

Leishmaniasis

BIOLÓGIA MOLECULAR

Epidemiología molecular de la leishmaniasis cutánea americana en la subregión norte del departamento de Antioquia

C. D. Agudelo, L. Posada, J. E. Pérez, L. M. Carrillo, I. D. Vélez

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La leishmaniasis cutánea es una enfermedad originalmente selvática causada por parásitos tripanosomátidos del subgénero *Leishmania*; el norte de Antioquia es la segunda subregión que más casos aporta para el departamento. La importancia de diferenciar las especies del parásito para el análisis clínico y epidemiológico, hace necesaria la implementación de una herramienta que permita no sólo el diagnóstico sino la diferenciación entre especies de manera rápida y eficiente.

Nos propusimos estandarizar una PCR LSSP a partir de la amplificación de fragmentos del minicirculo del kDNA en raspado de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea americana. Se propone el uso del cinetoplasto como molde debido a que se encuentran en un gran número de copias y a que contiene regiones variables y conservadas que permiten detectar diferencias inter e intraespecíficas debidas a la heterogeneidad de estos minicirculos, lo que se traduce la secuencia en un sello genético caracterizado por un único patrón de bandas.

De esta manera, se podría hacer una caracterización de las especies circulantes en cada uno de los miembros del ciclo y plantear un modelo que explique cómo se da el ciclo ecoepidemiológico de la enfermedad, y la relación de los reservorios silvestres domésticos y los vectores, con los casos diagnosticados.

Materiales y métodos. Se hicieron capturas de flebotómicos en reposo y con trampas CDC, Shannon y adhesivas; se realizó el diagnóstico y la identificación de cepas por métodos directos, IFI, PCR LSSP; hubo aplicación de leishmanina; y se estudió la infección de reservorios domésticos y silvestres.

Resultados. Se ha logrado estandarizar con una sensibilidad de 1 parásito por μ l, una PCR convencional que permite amplificar un fragmento de 120 pb del cinetoplasto en parásitos del subgénero *Viannia*; esto como punto de partida para continuar la estandarización de la LSSP-PCR que permita la discriminación entre especies de este subgénero en las muestras de huéspedes, vectores y reservorios que serán recolectadas en la zona de estudio.

• • •

Volúmenes de fagosoma similares a la infección por *Leishmania amazonensis*, alteran la producción de IL-12 en fagocitosis de partículas de látex y es retenida en compartimentos del aparato de Golgi

Ángela P. Rojas¹, Marcela Camacho^{1,2}

¹ Grupo Biofísica y Biología de Membranas, Departamento de Farmacia

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, y Centro Internacional de Física, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La ruta intracelular de efectores inmunológicos secretados por macrófagos y su relación con tránsito vesicular están escasamente descritas. La infección por *Leishmania* disminuye la secreción de óxido nítrico y de factor necrosis tumoral alfa y este decremento se explica parcialmente por el volumen de la vacuola parasitófora.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los fagosomas de diferente volumen en la ruta intracelular y tránsito vesicular de la interleucina 12 (IL-12).

Materiales y métodos. Se activaron macrófagos J774A.1 luego de la fagocitosis de perlas de látex con diferente diámetro y proporción, o infectados con *Leishmania amazonensis*. La expresión de IL-12 se evaluó por PCR en tiempo real, la ubicación intracelular por inmunofluorescencia y microscopía confocal con anticuerpos específicos anti-IL-12 y anti-componentes de la vía endocítica eucariota de secreción clásica, y la secreción por citometría de flujo.

Resultados. Es necesaria la activación por exposición a interferón gama (INF- γ) y lipopolisacárido para la secreción de IL-12. Esta es dependiente de la dosis y bifásica, con un primer pico en las primeras dos horas y uno tardío a las 6 horas después de la activación. La distribución de IL-12 luego de la activación es inicialmente perinuclear y luego de 4 horas es hacia la membrana plasmática. La fagocitosis *per se* no induce secreción de IL-12 en contraste con la infección por *Leishmania* y es necesario activación con INF- γ y lipopolisacáridos. La cantidad y ubicación intracelular de IL-12 en los macrófagos activados es alterada por volúmenes mayores a 160 μm^3 luego de la fagocitosis de perlas de látex o de la infección por *L. amazonensis*. La IL-12 es retenida entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que los volúmenes grandes de fagosoma, entre los cuales estaría los de la vacuola parasitófora de *Leishmania*, alteran la ruta intracelular de IL-12 en vesículas t-SNAREs que contienen SNAP-23, por la vía clásica de secreción y comprometen su producción.



