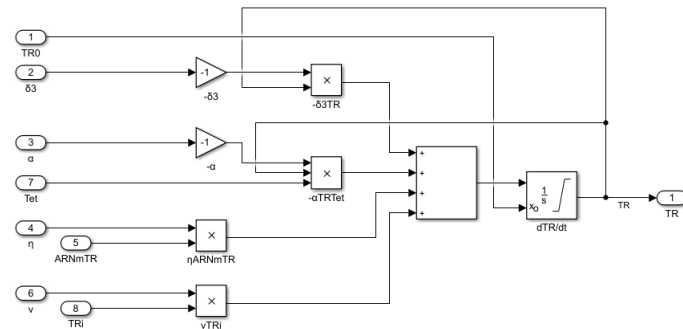


Figura 3: Subsistema Concentración de Represor Activo de Tetraciclina

En la siguiente figura se presenta el subsistema que representa el comportamiento del represor inactivo de tetraciclina.

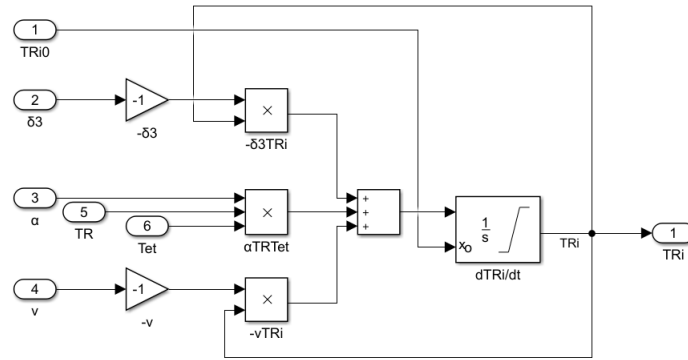


Figura 4: Subsistema Concentración de Represor Inactivo de Tetraciclina

En la siguiente figura se presenta el subsistema que representa el comportamiento de la tetraciclina.

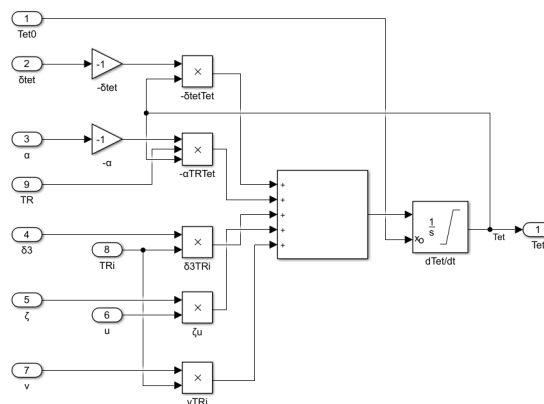


Figura 5: Subsistema Concentración de Tetraciclina

En la siguiente figura se presenta el subsistema que representa el comportamiento del ARN mensajero de la proteína verde fluorescente.

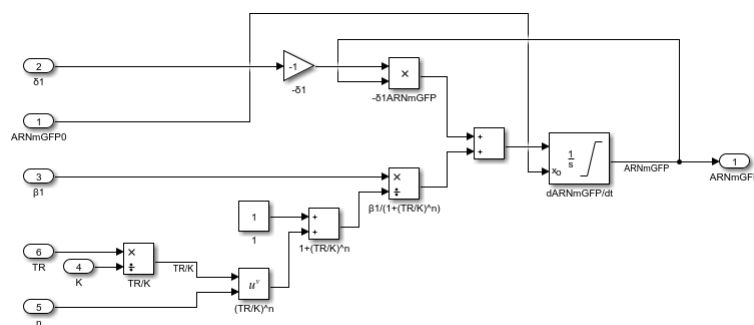


Figura 6: Subsistema Concentración ARNm de la Proteína Verde Fluorescente

En la siguiente figura se presenta el subsistema que representa el comportamiento de la proteína verde fluorescente.

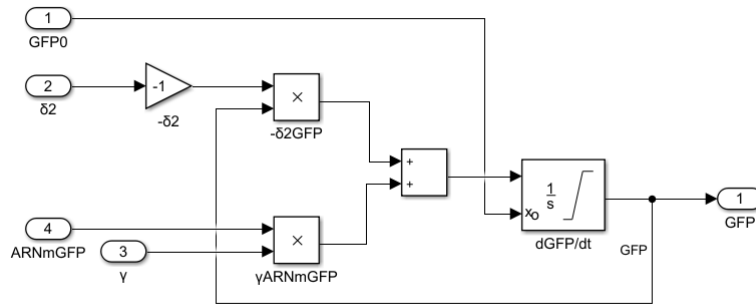


Figura 7: Subsistema Concentración de la Proteína Verde Fluorescente

2.5. Métodos de Simulación

Para la simulación del sistema dinámico se utiliza el paquete de software Simulink. Se realizó la simulación de los escenarios con los siguientes parámetros.

Parámetro	Valor
Unidad de tiempo	Segundo
Tiempo inicio	0
Tiempo fin	9000
Solver	ode1 (Euler)
Paso	0.01

Cuadro 2: Parámetros de la Simulación

3. Resultados

A continuación, se presentan los resultados de la simulación bajo dos escenarios, A y B.

En la siguiente tabla se indican las concentraciones iniciales de cada molécula.

Molécula	Valor
TR_0	2860
TRi_0	0
Tet_0	0
$ARNmGFP_0$	0
GFP_0	0

Cuadro 3: Concentraciones Iniciales de Moléculas [1]

3.1. Escenario A. No se administra la dosis de antibiótico

En este escenario no se administra la dosis del antibiótico. La concentración de tetraciclina, como se ha indicado antes, parte de una dosis externa, y bajo estas condiciones siempre será igual a cero. Debido a esto, no se inactivan moléculas del represor y la concentración del represor inactivo también será igual a cero.

3.1.1. Principales Resultados del Escenario A

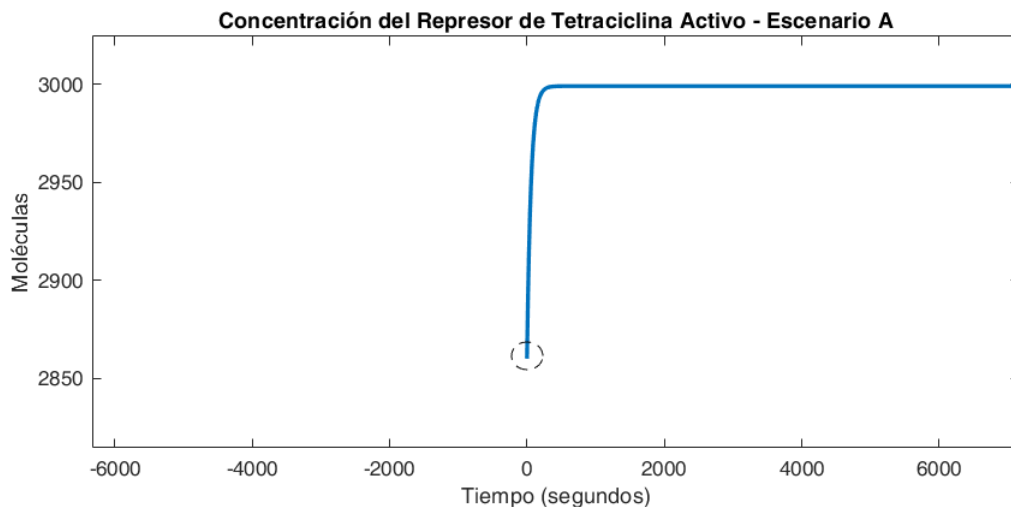


Figura 8: Concentración del Represor de Tetraciclina Activo en el Escenario A

La concentración del represor activo, que inicia en 2.860 moléculas, crece por 150 segundos hasta llegar a aproximadamente 3.000 moléculas.

