

Estudio de la variabilidad intraespecífica del gen de fosfomanomutasa en *Leishmania braziliensis* y su correlación con la capacidad infectante.

Study of intraspecific variability phosphomannomutase gene in *Leishmania braziliensis* and its correlation with infectivity.

Florez Muñoz Angel Alberto¹, Dea-Ayuela María Auxiliadora², Francisco Bolás Fernández³.

Resumen

Los protozoos del género *Leishmania*, sintetizan glicoconjugados ricos en manosa (MAN), en su activación está implicada la enzima fosfomanomutasa (PMM), la cual ha sido estrechamente relacionada con mayor capacidad de virulencia y supervivencia del parásito. Realizamos un estudio para determinar la variabilidad intraespecífica de cepas *Leishmania braziliensis*, aportadas por los laboratorios INLASA y UMSA, de la Paz, Bolivia. Se efectuaron infecciones in vitro en macrófagos, una PCR, RFLP para la PMM, y correspondiente análisis bioinformático de los productos de secuenciación, con los programas BioEdit® y MEGA5®. Finalmente se construyeron árboles filogenéticos con el test UPGMA. Posteriormente se llevó a cabo una correlación simple de las variables bajo estudio. Los resultados obtenidos, muestran que las cepas INL (522, 11, 413) presentan promedios totales de infección más altos (superior a 700 amastigotes); las cepas L, presentan promedios totales de infección más bajos (0 a 400 amastigotes). Igualmente, el marcador molecular (PMM) empleado no permitió mostrar variabilidad intraespecífica de las cepas INL, no existiendo correlación entre mayor capacidad de virulencia, y los perfiles electroforéticos de enzima PMM, y distribución filogenética de la enzima PMM, en el Test UPGMA. Por el contrario las cepas L, presentaron variabilidad intraespecífica, pero no estuvo asociada a mayor capacidad de infección. El análisis del árbol obtenido por UPGMA, mostró valores bootstrap en las cepas INL ($\geq 70\%$) y en cepas L (99%). Se deben realizar estudios con mayor número de enzimas de restricción de la PMM que nos permitan determinar una variabilidad intraespecífica del parásito.

(1). Mvz. M.Sc, Escuela Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto Universitario de la Paz UNIPAZ, Barrancabermeja, Colombia, angelflorezmvz@hotmail.com

(2). PhD, Departamento Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.

(3). Phd, Departamento de Farmacia, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, España.

Palabras clave: *Leishmania*, fosfomanomutasa, macrófagos, virulencia, filogenética.

Abstract

Protozoa in the genus *Leishmania*, synthesized high-Mannose glycoconjugates (MHG), the enzyme is involved in activation phosphomannomutase (PMM), which has been closely linked with a greater capacity for virulence and survival of the parasite. We conducted a study to determine intraspecific variability of strains of *Leishmania braziliensis*, provided by laboratories INLASA and UMSA, the Paz, Bolivia. Infections in vitro into macrophages, PCR, RFLP to the PMM were carried out, and the corresponding bioinformatic analysis of the products of sequencing, with the BioEdit ® and MEGA5 ® programs. Finally constructed phylogenetic trees using the UPGMA test. Subsequently conducted a simple correlation of the variables under study. The results, show that INL (522, 11, 413) strains have higher overall infection averages (more than 700 amastigotes); L strains, present total infection averages low (0 to 400 amastigotes). Likewise, the molecular marker (PMM) used did not allow show intraspecific variability of the INL strains, there is no correlation between a greater capacity for virulence, and the PMM enzyme electrophoretic profiles, and phylogenetic distribution of the enzyme PMM, in the UPGMA Test. Instead L strains, showed intraspecific variability, but it was not associated with a greater capacity for infection. The analysis of the tree obtained by UPGMA, showed values bootstrap in INL strains ($\geq 70\%$) and strains L (99%). Studies should be with more number of restriction enzymes of the PMM, which will allow us to determine intraspecific variability of the parasite.

Keywords: *Leishmania*, phosphomannomutase, macrophages, virulence, phylogenetic.

Introducción

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades producidas por protozoos del género *Leishmania* transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya* (García 2005; Quesada *et al.*, 2005). El agente etiológico es un protozoario dimórfico que pertenece a la familia Trypanosomatidae, del género *Leishmania* (orden kinetoplastida). Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica (Herwaldt 1999).

Esta parasitosis se contempla dentro del grupo de enfermedades tropicales descuidadas (Neglected Tropical Diseases). Es prevalente en 98 países, 3 territorios y 5 continentes. Se estiman unos 1.3 millones de casos nuevos al año, aunque en realidad solamente se reporta la mitad. Unos 300000 casos corresponden a la enfermedad visceral (90% en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) y 1 millón a la forma cutánea (principalmente en Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú,

Arabia Saudita, Siria y Túnez) o a la mucocutánea (sobre todo en Brasil, Perú y Bolivia). De los 1,3 millones casos estimados, solo cerca de 600000 son actualmente reportados (Alvar *et al.*, 2012).