Análisis de una secuencia codificadora para un canal aniónico tipo CLC hipotético, transcrita en *Leishmania*

Camilo Dorado-García¹, Yenny Yolanda Lozano^{1,2}, Martha Lucía Posada^{1,3}, Marcela Camacho^{1,2}

¹ Grupo Biofísica y Biología de Membranas, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro Internacional de Física, Bogotá, D.C., Colombia

³ Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. A lo largo de su ciclo de vida digenético, los protozoos parásitos del género *Leishmania* deben enfrentar cambios drásticos de temperatura, pH y osmolaridad, pero los mecanismos de resistencia a estos cambios no son bien comprendidos. Mediante estudios de expresión heteróloga, nuestro grupo ha identificado una corriente aniónica proveniente del parásito, posiblemente implicada en la regulación del pH y de la osmolaridad. Varias secuencias codificantes para canales aniónicos tipo CLC putativos han sido encontradas en el genoma de todas las especies secuenciadas de *Leishmania*.

En este trabajo se demuestra la transcripción de una de ellas en *Leishmania braziliensis* y se valida

su posible funcionalidad como canal aniónico mediante análisis bioinformáticos.

Materiales y métodos. Se sintetizó cDNA a partir de ARN extraído de promastigotes metacíclicos de *L. braziliensis* utilizando oligonucleótidos cebadores específicos; se amplificó la secuencia LbrM04_V2.1010 (GeneDB), de 3.558 bp, codificante para un canal de cloruro tipo CLC putativo, mediante PCR. A partir de la secuencia reportada en GeneDB se desarrollaron análisis bioinformáticos para determinar la factibilidad de que esta secuencia codificara para un canal aniónico funcional tipo CLC.

Resultados. La secuencia amplificada a partir del cDNA de *L. braziliensis* tiene un tamaño de ~3,5 kb, peso esperado, lo que hace factible que se trate de la secuencia LbrM04_V2.1010. La secuencia reportada presenta alta conservación en los residuos reconocidos como críticos del filtro de selectividad del canal. Presenta ~15 hélices α , cuatro dominios característicos de canales CLC y una alta homología con canales tipo CLC-6 y 7 de mamíferos, típicamente liso-endosómicos. El modelo estructural tiene más de 95% de residuos en regiones permitidas.

Conclusiones. La secuencia LbrM04_V2.1010 de *L. braziliensis* y sus ortólogos en otras especies de *Leishmania*, presumiblemente codifican para un canal aniónico funcional homólogo a canales CLC liso-endosómicos de mamíferos y se transcribe en promastigotes metacíclicos de *L. braziliensis*.



Pull down como estrategia para el aislamiento de factores proteicos que interactúan con regiones no traducidas de ARN mensajero

César Ramírez¹, José María Requena², Concepción J. Puerta¹

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Introducción. La regulación posterior a la transcripción de la expresión génica en tripanosomátidos se manifiesta en puntos como la maduración, la localización y la estabilización de los transcritos, así como en la eficiencia de su traducción. Cada uno de estos hechos está gobernado por la interacción entre motivos *cis-acting* localizados en las regiones no traducidas del ARN (5'UTR y 3'UTR) y factores proteicos

trans-acting. Para facilitar la identificación de estos elementos, se han desarrollado ensayos de unión ARN/proteína. Así, en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana se identificaron proteínas de unión a las regiones 5' y 3' UTR de los genes *HSP70* de *L. braziliensis*.

Materiales y métodos. El ARN de las regiones 5' y 3' UTR, obtenido por transcripción *in vitro*, fue unido a microperlas, las cuales se enfrentaron al lisado citoplasmático total del parásito que, además, contenía un coctel inhibidor de proteasas, inhibidor de ARNasas y ARN competidor. La elución de la proteína específica se hizo en solución tampón de rehidratación y fue resuelta mediante electroforesis en dos dimensiones. El análisis se hizo mediante el software *ImageMaster 2D Platinum 6.0*. Los puntos fueron identificados por MALDI TOF/TOF.

Resultados. Entre las proteínas de unión identificadas se encontraron la RPA1 LbrM.28.1990, específicamente unida a la región 3' UTR-II de los genes *HSP70* de *Leishmania braziliensis* y la proteína mitocondrial de unión a ARN LbrM.23.0850, conocida como Rpb38p, unida a la 3' UTR-I de los genes *HSP70* y a la 3' UTR de los genes α -tubulina.

Conclusión. La técnica de *pull down* es útil para elucidar de manera preliminar las interacciones existentes entre las secuencias específicas de ARN y las proteínas, hecho relevante en el entendimiento de los mecanismos de regulación posteriores a la transcripción; sin embargo, los hallazgos deben ser validados *in vivo*.