Explicación del fenómeno: Ya que no hay antibiótico en la célula, la concentración del represor activo solo depende de su tasa de degradación (δ_3) y de la tasa de producción de su ARN mensajero (η), estas dos se nivelan al alcanzar el punto antes mencionado. *Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica del represor activo de tetraciclina.*

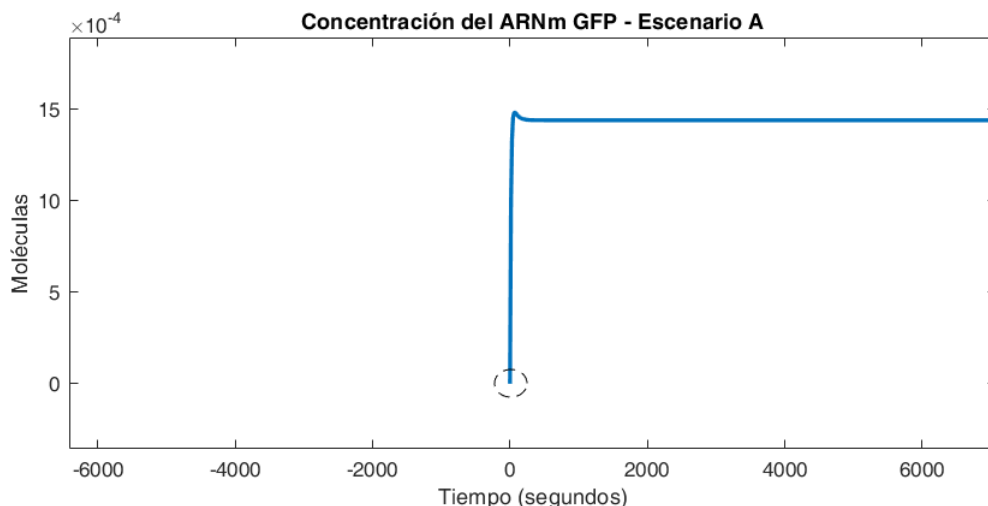


Figura 9: Concentración del ARNm GFP en el Escenario A

Cómo se ha explicado previamente, la dinámica del ARN mensajero de la proteína verde fluorescente (GFP) depende de la concentración del represor activo dentro del macrófago. En este escenario la concentración del ARNm GFP crece rápidamente hasta llegar a las $1,5 \times 10^{-3}$ moléculas.

Explicación del fenómeno: Debido a la producción base del receptor de tetraciclina, explicada en el punto anterior, se sintetiza una concentración mínima de moléculas de ARN mensajero de la proteína GFP. *Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica del ARN mensajero de la proteína verde fluorescente.*

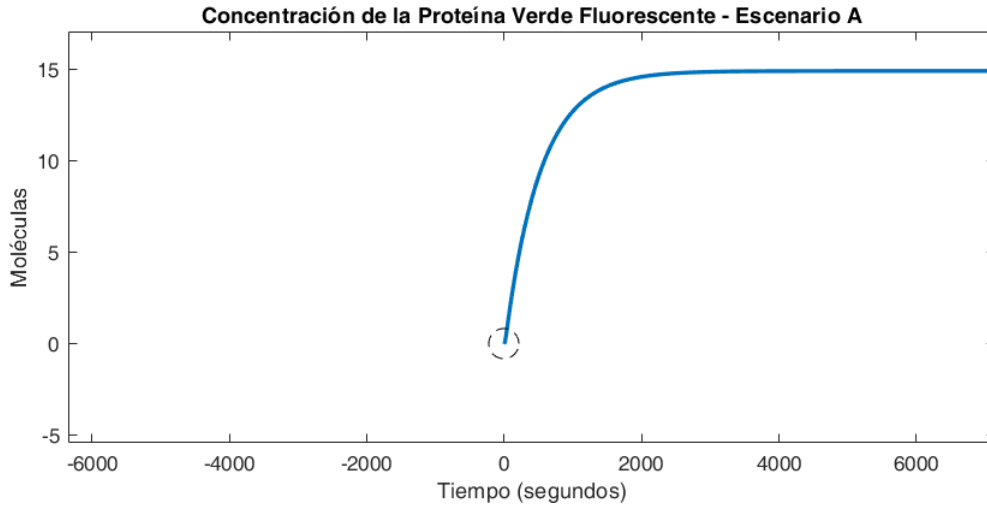


Figura 10: Concentración de Proteína Verde Fluorescente GFP en el Escenario A

La concentración de la proteína verde fluorescente crece por 3.000 segundos hasta llegar a aproximadamente a 15 moléculas.

Explicación del fenómeno: La producción basal de ARN mensajero GFP, explicada en el punto anterior, da a lugar a la síntesis de la proteína verde fluorescente (GFP) proporcional al parámetro de tasa de síntesis en la transcripción (γ). Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica de la proteína verde fluorescente.

3.1.2. Retrato de Plano de Fase del Escenario A

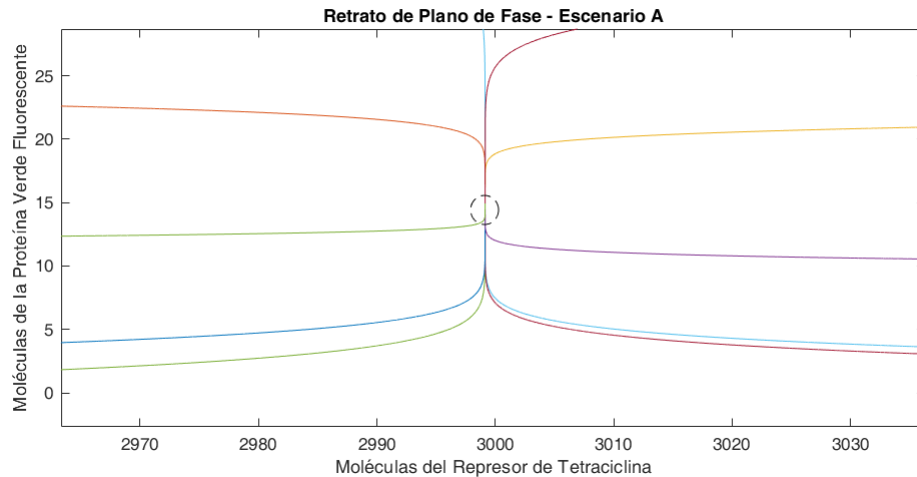


Figura 11: Retrato de Plano de Fase TR vs. GFP en el Escenario A

En la figura anterior se relaciona el comportamiento del represor de tetraciclina y de la proteína verde fluorescente. El retrato de plano de fase fue construido a partir de 10 simulaciones del modelo con diferentes valores iniciales. *Se estima un punto de equilibrio estable* en aproximadamente 3.000 moléculas de represor y 15 moléculas de proteína verde fluorescente ya que existe una trayectoria progresiva hacia este. Barbosa reporta en su tesis los mismos hallazgos [1].

