

A. Miranda¹, J.E. Calzada¹, A. Saldaña¹, F. Samudio^{1,2}, A. Brandao²
¹Instituto Conmemorativo Gorgas para Estudios de la Salud, Panamá
²Instituto Oswaldo Cruz, Brasil

INTRODUCCIÓN

Los parásitos de *Leishmania* presentan una alta variabilidad genética que resulta en diferentes comportamientos e interacciones con sus hospederos y con el medio ambiente. Esta diversidad se hace visible en las características particulares que presentan las distintas especies en cuanto a su biología e impacto clínico sobre el humano. El gen de la calmodulina es esencial para modular el metabolismo del calcio en varias actividades celulares en los tripanosomátidos como *Leishmania* (Hoefflich K, Hikura M, 2002). Este gen se encuentra en varias copias dentro del genoma (codifican para la misma proteína) separadas por el espaciador intergénico (contiene la región intergénica y las regiones no traducidas (UTR) 3' UTR y 5' UTR (Figura 1). Aunque evolutivamente está muy conservado, su región 3' UTR presenta variaciones que podrían tener implicaciones epidemiológicas importantes. Por ello nos hemos propuesto estudiar esta región del gen de calmodulina en *Leishmania*.

METODOLOGÍA

- Para conocer el tamaño del espaciador intergénico y las posibles diferencias en el peso molecular de diferentes cepas de referencias de *Leishmania*, se diseñó una PCR dirigida a amplificar el espaciador intergénico de las distintas especies.
- Para evaluar la utilidad de esta región del gen de calmodulina como marcador genético de especies de *Leishmania*, se estandarizó una técnica de RFLP, digiriendo el producto amplificado con diferentes enzimas de restricción.
- Una vez estandarizados, estos procedimientos se aplicaron en cepas aisladas de pacientes procedentes de diferentes regiones de Panamá.

RESULTADOS

- En todas las especies de *Leishmania* analizadas el fragmento del espaciador intergénico amplificado resultó de un tamaño de 1,200 pb (Figura 2). Este PCR resultó ser específico para el género *Leishmania* y presentó un límite de detección de 1 pg.
- La técnica PCR-RFLP empleando las enzimas BstUI, HaeIII, RsaI y Sau3AI por separado, produjo un patrón de digestión particular para las especies *L. (L) mexicana*, *L. (L) amazonensis*, *L. (L) chagasi* y *L.(V) lainsoni* (Figura 3). Con estas cuatro enzimas, las especies *L.(V) panamensis*, *L.(V) guyanensis* y *L.(V) braziliensis* presentaron un patrón de digestión idéntico, lo que permite agrupar a estas especies dentro del subgénero *Viannia*, pero no permite diferenciarlas a nivel de especie (Figura 3).
- Las cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes panameños presentaron un patrón de digestión que coincidió con el de las cepas de referencia pertenecientes al subgénero *Viannia*. La evaluación con otros marcadores moleculares confirmó que taxonómicamente se trataban de *L. (V) panamensis*.