• • •

Desarrollo y evaluación de una prueba LAMP para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y la identificación de especies del complejo *guyanensis*, subgénero *Viannia*

P. Guevara¹, A. Lacruz¹, M. G. Boza¹, R. Isea²

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

² Instituto de Estudios Avanzados, Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias, Caracas, Venezuela

Introducción. La leishmaniasis es una enfermedad de amplio espectro en humanos causada por especies del género *Leishmania*. En Latinoamérica varias especies, particularmente del subgénero *Viannia*, están asociadas a las lesiones cutáneas y mucocutáneas de la enfermedad.

La decisión sobre los esquemas de tratamiento depende de un diagnóstico positivo, tradicionalmente realizado con técnicas parasitológicas, microscopía de frotis y cultivo de parásitos, las cuales no identifican la especie de *Leishmania*. Las pruebas de amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP) combinan una alta sensibilidad y especificidad con requerimientos mínimos de infraestructura y capacitación en una tecnología simplificada, representando una alternativa para la identificación de especies simultáneamente al diagnóstico clínico. Estas ventajas nos animaron a desarrollar un ensayo LAMP para las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.

Materiales y métodos. Para el diseño de los iniciadores LeishF3/LeishB3 y LeishF1-F2/LeishB1-B2, requeridos en la prueba LAMP, seleccionamos la región conservada de 120 pb del ADNk y 50 pb de las secuencias variables adyacentes de *Leishmania panamensis* (U19811), y utilizamos el programa PrimerExplorer V3. Normalizamos las condiciones de la prueba LAMP ADNk para un solo conjunto de 72 opciones de iniciadores y evaluamos su especificidad frente a un panel de 19 cepas de referencia que incluían especies de *Leishmania* de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* prevalentes en las Américas, así como *Trypanosoma cruzi*.

Resultados. Este ensayo identificó sólo a las especies del subgéneros *Viannia*, complejo *guyanensis*: *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. shawi*, y detectó hasta 0,01 fracción del genoma del parásito tanto en geles como con SYBRgreen en el tubo de reacción.

Conclusiones. Esta prueba LAMP ofrece la posibilidad de discriminar las infecciones por especies del complejo *guyanensis* de otras especies de *Leishmania* en un sistema cerrado sencillo, utilizando un único tubo donde ocurren la amplificación y la detección, minimizando los riesgos de contaminación.

• • •

Identificación y caracterización bioinformática de proteínas potencialmente involucradas en apoptosis en el genoma de *Leishmania braziliensis*

Jaime A Díaz¹, César Payán², Andrés Pinzón³, Ginna E. Hernández-Neuta¹, Seudy De Hoyos¹, Myriam Salazar¹

¹ Grupo de Investigación en Ciencias Básicas, Fundación Universitaria del Área Andina, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Investigación en Ciencias Básicas Médicas, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Investigación en Bioinformática y Biología de Sistemas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La leishmaniasis humana es una enfermedad de alto impacto en la salud pública de los países tropicales. La comprensión de los mecanismos celulares y moleculares de los procesos de infección de las células huésped por parte de los parásitos del género *Leishmania*, brinda la oportunidad de explorar nuevas alternativas para el control y tratamiento de la enfermedad.

El objetivo de la investigación fue identificar secuencias génicas de *Leishmania braziliensis* que puedan estar relacionadas con la regulación de la apoptosis en células huésped.

Materiales y métodos. Se construyeron dos bases de datos: una con la secuencia del genoma de *L. braziliensis*, y otra con la secuencias de proteínas con función conocida en apoptosis. Estas bases de datos se compararon mediante BLASTx. Los resultados del alineamiento se filtraron tomando como punto de corte un valor e menor de 10E-4 y una longitud mayor a 30 aminoácidos. Se eliminó la redundancia y, posteriormente, se hizo una interpretación biológica del grupo de alineamientos con DAVID. Las secuencias con alineamientos significativos se analizaron estructuralmente para la identificación de los dominios relacionados con la regulación de la apoptosis.

Resultados. A partir de la comparación de las dos bases de datos mediante BLASTx se encontraron 141 alineamientos significativos, después de la depuración se obtuvo una lista de 14 proteínas únicas relacionadas con los procesos funcionales de inhibición de apoptosis, activación de apoptosis y activación de caspasas en células humanas. El análisis estructural permitió la identificación de dominios potencialmente involucrados en la regulación de los procesos apoptóticos en las células huésped.