3.1.3. Análisis de los Resultados del Escenario A

En resumen, sin dosis de antibiótico existe una producción orgánica del represor activo que para de crecer en 3.000 moléculas, lo que se traduce en una generación basal de $1,5 \times 10^{-3}$ moléculas de ARNm

GFP y 15 de la proteína verde fluorescente (GFP).

Las concentraciones se estabilizan por dos aspectos,

- No hay tetraciclina que inactive el represor disponible.
- Las tasas de degradación y producción de cada molécula se compensan luego de cierto período de tiempo.

A partir del retrato de plano de fase se estima un punto de equilibrio estable en 3.000 moléculas de represor y 15 moléculas de proteína verde fluorescente.

En conclusión, los *resultados previos son consistentes con lo reportado por Barbosa en este mismo escenario* [1]. El sistema se comporta como lo describe la teoría: sin antibiótico no hay expresión significativa del gen, lo que puede evidenciarse en la concentración base del represor de tetraciclina y de la proteína verde fluorescente.

3.2. Escenario B. Administración de una sola dosis

Bajo este escenario se administra una dosis de 10.000 moléculas de antibiótico (tetraciclina) en $t=4.500$ segundos. La entrada corresponde a un pulso.

3.2.1. Principales Resultados del Escenario B

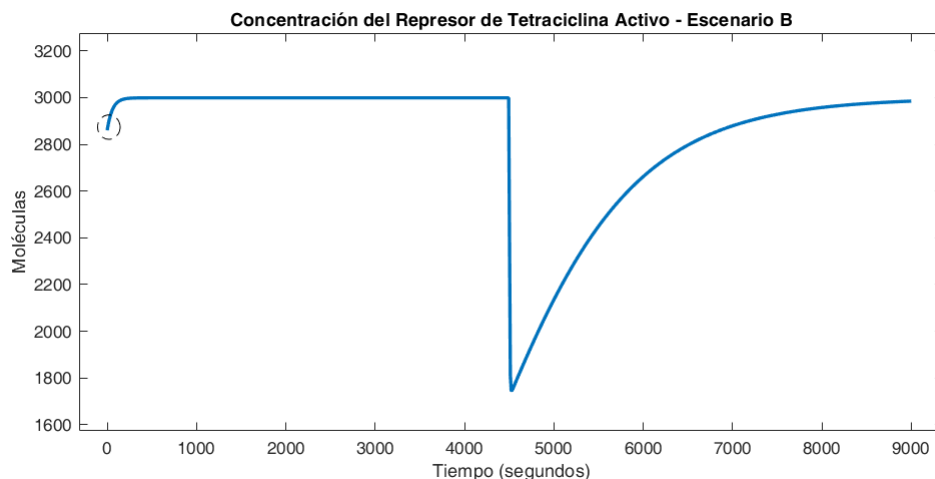


Figura 12: Concentración del Represor de Tetraciclina Activo en el Escenario B

El represor activo se encuentra en el punto de equilibrio de 3.000 moléculas, cuando se aplica la dosis de tetraciclina. En ese momento, se reduce casi de inmediato la concentración en aproximadamente 1.300 moléculas, pero luego vuelve a crecer hasta alcanzar el estado original.

Explicación del fenómeno: La reducción de la concentración se debe a que la dosis de tetraciclina entra en contacto con el represor y una fracción de este último se inactiva. Cuando el represor se inactiva pasa a ser represor inactivo (*TRi*). Sin embargo, un tiempo después la tetraciclina se satura y pierde efecto sobre el represor, permitiéndole retornar al punto de equilibrio. *Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica del represor activo de tetraciclina.*

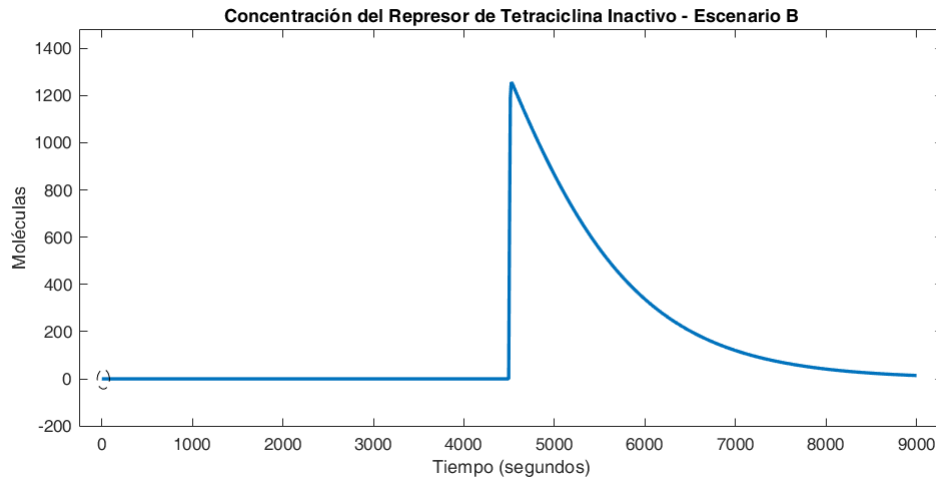


Figura 13: Concentración del Represor Inactivo de Tetraciclina en el Escenario B

El represor inactivo es la población complemento al represor activo, de modo que cuando aumenta el inactivo se reduce el activo en la misma cantidad y viceversa. El represor inactivo tiene concentración cero antes de aplicar la dosis de antibiótico. Cuando esta se aplica, se inactivan aproximadamente 1.300 moléculas del represor y pasan a ser parte de esta población.