DISCUSIÓN

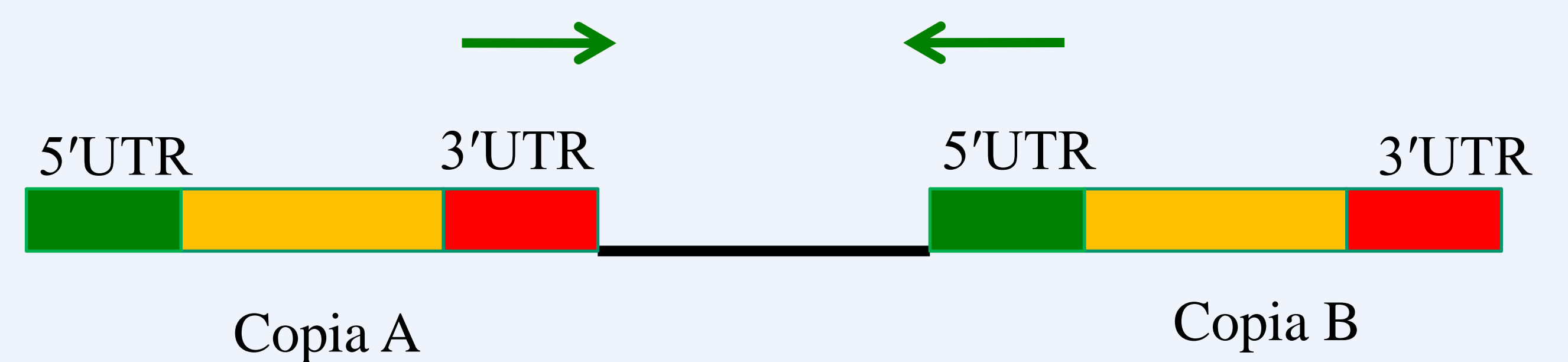
En la primera fase de este estudio evaluamos la utilidad del espaciador intergénico del gen de la calmodulina como marcador molecular para detectar parásitos de *Leishmania* y su capacidad de distinguir entre diferentes especies. Hemos desarrollado una metodología para el diagnóstico molecular de *Leishmania* con alta sensibilidad (1pg) y que permite caracterizar hasta el nivel de especies en algunas cepas y hasta subgénero en otras.

En una segunda fase estamos evaluando la posibilidad de usar esta región del gen como marcador molecular de distintas variables epidemiológicas de la leishmaniasis en Panamá. Para ello hemos amplificado, clonado y secuenciado la región 3' UTR - calmodulina en 7 cepas de *L. (V) panamensis* aisladas de diferentes regiones del país. Los resultados preliminares demuestran la presencia de mutaciones naturales intra-específicas (Figura 4). Se está evaluando si estas variaciones genéticas están asociadas con características fenotípicas del parásito como virulencia, comportamiento *in vitro*, procedencia, etc.

Nuestros resultados demuestran la utilidad del espaciador intergénico del gen de la calmodulina como marcador molecular para la detección y caracterización de parásitos de *Leishmania*. Además, demuestran su potencial como herramienta molecular para complementar estudios sobre la epidemiología de la infección, y sobre los mecanismos de interacción entre el parásito y su hospedero.

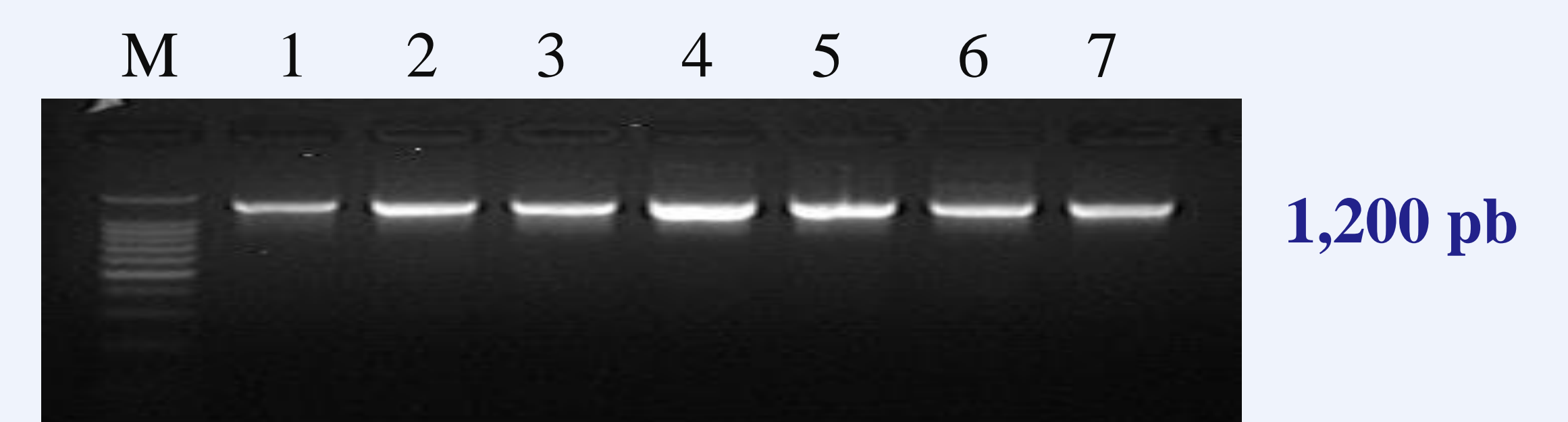
Este estudio fue parcialmente financiado por SENACYT COL08-080 y el SNI .