Conclusiones. Se identificaron secuencias de ADN en el genoma de *Leishmania* que potencialmente pueden codificar para proteínas que se han descrito tienen función pro-apoptótica o anti-apoptótica. Lo que sugiere que *Leishmania* puede tener la capacidad de interferir directamente sobre las vías de la apoptosis de la célula huésped.

• • •

Estructura del nucleosoma en genes transcritos por la ARN polimerasa III en *Leishmania major*

Juan Carlos Vizuet-de Rueda, Luis E. Florencio-Martínez, Rodrigo Moreno-Campos, Santiago Martínez-Calvillo

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de México, México

Introducción. El ADN se asocia a proteínas para formar la cromatina, cuya unidad básica es el nucleosoma, formado por un octámero de histonas. La estructura de la cromatina juega un papel importante en la regulación de la transcripción. Estamos interesados en estudiar la transcripción de la ARN polimerasa III (Pol III), la cual sintetiza moléculas de ARN esenciales para el crecimiento celular, como tRNAs, snRNAs y el rRNA 5S. Debido a que se sabe muy poco sobre la estructura de la cromatina y su papel en la expresión de regiones transcritas por Pol III en protozoarios, el objetivo de este estudio fue analizar la estructura de la cromatina en genes transcritos por Pol III en *Leishmania major*.

Materiales y métodos. Se realizaron digestiones parciales de la cromatina de *L. major* con la nucleasa micrococcal. Las escaleras del nucleosoma se transfirieron a membranas de nylon, para ser usadas en ensayos tipo Southern blot, hibridando con fragmentos correspondientes a regiones transcritas por Pol III y regiones control transcritas por Pol II.

Resultados. Las hibridaciones con varios tRNAs, el snRNA U2 y el rRNA 5S mostraron un claro barrido, indicando la ausencia de nucleosomas en estos genes. Esto a diferencia de los ensayos con genes codificadores de proteínas y regiones intergénicas (Pol II), en los que se observó una estructura del nucleosoma muy evidente.

La estructura de la cromatina en células en crecimiento activo fue similar a la observada en células en fase estacionaria.

Conclusiones. Los genes transcritos por Pol III no están formando nucleosomas, lo cual, posiblemente, se deba a que presentan promotores internos y a que su tasa de transcripción es alta. Por el contrario, los genes codificadores de proteínas, sintetizados por Pol II, presentan un arreglo compacto del nucleosoma.

• • •

Actualización de la distribución geográfica de especies de *Leishmania*, caracterizadas por genética molecular, en el macrofoco de leishmaniasis del Caribe colombiano

Lily Martínez, Margaret Paternina-Gómez, Luis E. Paternina, Alveiro Pérez-Doria, Eduar E. Bejarano
Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia,

Introducción. En Colombia existe un limitado conocimiento sobre la distribución geográfica de las especies que causan leishmaniasis, lo cual se debe a que el diagnóstico de la enfermedad y la instauración del tratamiento se basa casi exclusivamente en el examen microscópico directo, sin precisar la especie de *Leishmania* causal, a pesar de que existe una susceptibilidad diferencial del parásito a los medicamentos empleados. En este trabajo se actualiza la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en el norte de Colombia.

Metodología. Entre marzo de 2010 y marzo de 2011 se recolectaron 47 muestras de pacientes con cuadros clínicos indicativos de leishmaniasis, procedentes de Sucre, Córdoba y Bolívar. Para determinar la presencia de *Leishmania* se amplificó por PCR el kDNA (cebadores 13A/13B), además, se secuenció el gen citocromo b (*CytB*) (cebadores LCytS/LCytR) para identificar, mediante análisis filogenético, las diferentes especies del género *Leishmania*.

Resultados. Mediante kDNA-PCR se demostró la presencia de *Leishmania* en 41/47 (85,41 %) muestras clínicas, mientras que por *CytB*-PCR se lograron 20/47 (42,55 %) amplicones, de los cuales, se obtuvieron 11 secuencias de 599 pb. Los análisis filogenéticos indican que nueve aislamientos cutáneos correspondían a *Leishmania braziliensis* y que dos casos de leishmaniasis visceral fueron causados por *Leishmania infantum*. Con estos datos y los hallazgos previos de los años 2008-2010, se construyó el mapa de la distribución geográfica de especies de *Leishmania* en la Costa Caribe.

Conclusión. Se confirma a *Leishmania braziliensis* como especie predominante en los casos cutáneos y *Leishmania infantum* como agente etiológico del cuadro visceral. A la fecha, cuatro especies de *Leishmania* causan enfermedad en la zona, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*. Se discuten las implicaciones epidemiológicas y clínicas de estos hallazgos.