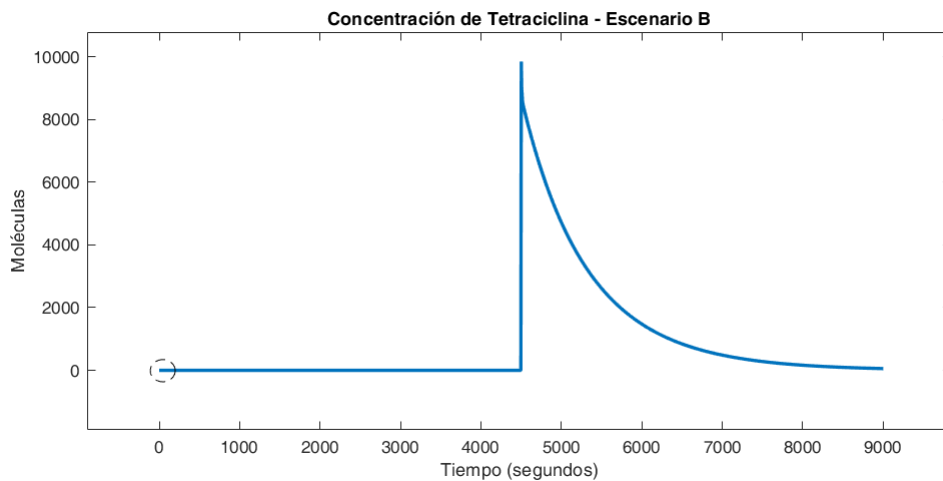


Figura 14: Concentración de Tetraciclina en el Escenario B

La tetraciclina ingresa al sistema en la dosis aplicada. En los primeros instantes su concentración se reduce rápidamente en aproximadamente 1.300 moléculas. Luego la concentración se reduce lentamente con tendencia a volver a cero.

Explicación del fenómeno: Ingresan 10.000 moléculas de tetraciclina de las cuales se saturan casi de inmediato 1.300 en el contacto con el represor. Luego las moléculas restantes se degradan a una tasa δ_{Tet} . No existe tasa de síntesis ya que esta molécula es externa. *Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica de la tetraciclina.*

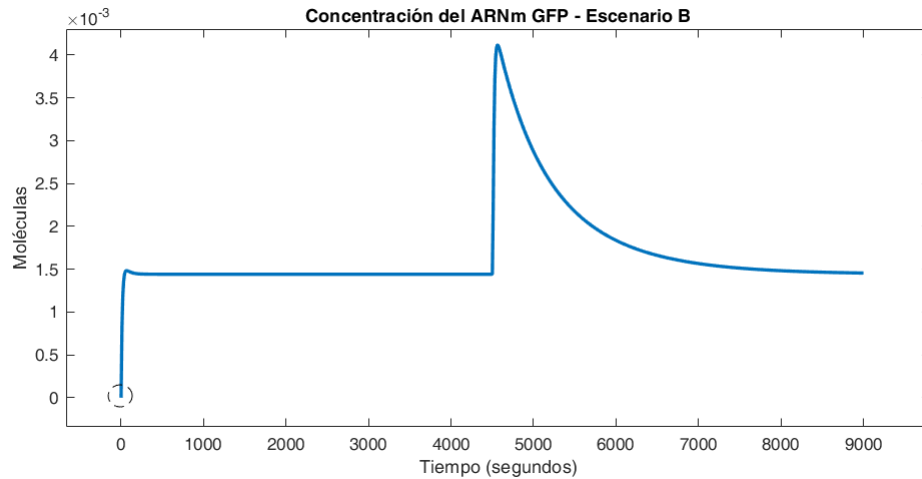


Figura 15: Concentración del ARNm GFP en el Escenario B

Explicación del fenómeno: El represor activo disminuye de manera importante cuando se aplica la dosis de antibiótico, esto da oportunidad al núcleo de aumentar la tasa de transcripción del ARN del gen de interés y por tanto también del gen que regula la producción de proteína verde fluorescente (ARNm GFP). Sin embargo, luego de pasar el efecto antibiótico, la tasa de transcripción vuelve a su valor original y el ARN mensajero retorna a su valor de equilibrio. *Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica del ARN mensajero de la proteína verde fluorescente.*

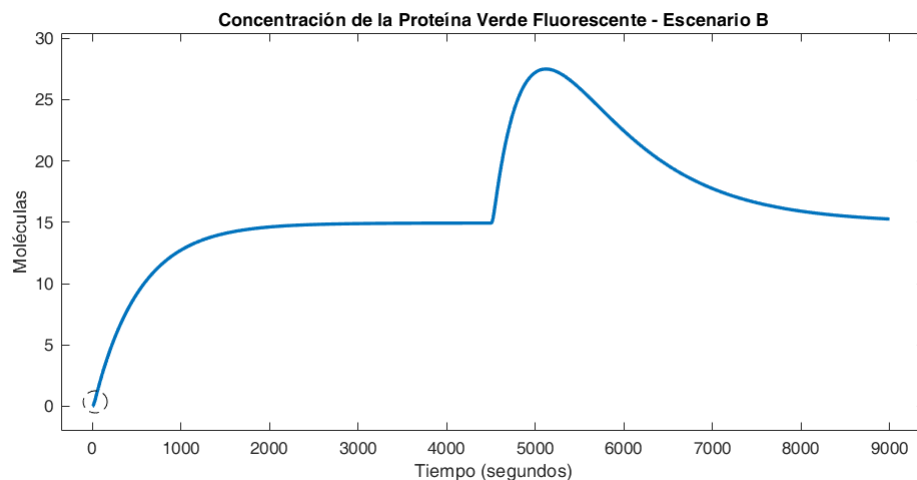


Figura 16: Concentración de Proteína Verde Fluorescente GFP en el Escenario B

Luego de la aplicación de la dosis, la concentración de la proteína verde fluorescente crece hasta alcanzar un máximo de aproximadamente 28 moléculas. Luego de llegar a este punto, la concentración decrece hasta llegar a su valor de equilibrio.

Explicación del fenómeno: La cantidad de proteínas sintetizadas en los ribosomas aumentó cuando se disparó la transcripción de su ARN mensajero. Sin embargo, el efecto sobre la transcripción se pierde mientras se elimina toda la tetraciclina circundante, reduciendo así la tasa de síntesis de la proteína, retornando la concentración a su estado estable. *Estas conclusiones se derivan de la ecuación diferencial que explica la dinámica de la proteína verde fluorescente.*

3.2.2. Retrato de Plano de Fase del Escenario B

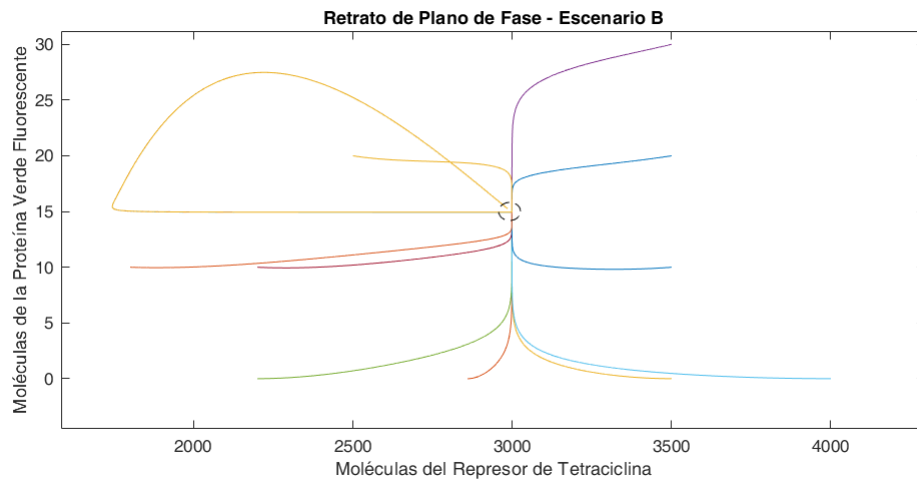


Figura 17: Retrato de Plano de Fase TR vs. GFP en el Escenario B

En la figura anterior se relaciona el comportamiento del represor de tetraciclina y de la proteína verde fluorescente. El retrato de plano de fase fue construido a partir de 10 simulaciones del modelo con diferentes valores iniciales. *Se estima el mismo punto de equilibrio estable previamente identificado en el escenario A* en aproximadamente 3.000 moléculas de represor y 15 moléculas de proteína verde fluorescente ya que existe una trayectoria progresiva hacia este. Barbosa reporta en su tesis los mismos hallazgos [1].