Fig. 1. Esquema del gen que codifica la proteína calmodulina.



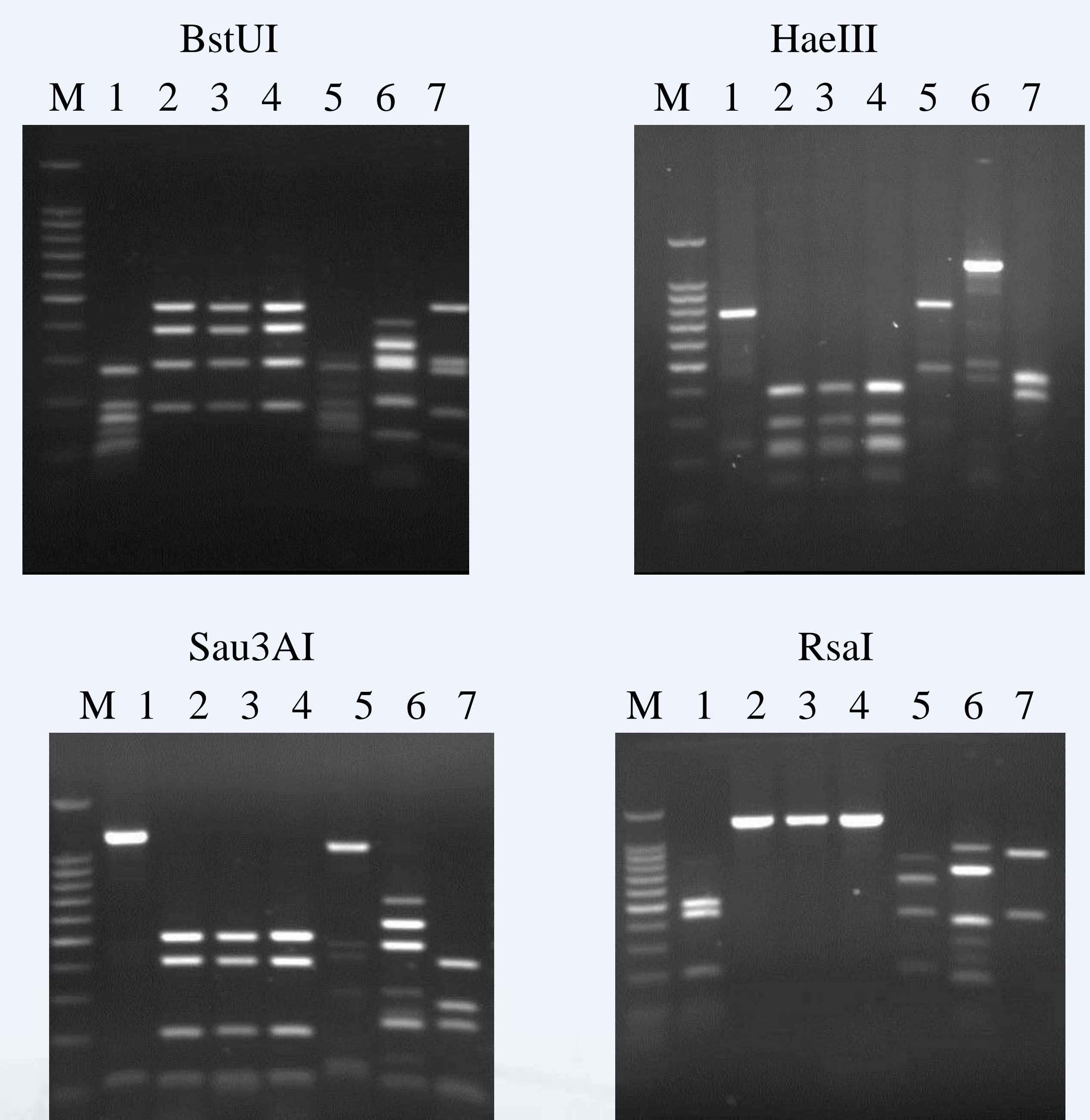
El gen se encuentra en varias copias separadas por el espaciador intergénico (región intergénica flanqueada por las regiones no traducidas (UTR) 3' UTR y 5' UTR). Las flechas indican las posiciones donde se alinean los oligonucleótidos.