• • •

Especificidad de la IgA sérica producida en respuesta a antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* en leishmaniasis de múridos

Loredana Goncalves¹, Mary Carmen Pérez-Aguilar¹, Oskarina Hernández¹, Zulay Maizo de Segnini¹, Carmen Haydee Rojas¹, Silverio Díaz¹, Maritza Alarcón²

¹ Laboratorio de Inmunología de Parasitosis, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

² Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

Introducción. En la leishmaniasis experimental, la función de los anticuerpos no está clara. Algunos autores consideran que dichas proteínas no participan en la protección contra la infección; sin embargo, en los estudios histopatológicos de lesiones de leishmaniasis, se encuentran infiltrados de células plasmáticas y secreción de IgM, IgG e IgA, que podrían mediar la formación de complejos inmunológicos con antígenos parasitarios o propios, favoreciendo la necrosis que conlleva a la eliminación del parásito.

En este trabajo se determinó si la IgA sérica en el modelo de múridos posee reacción específica contra antígenos de *Leishmania mexicana* de utilidad diagnóstica.

Materiales y métodos. Se utilizaron sueros de ratones susceptibles BALB/c o resistentes C57BL/6 a leishmaniasis cutánea, además de amastigotes M/HOM/VE/72/AZV de *L. mexicana* y tripomastigotes sanguíneos Elpidio Padrón de *Trypanosoma cruzi* mantenido en ratones NMRI para la obtención de antígenos por fraccionamiento subcelular y para la infección experimental evaluada por medio de la evolución de la lesión. La detección de IgA específica contra *L. mexicana* fue por ELISA, mientras que la especificidad lo fue por inmuno-transferencia.

Resultados. Se demostró que la IgA sérica de ratones sensibles es elevada en comparación con la de los ratones resistentes. La evaluación de la especificidad demuestra que la IgA sérica de ratones infectados con *T. cruzi* reacciona con antígenos de *L. mexicana*. Otros estudios demuestran que la IgG sérica de ratones con *L. mexicana* reacciona en forma cruzada con antígenos no relacionados de *T. cruzi*.

Conclusiones. Se sugiere que la IgA producida por la cepa C57BL/6 puede ser útil como marcador diagnóstico, debido a que las lesiones cutáneas que se desarrollan en estos ratones son menos agresivas que las lesiones que se desarrollan en la cepa BALB/c lo que permite el manejo clínico y el pronóstico de la enfermedad.

• • •

Identificación y evaluación funcional de la nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis*

Luis Ernesto Contreras, María Helena Ramírez
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El aumento progresivo de la resistencia de *Leishmania* ante las medidas de control actuales, plantea la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas a partir del conocimiento de la biología del parásito. La nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT; EC 2.7.7.1), cataliza el paso clave en la biosíntesis del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD⁺). Dado que el metabolismo de este dinucleótido se relaciona con la integridad y el mantenimiento de diversos procesos esenciales, la investigación y caracterización de las enzimas involucradas en su biosíntesis representan un punto clave para el desarrollo de tales estrategias. La identificación de la NMNAT de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT) y la verificación de la identidad funcional de la misma, constituyeron los objetivos del estudio.

Materiales y métodos. Mediante búsquedas bioinformáticas, se identificaron secuencias candidato para la NMNAT en el género *Leishmania*. La secuencia correspondiente se clonó a partir de ADN complementario mediante PCR y se generó la proteína recombinante His-LbNMNAT en el sistema heterólogo *Escherichia coli*. La purificación parcial y la evaluación de la actividad enzimática de la proteína recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad a níquel y ensayos enzimáticos acoplados y directos, respectivamente.

Resultados. Se identificó una única secuencia candidato para la NMNAT de *L. braziliensis*. La amplificación del fragmento génico correspondiente, a partir de ADN complementario, demostró la expresión del gen en la fase móvil del parásito. La proteína recombinante His-LbNMNAT generada, se purificó de manera parcial y se utilizó para ejecutar ensayos enzimáticos, los cuales permitieron comprobar la síntesis de NAD⁺ por parte de la enzima, demostrando de manera contundente su identidad funcional de nucleotidiltransferasa.

Conclusiones. Este estudio se constituyó como la primera evidencia experimental en aproximarse al metabolismo del NAD⁺ en *Leishmania*, mediante la identificación de la NMNAT en este importante agente patógeno.