3.2.3. Análisis de los Resultados del Escenario B

En resumen, al aplicar una dosis de antibiótico una fracción del represor se inactiva rápidamente, reduciendo el efecto inhibitor sobre la transcripción del ARNm GFP, desencadenando así una producción acelerada de proteína verde fluorescente. Sin embargo, luego de un tiempo el antibiótico se satura y se degrada, de modo que su concentración decrece permitiendo al sistema retornar al estado original.

A partir del retrato de plano de fase se estima un punto de equilibrio estable en 3.000 moléculas de represor y 15 moléculas de proteína verde fluorescente.

En conclusión, los *resultados previos son consistentes con lo reportado por Barbosa en este mismo escenario* [1]. El sistema se comporta como lo describe la teoría: las dosis de antibiótico, como entradas pulso, tienen un efecto momentáneo sobre la producción de proteína verde fluorescente sin embargo el sistema tiende a regresar a su punto estable.

3.3. Linealización y Análisis de Estabilidad

Debido a que el sistema dinámico trabajado es no lineal es necesario utilizar la técnica de linealización para determinar la estabilidad sobre los puntos de equilibrio. Claramente, para linealizar el modelo es necesario precisar primero los puntos de equilibrio en cuestión.

3.3.1. Puntos de Equilibrio

Según los retratos de plano de fase presentados antes, se estima que el sistema tiene un punto de equilibrio estable en aproximadamente 3.000 moléculas de represor y 15 moléculas de proteína verde fluorescente. Sin embargo, esto solo es una estimación y por tanto es necesario determinar de manera precisa todos los puntos de equilibrio del sistema. Para esto, se igualan las ecuaciones diferenciales a cero y se resuelve el sistema de ecuaciones resultante.

$$\begin{aligned}
-\delta_3 TR - \alpha \cdot TR \cdot Tet + \eta ARN_{m_{TR}} + vTRi &= 0 \\
-\delta_3 TRi + \alpha \cdot TR \cdot Tet - vTRi &= 0 \\
-\delta_{tet} Tet - \alpha \cdot TR \cdot Tet + \delta_3 TRi + \zeta u + vTRi &= 0 \\
-\delta_1 ARN_{m_{GFP}} + \frac{\beta_1}{1 + \left(\frac{TR}{K}\right)^n} &= 0 \\
-\delta_2 GFP + \gamma ARN_{m_{GFP}} &= 0
\end{aligned}$$

En MATLAB utilizando la función *vpasolve* se determinó que bajo una entrada cero, existe un único punto de equilibrio, el cual se presenta a continuación.

Molécula	Valor
<i>TR</i>	2998.26
<i>TRi</i>	0
<i>Tet</i>	0
<i>ARN_{m_{GFP}}</i>	0.00144
<i>GFP</i>	14.94

Cuadro 4: Punto de Equilibrio en Entrada Cero

El punto de equilibrio calculado coincide aproximadamente con el punto identificado en los retratos de plano de fase.

Bajo una entrada constante de una (1) dosis de antibiótico, el sistema pasa a otro punto de equilibrio.

Molécula	Valor
<i>TR</i>	47.09
<i>TRi</i>	2,951.17
<i>Tet</i>	7,352,941.17
<i>ARN_{m_{GFP}}</i>	4.16
<i>GFP</i>	43,111.88

Cuadro 5: Punto de Equilibrio con una (1) Dosis Constante de Antibiótico

Para determinar las expresiones que definen de manera general los puntos de equilibrio se utilizó la librería *SymPy* de Python, la cual permite resolver sistemas de ecuaciones no lineales de manera simbólica. **Los puntos de equilibrio del sistema** se describen de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
TR &= \frac{ARN_{m_{TR}} \delta_{tet} \eta (\delta_3 + v)}{\delta_3 (\alpha \gamma u + \delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v)} \\
TRi &= \frac{ARN_{m_{TR}} \alpha \eta \gamma u}{\delta_3 (\alpha \gamma u + \delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v)} \\
Tet &= \frac{\gamma u}{\delta_{tet}} \\
ARN_{m_{GFP}} &= \frac{b_1}{\delta_1 \left(\left(\frac{ARN_{m_{TR}} \delta_{tet} \eta (\delta_3 + v)}{K \delta_3 (\alpha \gamma u + \delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v)} \right)^n + 1 \right)} \\
GFP &= \frac{b_1 \zeta}{\delta_1 \delta_2 \left(\left(\frac{ARN_{m_{TR}} \delta_{tet} \eta (\delta_3 + v)}{K \delta_3 (\alpha \gamma u + \delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v)} \right)^n + 1 \right)}
\end{aligned}$$

Se puede evidenciar que los puntos de equilibrio dependen de la cantidad de dosis aplicadas (*u*).

3.3.2. Modelo Lineal

Se plantea el sistema lineal de la siguiente forma.

$$\dot{x} = Ax + Bu$$

Se calculan los *jacobianos* respectivos y se obtiene el siguiente modelo lineal. La matriz A fue calculada utilizando la función *jacobian* de la librería de cómputo simbólico *SymPy*.

$$\dot{x} = \begin{bmatrix} -Tet\alpha - \delta_3 & v & -TR\alpha & 0 & 0 \\ Tet\alpha & -\delta_3 - v & TR\alpha & 0 & 0 \\ -Tet\alpha & \delta_3 + v & -TR\alpha - \delta_{tet} & 0 & 0 \\ -\frac{b_1 n \left(\frac{TR}{K}\right)^n}{TR \left(\left(\frac{TR}{K}\right)^n + 1\right)^2} & 0 & 0 & -\delta_1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \gamma & -\delta_2 \end{bmatrix} x + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 10000 \end{bmatrix} u$$

Evaluación de Estabilidad en el Punto de Equilibrio de Entrada Cero Se evalúa el modelo lineal en el punto de equilibrio de entrada cero (cuadro 4). La matriz A_0 resultante se presenta a continuación:

$$A_0 = \begin{bmatrix} -0,0173 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -0,0693 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 20,0000 & -0,00190 \end{bmatrix}$$

Se obtienen los valores propios de A_0 .

$$eig(A_0) = \begin{bmatrix} -0,0019 \\ -0,0693 \\ -0,0173 \\ -0 \\ -0 \end{bmatrix}$$

Según lo anterior, *el sistema es estable en el punto de equilibrio de entrada cero*, ya que los signos de la parte real de los autovalores son negativos.