La leishmaniasis cutánea localizada es una de las patologías cutáneas más frecuentes en habitantes de zonas tropicales, y *Leishmania braziliensis* es el principal agente etiológico en América del Sur (García 2005; Quesada *et al.*, 2005).

Además el intercambio genético que sufren estos parásitos, es crucial para su sobrevivencia. Los híbridos pueden permitir la adaptación a nuevos nichos ecológicos, vectores y hospederos incluyendo humanos y animales domésticos (Miles *et al.*, 2009; Calvopina *et al.*, 2006). También, *Leishmania braziliensis* presenta una alta variabilidad genética intraespecífica (Cupolillo *et al.*, 2003; Buitrago *et al.*, 2005), y ha sido descrita como la especie más heterogénea (Ishikawa *et al.*, 2002).

En los últimos tiempos el avance de la tecnología ha permitido mejorar la identificación y caracterización de este parásito, especialmente en los métodos moleculares, como el análisis del ADN kinetoplastídico (ADNk), la técnica de PCR seguida de la restricción del producto amplificado (PCR-RFLP) o el uso de genes diana como el gen del citocromo b (cyt b), muy útil en la identificación de las especies de *Leishmania* (Luyo *et al.*, 2004). Así mismo estudios previos sobre el análisis del material genético han permitido la caracterización molecular de las poblaciones de *Leishmania* circulantes en las diferentes regiones endémicas (Fraga *et al.*, 2010; Mauricio *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario considerar la búsqueda de un marcador molecular que permita analizar los clones en una misma especie (Akopyants *et al.*, 2009; Criscione *et al.*, 2005).

Es importante mencionar, que los protozoos del género *Leishmania*, sintetizan una amplia gama de glicoconjugados ricos en manosa (MAN). La activación de MAN, implica la enzima fosfomanomutasa (PMM), GDP-Man pirofosforilasa (GDPMP) y dolicolfosfato-MAN sintasa (DPMS), ruta bioquímica fundamental, como se ha demostrado en experimentos con otros microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Hashimoto *et al.*, 1997; Colussi *et al.*, 1997). Se ha visto que mutantes de *Leishmania* con defectos globales en el metabolismo de la manosa no son capaces de infectar macrófagos o sobrevivir en modelos animales altamente susceptibles (Garami; Garami *et al.*, 2001). Se han generado parásitos *Leishmania major* deficientes fosfomanomutasa (Δ PMM), que son no virulentos y no persistentes in vivo, pero viables in vitro (Ilgoutz, McConville 2001).

Se debe resaltar que este estudio, reviste importancia, ya que determinados sistemas enzimáticos como la fosfomanomutasa (PMM), se han asociado estrechamente con la virulencia, y por tanto su identificación y caracterización,

en diferentes poblaciones de *Leishmania*, puede constituir un buen marcador de patogenidad del parásito, mediante la identificación de la variabilidad intraespecífica del gen fosfomanomutasa (PMM) en cepas de *Leishmania braziliensis* y su relación con la capacidad de infección.

Material y métodos

1. Descripción de los aislamientos de *Leishmania* usados en el estudio.

Las cepas INL (524, 606, 213, 459, 412, 505, 481, 11, 626, 554, 582, 466, 448, 464, 484, 503, 2, 522, 413, 65, 436, 415, 485, 474), fueron aportadas por el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (Inlasa); las cepas L (LB2, LB3, LC3, LD1), fueron aportadas por la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), en la ciudad de La Paz, Bolivia. Todas las cepas fueron aisladas de pacientes. Se utilizó una cepa referencia de *L. braziliensis* (M2904), y las cepas IIFB y 396, *Leishmania lainsoni*, como cepas control género.

2. Cultivos y conservación de cepas de *Leishmania*.

Los promastigotes de las distintas cepas fueron mantenidas mediante cultivos *in vitro* en medio de cultivo *Schneider's Drosophila Medium* (Sigma).

3. Cultivo y línea celular (macrófagos murinos J774)

Se utilizó la línea celular J774 con capacidad adherente, y fueron mantenidas mediante cultivos *in vitro* en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma).

4. Infección *in vitro* de Macrófagos J774 con *Leishmania*.

En placas de Lab-Tekde 8 pocillos estériles, a continuación se añadieron células J774 (50.000 células/pocillo) en un volumen final de 200 µL de medio. Se dejaron en incubación 2 horas a 37°C y 5% de dióxido de carbono, con el fin que las células se adhirieran. Posteriormente, se añadieron 500.000 promastigotes en 200 µL de medio de cultivo RPMI-1640 (relación macrófago/promastigotes, 1:10) de cada una de las cepas de *Leishmania* en estudio, durante 72 horas de infección, y en incubación a 33 °C.