Expresión génica de dos canales de cloruro en promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis*

Marvin Carreño^{1,2,4}, Martha Lucía Posada^{1,3,4}, Marcela Camacho^{1,2,4}

¹ Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

³ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Leishmania* tiene procesos únicos como expresión policistronica y regulación posterior a la transcripción de mRNA, que puede inducir diferencias en expresión génica entre estadios. Durante su ciclo de vida, este parásito experimenta condiciones cambiantes de pH, osmolaridad y concentraciones iónicas. Los mecanismos para adaptarse a estos cambios y captar nutrientes implican bombas H⁺ATPasas acopladas a canales de cloruro.

Este trabajo buscó estudiar la expresión de los genes *LbrM33_V2.1260* y *LbrM01_V2.0210* en promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Materiales y métodos. Se aisló ARN total con trizol a partir de promastigotes en fase estacionaria *L. (V.) braziliensis* (HOM/BR/75M2903), amastigotes axénicos y macrófagos infectados a diferentes tiempos después de la infección. Se obtuvo cDNA con el kit SuperScript® III. Se diseñaron oligonucleótidos específicos de *Leishmania* con el iniciador BLAST para fragmentos con tamaños de 190 y 950 pb de *LbrM33_V2.1260* y *LbrM01_V2.0210*. Luego de RT-PCR, los productos se valoraron por electroforesis en geles de agarosa, se secuenciaron y se hizo análisis bioinformático.

Resultados. Se obtuvieron productos con el peso esperado para *LbrM33_V2.1260* y *LbrM01_V2.0210* en promastigotes, amastigotes axénicos y para todos los tiempos después de la infección, excepto *LbrM01_V2.0210* a 0,5 horas después de la infección. La secuenciación mostró similitud de 99 % para *LbrM01_V2.0210*, y de 91 % para *LbrM33_V2.1260*. El análisis bioinformático con proteínas homólogas indica que los fragmentos podrían pertenecer a un canal CIC. El análisis cualitativo de la expresión muestra diferencias entre los diferentes estadios.

Conclusiones. *Leishmania braziliensis* expresa los genes *LbrM01_V2.0210* y *LbrM33_V2.1260* que codificarían para un canal de cloruro CIC, el primero, y un canal de cloruro putativo, el segundo. La expresión diferencial de los canales podría indicar mecanismos de regulación génica importantes en una acción conjunta con la bomba H⁺ATPasa tal como en la ruta endocítica intracelular de mamíferos, para ajustarse a las variaciones de pH y osmolaridad en los diferentes estadios.

Identificación de un canal de cloruro de *Leishmania braziliensis*

Nicolás Quintero^{1,2}, Yenny Yolanda Lozano^{1,3}, Martha Lucía Posada^{1,4}, Marcela Camacho^{1,2}

¹ Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

³ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Leishmania* presenta un ciclo de vida alternante entre dos estadios en huéspedes con distintas condiciones de osmolaridad, temperatura y pH. La expresión de proteínas de membrana es una estrategia para su adaptación y supervivencia y, en especial, los canales de cloruro son de gran importancia. Los registros electrofisiológicos de nuestro grupo revelan corrientes aniónicas mediadas por una o más moléculas expresadas por el parásito; por lo tanto, en este trabajo se identificó una secuencia putativa que codificaría para una proteína candidata a ser responsable de esas corrientes.

Materiales y métodos. A partir de promastigotes de *Leishmania* se realizó extracción de ARN total, se verificó su integridad por electroforesis y se sintetizó cDNA. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores para la amplificación de la secuencia del gen putativo *LbrM32_V2.3670*, mediante PCR. El producto amplificado se observó en gel de agarosa y se envió a secuenciación. Mediante métodos bioinformáticos se hicieron alineamientos múltiples, árboles de homología y modelado estructural de la proteína.

Resultados. Se obtuvo un producto parcial de 1.104 pb, peso esperado, en *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y el ortólogo *LmjF.32.3370* de *L. major* y un producto (gen completo) de 2.655 pb, peso esperado, en *L. braziliensis*. La secuenciación parcial indica que corresponde con la reportada (GeneDB). Los alineamientos ubicaron la secuencia como canal de cloruro dependiente del voltaje, cercano a los canales de cloruro intracelulares en mamíferos CLC-6. Del análisis estructural de la secuencia se encontraron características propias de canales CLC, como segmentos transmembrana, dominios y residuos conservados en el poro de selectividad.

Conclusiones. Este es el primer trabajo en el que se demuestra la transcripción del gen *LbrM32_V2.3670* en *Leishmania*. El modelo bioinformático predice que el comportamiento funcional de la

proteína codificada por esta secuencia es el de un canal de cloruro dependiente de voltaje.