Evaluación de Estabilidad en el Punto de Equilibrio con una Dosis Constante de Antibiótico Se evalúa el modelo lineal en el punto de equilibrio con una (1) dosis constante de antibiótico (cuadro 5). La matriz A_1 resultante se presenta a continuación:

$$A_1 = \begin{bmatrix} -73,5467 & 0,1000 & -0,0005 & 0 & 0 \\ 73,5294 & -0,1173 & 0,0005 & 0 & 0 \\ -73,5294 & 0,1173 & -0,0018 & 0 & 0 \\ -0,0087 & 0 & 0 & -0,0693 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 20,0000 & -0,0019 \end{bmatrix}$$

Se obtienen los valores propios de A_1 .

$$eig(A_1) = \begin{bmatrix} -0,0019 \\ -0,0693 \\ -73,6472 \\ -0,0014 \\ -0,0173 \end{bmatrix}$$

Según lo anterior, *el sistema es estable en el punto de equilibrio con una (1) dosis constante de antibiótico*, ya que los signos de la parte real de los autovalores son negativos.

Evaluación de Estabilidad con u Dosis Constantes de Antibiótico Se evalúa el modelo lineal en el punto de equilibrio asociado la dosis u . La matriz A_u resultante se presenta a continuación:

$$A_u = \begin{bmatrix} -\delta_3 - \frac{\zeta\alpha u}{\delta_{tet}} & v & -\frac{ARN_{mTR} \delta_{tet} \eta \alpha (\delta_3 + v)}{\delta_3 (\delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v + \zeta\alpha u)} & 0 & 0 \\ \frac{\zeta\alpha u}{\delta_{tet}} & -\delta_3 - v & \frac{ARN_{mTR} \delta_{tet} \eta \alpha (\delta_3 + v)}{\delta_3 (\delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v + \zeta\alpha u)} & 0 & 0 \\ -\frac{\zeta\alpha u}{\delta_{tet}} & \delta_3 + v & -\frac{ARN_{mTR} \delta_{tet} \eta \alpha (\delta_3 + v)}{\delta_3 (\delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v + \zeta\alpha u)} - \delta_{tet} & 0 & 0 \\ \frac{\delta_3 b_1 n \left(\frac{ARN_{mTR} \delta_{tet} \eta (\delta_3 + v)}{K \delta_3 (\delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v + \zeta\alpha u)} \right)^n (\delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v + \zeta\alpha u)}{ARN_{mTR} \delta_{tet} \eta (\delta_3 + v) \left(\left(\frac{ARN_{mTR} \delta_{tet} \eta (\delta_3 + v)}{K \delta_3 (\delta_3 \delta_{tet} + \delta_{tet} v + \zeta\alpha u)} \right)^n + 1 \right)^2} & 0 & 0 & -\delta_1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \gamma & -\delta_2 \end{bmatrix}$$

Los autovalores de la A_u permiten determinar la estabilidad de cualquier punto de equilibrio del sistema. No se presentan los autovalores en este escenario debido a su complejidad de cálculo.

3.4. Control

Cómo se ha mencionado previamente, el objetivo del modelo revisado es representar la dinámica de expresión genética del macrófago infectado. Se ha comprobado, a través de los hallazgos, que es posible utilizar tetraciclina para alterar la transcripción de ARN y producir más o menos proteínas de interés. Cabe recordar, que el parásito infecta a la célula cuando ciertas proteínas de ambos organismos interactúan. Sabiendo lo anterior, **modular el proceso infeccioso involucra reducir la producción de proteínas, previamente identificadas como “riesgosas”, a un nivel óptimo** donde el parásito no pueda utilizarlas para infectar y la célula no pierda su función normal.

Dentro del modelo, como se ha indicado antes, la concentración de la proteína verde fluorescente es una evidencia de cierta expresión genética, de modo que puede ser utilizada para estimar la población de otras proteínas. En este escenario, asumiremos que cuando la población de proteína verde fluorescente aumenta, la población de proteínas “riesgosas” disminuye proporcionalmente.

El investigador tiene dos opciones para controlar el sistema. La primera, es aplicar una dosis constante conociendo el punto de equilibrio asociado a esta. Para esto puede utilizar las formulas de la sección 3.3.1 y despejar la dosis necesaria para alcanzar los niveles deseados en las moléculas. Se desconoce si este enfoque es técnicamente viable, en su ejecución y en la posibilidad de afectar de manera permanente a la célula. El segundo enfoque, es aplicar dosis periódicas de tetraciclina con concentraciones determinadas por un controlador PID. El control a aplicar en este trabajo se basa en el segundo enfoque.

Primero se define un set point o valor objetivo. No se posee información acerca de los niveles óptimos de las poblaciones que utiliza el grupo de investigación, así que se toma un valor arbitrario de 100 moléculas de proteína verde fluorescente. A continuación, se presenta una figura de la implementación.

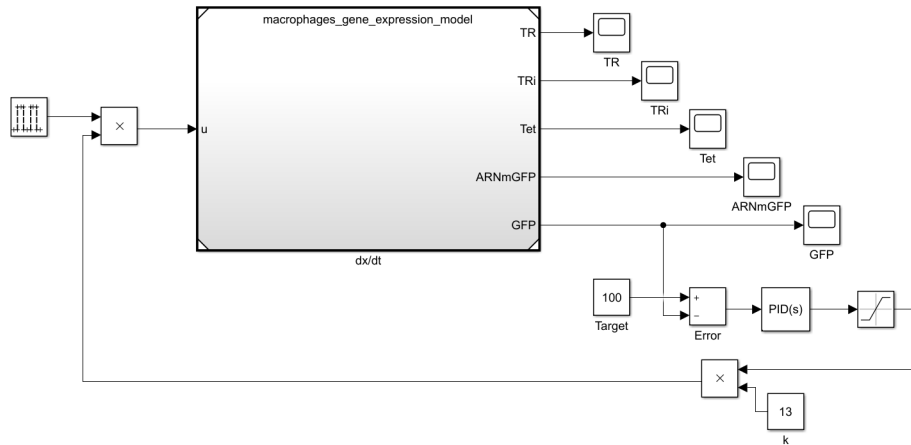


Figura 18: Sistema de Control PID

El bloque controlador recibe el error en la población de la proteína con respecto al objetivo a alcanzar, este aplica un control proporcional, integral, y diferencial sintonizado para llegar al set point suavemente. La señal se satura de cero a infinito porque no existen correcciones de dosis negativas. Adicionalmente, se aplica una operación para estimar el número de dosis necesarias en el ajuste. El control se aplica cada 1.000 segundos. Cabe recordar que si se deja de aplicar la dosis, como se explicó antes, el sistema retornará al punto de equilibrio estable de 15 moléculas de la proteína.