Fig. 2. PCR del espaciador intergénico de calmodulina



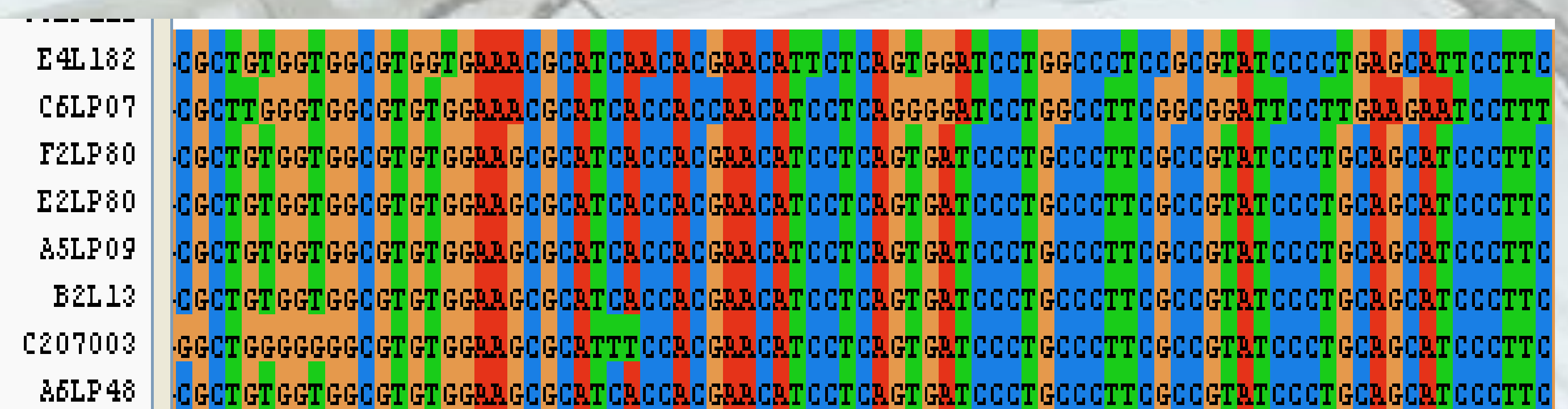
1: *L. (L) mexicana*, 2: *L. (L) amazonensis*, 3: *L. (L) chagasi*, 4: *L. (V) guyanensis*, 5: *L. (V) panamensis*, 6: *L. (V) braziliensis*, 7: *L. (V) lainsoni*, M: marcador molecular 1 Kb

Fig. 3. Patrones de digestión del producto del espaciador intergénico de calmodulina con diferentes enzimas de restricción



1: *L. (L) mexicana*, 2: *L. (V) guyanensis*, 3: *L. (V) panamensis*, 4: *L. (V) braziliensis*, 5: *L. (L) amazonensis*, 6: *L. (L) chagasi*, 7: *L. (V) lainsoni*, M: marcador molecular 1 Kb

Fig. 4 Mutaciones intraespecíficas en la región 3' UTR



Cepas de *L. panamensis* aisladas de pacientes panameños

Fig. 5 Lesiones de leishmaniasis en pacientes panameños