Análisis de transcripción del gen de ARN de transferencia de selenocisteína en *Leishmania major*

Norma Edith Padilla-Mejía, Luis Enrique Florencio-Martínez, Santiago Martínez-Calvillo

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

Introducción. *Leishmania major* es un parásito protozooario que presenta mecanismos de expresión genética inusuales, como la transcripción policistronica y el *trans-splicing*. Nuestro interés está dirigido al estudio de la transcripción de la ARN polimerasa III, la cual sintetiza los ARNs de transferencia (tRNAs). Por análisis *in silico* identificamos previamente un gen de tRNA de selenocisteína (*tRNA-Sec*) en el cromosoma 6 de *L. major*, el cual posee secuencias promotoras (cajas A y B intragénicas) atípicas en comparación con otros tRNA. Así, el objetivo del estudio fue analizar la transcripción del *tRNA-Sec* de *L. major*.

Materiales y métodos. Se realizaron ensayos de 5'-RACE y 3'-RACE para conocer los sitios de inicio y término de la transcripción del *tRNA-Sec*, respectivamente. Los cDNAs resultantes se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector pGEM-T para después ser secuenciados.

Resultados. El análisis de las secuencias obtenidas del 5'-RACE reveló que, sorpresivamente, los transcritos del *tRNA-Sec* de *L. major* contienen el miniexón en su extremo 5'. Asimismo, el ensayo 3'-RACE demostró que el *tRNA-Sec* es poliadenilado en su extremo 3'. Actualmente realizamos ensayos de *run-on* nuclear para determinar la ARN polimerasa encargada de sintetizar al *tRNA-Sec*.

Conclusiones. De manera similar a los RNAm, a los transcritos del RNAt-Sec de *L. major* se les adiciona un miniexón en el extremo 5' y una cola de poliadeninas en 3', lo cual sugiere la participación de la ARN polimerasa II en su transcripción. Estamos realizando diversos experimentos para verificar esta hipótesis.

• • •

Análisis de diversidad de poblaciones de cepas de *Leishmania panamensis* mediante tipificación por microsatélites

Rafael Góngora¹, Emily Adams², Nancy Gore Saravia¹, María Adelaida Gómez¹

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e

Investigaciones Medicas, CIDEIM, Cali, Colombia
² Royal Tropical Institute, KIT, Amsterdam, Netherlands

Introducción. La tipificación de especies del complejo *Leishmania (Viannia)* ha sido abordada mediante aproximaciones metodológicas como electroforesis de isoenzimas, inmunofluorescencia y restricción enzimática. No obstante, la similitud genética de las especies del subgénero *Viannia* es un potencial limitante para estudios de diversidad y estructura de poblaciones entre especies e intraespecies. Recientemente, Oddone, *et.al.* (2009) describieron una metodología de genotipificación por microsatélites (MLMT) para el análisis de poblaciones de *Leishmania braziliensis* y *L. guyanensis*.

En este estudio presentamos la aplicación de estos marcadores para el análisis de diversidad de poblaciones en cepas clínicas colombianas de *L. panamensis*.

Métodos. Se incluyeron 31 cepas clínicas de *L. panamensis* obtenidas en los departamentos de Antioquia, Chocó, Valle, Cauca, Nariño, Putumayo, Caquetá y Meta, previamente tipificados por anticuerpos monoclonales. Se amplificaron catorce microsatélites distribuidos en 13 cromosomas a partir de ADN total de promastigotes. El tamaño de los microsatélites se determinó mediante migración de los productos de PCR en geles de agarosa al 4,5 %, por *Quantity One®* (BioRad), y se confirmó mediante análisis automatizado de fragmentos. Las distancias genéticas se estimaron y visualizaron utilizando los *softwares* MSA, POPULATIONS y MEGA 4.

Resultados. La tipificación por microsatélites reveló un alto grado de diversidad genética en este grupo de cepas de *L. panamensis*. Mediante el análisis de distancias genéticas se evidenciaron dos conglomerados principales que corresponden a cepas del noroccidente y suroccidente del país, en consonancia con las rutas de movilidad de los pueblos en estas regiones. Notablemente, aun a nivel focal, las cepas de los pacientes residentes a lo largo de la cuenca del río Mira (Nariño) presentaron una amplia diversidad.

Conclusiones. Estos resultados confirman la factibilidad de determinar la diversidad y estructura de poblaciones de *L. panamensis* por MLMT, lo que permite su aplicación en los estudios de patrones de transmisión de *L. panamensis* en Colombia. Financiado por COLCIENCIAS 2229-519-28948 y Swiss National Science Foundation.