A continuación se presentan los parámetros del controlador PID.

Parámetro	Valor
P	0,00179853319781138
I	$1,40157110989961 \times 10^{-6}$
D	0,568983634209968
N	0,338204342149281

Cuadro 6: Parámetros del Controlador PID

A continuación se presentan los resultados del control sobre la proteína verde fluorescente. Se excluye del análisis las demás poblaciones ya que para el control planteado no son de interés.

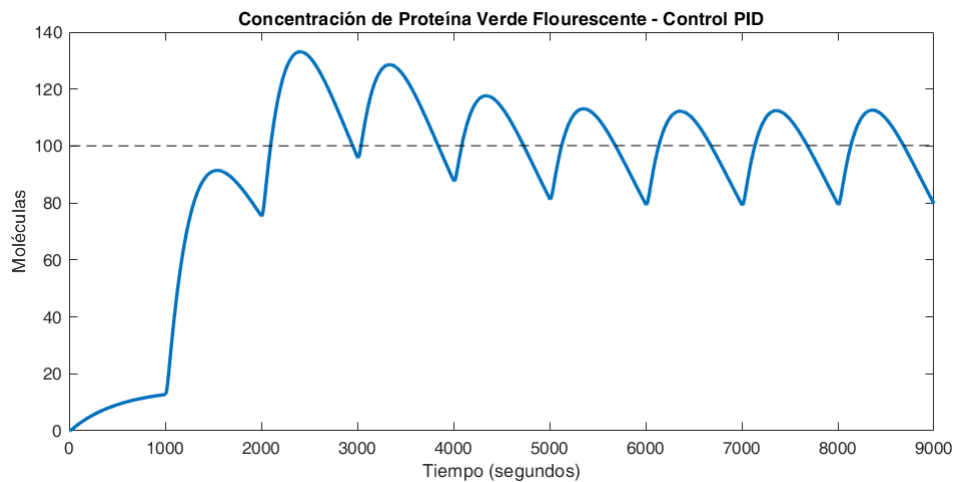


Figura 19: Concentración de la Proteína Verde Fluorescente - Efecto Controlador PID

Se ajustaron los parámetros de diferentes maneras y se seleccionaron aquellos que suavizaron mejor el crecimiento de la proteína. Se realizó un esfuerzo para minimizar el crecimiento acelerado inicial para evitar reducir muy significativamente la proteína “riesgosa”, ya que esta seguramente tiene otras funciones celulares que no deben afectarse. Como se evidencia en la figura *es posible aplicar dosis periódicas para mantener la concentración de proteínas cerca del nivel deseado*. No fue posible encontrar parámetros que mejoraran la variabilidad sobre el set point, ya que como se puede visualizar las fracciones de dosis de ajuste pierden su efecto rápidamente (aproximadamente en 1000 segundos o 17 minutos).

El investigador dispone de intervalos de aproximadamente 17 minutos para analizar el comportamiento de la proteína verde fluorescente, la proteína “riesgosa”, y el parásito.

Barbosa aplica en su investigación un análisis de matriz de controlabilidad sobre el sistema linealizado y determina que este es controlable mientras el receptor de tetraciclina no sea cero [1]. En su trabajo determina que el sistema es completamente controlable debido a que la matriz de controlabilidad de 4×4 tiene rango 4.

Los resultados sugieren que la cantidad de proteína verde fluorescente es controlable a partir de dosis periódicas de antibiótico.

3.5. Estimación de Parámetros

En el trabajo de Barbosa no se reporta el valor del parámetro ARN_{mTR} , el cual corresponde a la tasa de producción del represor de tetraciclina con respecto a su ARN mensajero. Razón por la cual originalmente se realizó una estimación simplificada y se obtuvo un valor de 17.33 moléculas por transcripción.

Este parámetro es de suma importancia, ya que regula directamente la producción basal del represor, por tanto es necesario obtener una estimación más acertada de su valor a partir de la información disponible. Como valores de referencia se utilizarán las concentraciones reportadas de la proteína verde fluorescente en distintos momentos del tiempo bajo el escenario de entrada cero (sin dosis de tetraciclina).

Bajo una entrada cero, Barbosa reporta las siguientes concentraciones de la proteína verde fluorescente [1].

Tiempo (seg)	Moléculas
0	0
1500	14.8
3000	14.9
4500	14.99
6000	14.999
7500	14.9999
9000	15

Cuadro 7: Concentraciones reportadas de la proteína verde fluorescente bajo la entrada cero

La estimación de parámetros se ejecutó en Simulink, aprovechando las herramientas disponibles de análisis de sistemas dinámicos. A continuación, se reporta el valor estimado por el paquete de software.

$$ARN_{mTR} = 17,298001$$

El valor estimado en MATLAB es más acertado que el originalmente asignado, lo cual permite replicar con mayor exactitud los resultados reportados por Barbosa. La siguiente figura muestra en rojo la concentración de la proteína verde fluorescente con el parámetro estimado y en azul las concentraciones tomadas de los resultados de Barbosa.

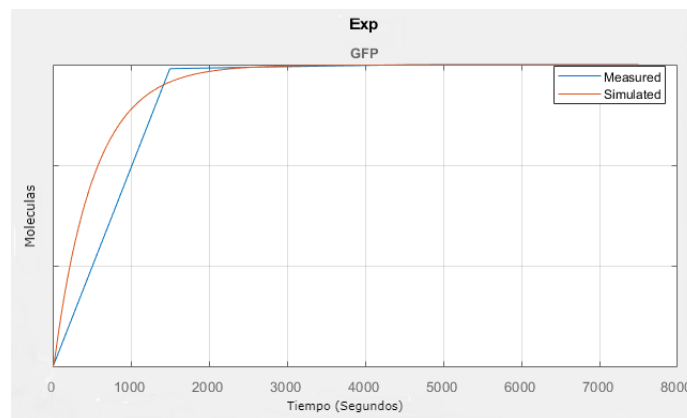


Figura 20: Concentración de proteína GFP en la estimación de parámetros

La estimación es razonable ya que el modelo mantiene su comportamiento y se ajusta mejor a los valores reportados de las concentraciones de moléculas en el macrófago.

4. Discusión

A grandes rasgos, el silenciamiento genético es la alteración de la expresión de ciertos genes de un microorganismo. Su enfoque principal hoy en día es combatir enfermedades como el cáncer, enfermedades

neurodegenerativas, y enfermedades infecciosas. Este método se conoce como “Knock-Down” ya que a diferencia de otros métodos como CRISPR, no elimina el gen sino que lo reduce a una mínima expresión [4]. El silenciamiento genético a tomado fuerza en los últimos años debido a la capacidad que ofrece de experimentar sobre la genética de los organismos y explorar en detalle sus componentes funcionales [4].