Predicción de potenciales inhibidores de cinasas en *Leishmania* spp. implementando máquinas de aprendizaje

Rodrigo Ochoa, Andrés Flórez, Carlos Muskus
 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. Las cinasas son un grupo de enzimas esenciales para el desarrollo de diversos procesos bioquímicos, y se han identificado en varias especies como potenciales blancos terapéuticos. En este proyecto se hizo uso de información reportada sobre las interacciones entre compuestos y cinasas, para el diseño de una máquina de aprendizaje basada en teorías de inteligencia artificial, capaz de clasificar automáticamente los compuestos existentes como potenciales inhibidores de cinasas en *Leishmania* spp.

Materiales y métodos. Se recopilaron datos sobre la bioactividad de compuestos sobre cinasas de diversas especies, a partir de dos bases de datos: DrugBank y KinaseSARfari. La estrategia consistió en codificar las cinasas como vectores binarios que representen la ausencia o presencia de dominios específicos dentro de la cadena de aminoácidos de la enzima, con los cuales se construyó un sistema de predicción de actividad inhibitoria por cada compuesto reportado.

Para el proceso de codificación se diseñaron protocolos personalizados usando lenguajes de programación. Además, se incorporó una estrategia en la codificación para identificar el orden estricto de los dominios en la secuencia. Las máquinas fueron entrenadas haciendo uso de los datos reportados en las bases de datos, para ser implementadas posteriormente con las cinasas pertenecientes a *Leishmania* spp.

Resultados. Las máquinas de aprendizaje entrenadas tuvieron una precisión aproximada del 75 % en la clasificación, para un total de 3.065 máquinas diseñadas (cada máquina representa un compuesto con más de 5 blancos reportados en la literatura). Las máquinas fueron implementadas sobre 257 secuencias de cinasas de *Leishmania* spp. anotadas en la base de datos UniProt. Todo el protocolo de codificación, entrenamiento y prueba de las máquinas fue automatizado y documentado.

Conclusiones. Mediante esta estrategia *in silico*, basada en herramientas de inteligencia artificial,

se identificaron inicialmente medicamentos que potencialmente podrían inhibir blancos moleculares en *Leishmania* spp. Sin embargo, se incorporarán datos adicionales a la presencia o ausencia de dominios, con el fin de mejorar la predicción de los potenciales inhibidores.

El canal de cloruro putativo LbrM01_V2.0210 de *Leishmania* genera corrientes de cloruro sensibles a pH y osmolaridad

Yenny Yolanda Lozano^{1,2}, Martha Lucía Posada-Buitrago⁴, María Elisa Forero¹, Marcela Camacho^{1,3}

¹ Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

³ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Leishmania* presenta dos estadios: uno extracelular, en el intestino del insecto vector (pH de 7,0-8,0), sujeto a un gradiente de osmolaridad y un estadio intracelular, que habita vacuolas parasitóforas en el macrófago (pH 4,5-5,5). Para adaptarse a las fluctuaciones de pH, osmolaridad y adquirir nutrientes, *Leishmania* genera un gradiente de protones con H⁺-ATPasas acopladas a transportadores aniónicos. Hemos descrito corrientes de cloruro luego de inyección de mRNA de *Leishmania* en ovocitos de anfibio y mostrado la expresión de canales cloruro putativos

en promastigotes. En este estudio la expresión del gen *LbrM01_V2.0210* en células HEK induce corrientes de cloruro.

Materiales y métodos. Con ARN total de promastigote de *Leishmania (Viannia) braziliensis* se sintetizó cDNA y se amplificó el fragmento codificador para el canal putativo CIC-*LbrM01_V0210*. El producto se ligó al vector de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO. Se secuenció el plásmido recombinante y se hizo análisis bioinformático. Se transfectaron transitoriamente células HEK293 y se midieron las propiedades eléctricas con *patch clamp* en configuración de célula entera.

Resultados. La secuencia obtenida presenta homología de 99 % con la reportada en *GeneDB*, y de 91 % con canales de cloruro CIC-3 de *Homo sapiens*. La marcación con anticuerpos anti-CIC3 se ubica en la membrana plasmática y bolsillo flagelar de *Leishmania*. La transfección de HEK293 con *LbrM01_V0210* induce corrientes dependientes de voltaje rectificadoras de salida, que aumentan en solución hipotónica, pH ácido y son bloqueadas con inhibidores de canales aniónicos. Estas propiedades electrofisiológicas son compatibles con un canal de cloruro.

Conclusión. La expresión del gen *LbrM01_V2.0210*, la presencia de una proteína similar a CIC3 en la membrana celular y el bolsillo flagelar y el comportamiento electrofisiológico en un sistema heterólogo sugieren que este parásito expresa canales de cloruro dependientes de voltaje que podrían asociarse con la regulación del pH y la osmolaridad.

• • •