Existen otros métodos de modificación genética, como CRISPR, el cual es una herramienta que permite modificar genes específicos en el ADN, cambiar su comportamiento o hasta incluso eliminarlos por completo [9]. CRISPR es más poderoso que el silenciamiento genético, pero esto viene a un precio, el riesgo. El riesgo de modificar un componente esencial del organismo y dañarlo en un nivel prácticamente irreversible. El silenciamiento genético se enfoca en el ARN mensajero y su efecto es temporal, mientras que CRISPR se enfoca en el ADN y su efecto suele ser permanente [3].

Escoger la herramienta apropiada para una investigación en genética suele ser un trabajo complejo, existen guías que apoyan la toma de decisiones según las características de la misma [2]. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que existen barreras éticas y legales frente al uso de estas en mamíferos y en humanos [10].

Los resultados de este trabajo verifican que es posible utilizar silenciamiento genético con antibióticos para modular la expresión de los genes asociados al proceso infeccioso de Leishmaniasis. Se desconocen las razones por las cuales el grupo de investigación seleccionó este método, pero puede inferirse que fue debido a la posibilidad de estudiar genes esenciales y no esenciales. Es posible trabajar sobre genes esenciales, es decir, aquellos que el macrófago necesita para su correcto funcionamiento [6], debido a que el efecto del silenciamiento es temporal y potencialmente reversible. Como se evidenció en los resultados, el sistema se perturba con la dosis de antibiótico pero tiende a volver a su punto de equilibrio estable, esto explica porqué el control debe aplicarse a través de dosis periódicas.

Si el grupo de investigación sospecha que los genes asociados a las proteínas “riesgosas” son no esenciales, sería importante que evaluaran la posibilidad de utilizar CRISPR para modificarlos o incluso eliminarlos, ofreciendo nuevas oportunidades para el tratamiento y prevención de la enfermedad. Si los genes se presumen esenciales, su enfoque debería centrarse en encontrar las concentraciones óptimas de las proteínas que permitan reducir la posibilidad de infección y mantener la funcionalidad celular intacta.

Hipótesis acerca de la aplicación de CRISPR

Si se utiliza el método CRISPR se esperaría que bajo el procedimiento de modificación genética, aumentara la producción de proteína verde fluorescente hasta llegar a un punto de equilibrio estable que representa el silenciamiento completo del gen de interés. El punto de equilibrio es estable ya que la modificación genética es irreversible.

5. Conclusiones

A continuación, se presentan las conclusiones del trabajo.

- El modelo dinámico planteado por Barbosa [1] es consistente con los resultados presentados en su tesis. Los resultados de este trabajo coinciden con los de Barbosa. Se concluye entonces que el modelo es apto para su utilización en la investigación de Leishmaniasis.
- Los resultados del modelo analizado son congruentes con los principios del silenciamiento genético. Las poblaciones de moléculas se comportan efectivamente como se describe en la teoría.
- Existen diferencias no significativas entre los resultados de Barbosa [1] y el modelo dinámico implementado en este trabajo, esto se debe al desconocimiento preciso de la tasa de producción del represor de tetraciclina con respecto a su ARN mensajero.
- Según los resultados obtenidos es posible utilizar el antibiótico tetraciclina para modificar la expresión de un determinado gen de interés en un macrófago infectado con Leishmaniasis Visceral. Esto da paso a los investigadores en el tema a utilizar el modelo para continuar con el desarrollo de vacunas y tratamientos para controlar o incluso evitar la infección.
- A partir del proceso de *linealización*, se determina que los puntos de equilibrio del sistema dependen de la dosis de antibiótico aplicada. En una entrada cero, el represor de tetraciclina se estabiliza en

aproximadamente 3.000 moléculas y la proteína verde fluorescente en 15 moléculas. Existen otros puntos de equilibrio con dosis constantes de antibiótico. Los puntos de equilibrio analizados son estables según el criterio de los autovalores del sistema linealizado.

- Es factible controlar la producción de proteína verde fluorescente con dosis periódicas de antibiótico. Los resultados sugieren que es posible acercarse a los valores objetivo con una cierta variabilidad.
- La tasa de producción del represor de tetraciclina con respecto a su ARN mensajero fue estimada en 17.298 moléculas por transcripción luego de ejecutar el proceso de estimación de parámetros. Esta asignación permite replicar de manera más exacta los resultados reportados por Barbosa.
- Existen diversos métodos de modificación genética, cada uno con impactos distintos sobre la integridad biológica del organismo. Estos métodos requieren primero de determinar con total certeza cuales genes son esenciales y cuales no. Esta clasificación permitirá en gran medida seleccionar la vía más adecuada.
- Si los genes asociados a las proteínas “riesgosas” son clasificados como no esenciales, debe explorarse la utilidad del método CRISPR. En caso contrario, debe definirse al mayor nivel de exactitud posible las fronteras de acción para modular la infección sin afectar la cohesión interna del macrófago.
- Sería interesante incluir dentro del modelo restricciones frente al número de dosis de antibiótico a aplicar a un macrófago para contrarrestar la infección sin afectar negativamente el funcionamiento del glóbulo blanco. Actualmente, el modelo permite aplicar altas dosis de antibiótico de manera continua sin ninguna estrategia de control.
- Sería interesante plantear un modelo similar al revisado que trabaje con promotores y no con represores de ARN mensajero. Es decir, un modelo que ante una cierta concentración de sustancia promueva la síntesis de proteínas sin la necesidad de una modificación genética inicial.

Referencias

- [1] Barbosa Roa, N.A.: *Diseño de un modelo dinámico de la expresión de un gen en una cepa de Macrófagos*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 2010.
- [2] Boettcher M., McManus. M.T.: *Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN or CRISPR*. U.S. National Library of Medicine, Estados Unidos de América, 2015.
- [3] Bryant, K: *RNAi vs. CRISPR: Guide to Selecting the Best Gene Silencing Method for Every Experiment*. Synthego, Junio 2018. <https://www.synthego.com/blog/rnai-vs-crispr-guide>.
- [4] E., Hood: *RNAi: What's All the Noise About Gene Silencing?* Environmental Health Perspectives, 11(4):225–220, Marzo 2004.
- [5] Ramírez González, J.D.: *Colombia, el país con más especies de parásitos de Leishmania*. Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, 2018.
- [6] Roberts, S.C.: *The genetic toolbox for Leishmania parasites*. U.S. National Library of Medicine, Estados Unidos de América, 2011.
- [7] Schlecht, H.P., Bruno C.: *Tetraciclinas*. Merck Sharp & Dohme Corp, Filadelfia, Estados Unidos de América, 2018.
- [8] Spickler, A. R.: *Leishmaniasis (cutánea y visceral)*. The Center For Food Security & Public Health, Iowa Sate University, Iowa, Estados Unidos de América, 2009.
- [9] Vidyasagar, A.: *What Is CRISPR?* Live Science, Abril 2018. <https://www.livescience.com/58790-crispr-explained.html>.
- [10] Zhang, S.: *You May Already Be Immune to CRISPR*. The Atlantic, Enero 2018. <https://www.theatlantic.com/science/archive/2018/01/crispr-humans-immune-system/549974/>.