5. Fijación y tinción de muestras

Se añadió metanol durante 5 minutos. Se aplicó tinción Giemsa al 10% en PBS, y se dejó reposar en los portaobjetos durante 15-20 minutos. Se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente añadimos agua para quitar el colorante. Luego usamos Sellador DPX mounting®, para pegar las laminillas en los respectivos portaobjetos.

6. DNeasy® Blood & Tissue Handbook.

Protocolo: Purificación de ADN total a partir de tejidos animales (Protocolo de Spin-columna).

7. Reacción en cadena de la polimerasa PCR

7.1. Condiciones de PCR (30 ciclos):

95°-----10min (Desnaturalización ADN).

95°-----1min

50°-----1min (Anillamiento).

72°-----1min

72° -----5 min (Elongación final).



Vol. Final = 50 µL

7.2. Gel pilot® DNA Molecular Weight Markers.

Gel Pilot 100bp Ladder (100) (cat.no.239035)

7.3. Componentes PCR:

| | |
|---|--------|
| 1. Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems®) | 25 µL |
| 2. Primer PMM forward: AAGCTTGGCGTCGTCGGTGG | 2,0 µL |
| 3. Primer PMM reverse: GTTRCCGCCCTCTGACGTCTT | 2,0 µL |
| 4. ADN 0,5 µg/mL | 2,0 µL |
| 5. H ₂ O milliQ | 19 µL |

7.4. ADN.

En gel agarosa al 1% con TAE1X. El marcador de peso molecular se dejará en uno de los pocillos. Se adiciona tampón de muestra. Aplicamos 10 µL de ADN y 5 µL de tampón.

7.5. Amplicones.

En gel agarosa al 2% con TAE1X. El marcador de peso molecular se dejará en uno de los pocillos. Aplicamos 10 µL de ADN y 5 µL de tampón.

7.6. Análisis de fragmentos por enzimas de restricción (RFLP).

En gel agarosa al 3% con TAE1X. El marcador de peso molecular se dejará en uno de los pocillos. A los 10 µL de producto de PCR, se le añade 1µL de la siguiente mezcla 2 µL de enzima EcoRI y 18 µL de tampón. Posteriormente realizamos la digestión con la enzima de restricción EcoRI a 37 °C 1 hora, e inactivación posterior a 80 °C por 20 minutos.

8. Preparación de muestras para secuenciación.

Aplicar 5 µL de ADN más 35 µL de agua destilada. Las muestras fueron enviadas al Servicio de Secuenciación Sanger Unidad de Genómica Fundación Parque Científico de Madrid, de la Facultad de ciencias Biológicas UCM.

9. Edición de secuencias programa BioEdit Sequence Alignment Editor®

Las secuencias resultantes, fueron editadas con el programa BioEdit, apoyados en el correspondiente cromatograma de cada una, y se realizó el cambio de bases erróneas (Valor N) en cada secuencia, por el correspondiente nucleótido

de cada cromatograma. Posteriormente a las secuencias ya editadas, se les aplica un Clustal W Multiple Alignment.

10. Construcción de árboles filogenéticos con el programa MEGA®.

Las respectivas secuencias editadas se exportaron al programa MEGA®. 5. 2.2, para la construcción de un árbol filogenético. Se aplica a todas las secuencias un alineamiento ClustalW. Para nuestro estudio, empleamos el Test UPGMA tree (Kimura 2-parameter model) y la medida de confianza de las ramas de los árboles se realizó mediante análisis de bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein 1985).

Resultados

1. Estudio de la capacidad infectante *in vitro* de las distintas cepas de *L. braziliensis* para J774.

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Cepas | | | | | | | | | | | | |
| INL | 524 | 606 | 213 | 459 | 412 | 505 | 481 | 11 | 626 | 554 | 582 | 466 |
| TiM | 390 | 351 | 667 | 370 | 498 | 343 | 567 | 875 | 357 | 467 | 438 | 432 |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Cepas | | | | | | | | | | | | |
| INL | 448 | 464 | 484 | 503 | 2 | 522 | 413 | 65 | 436 | 415 | 485 | 474 |
| TiM | 409 | 357 | 461 | 358 | 463 | 745 | 941 | 630 | 439 | 353 | 495 | 375 |

| | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|------------|
| Cepas | LB2 | LD1 | LC3 | LB3 |
| L | | | | |
| TiM | 276 | 182 | 221 | 172 |

| | | |
|-----------------------------------|-------------|------------|
| Cepas | | |
| <i>Leishmania lainsoni</i> | IIFB | 396 |
| TiM | 399 | 469 |

| | |
|------------------------|--------------|
| Cepa referencia | M2904 |
| TiM | 275 |

Tasa de Infección de Macrófagos (TiM). Se determinó a partir del recuento de número de amastigotes por cada 100 núcleos, que fueron contados en las placas Lab-Tek por duplicado al microscopio óptico.

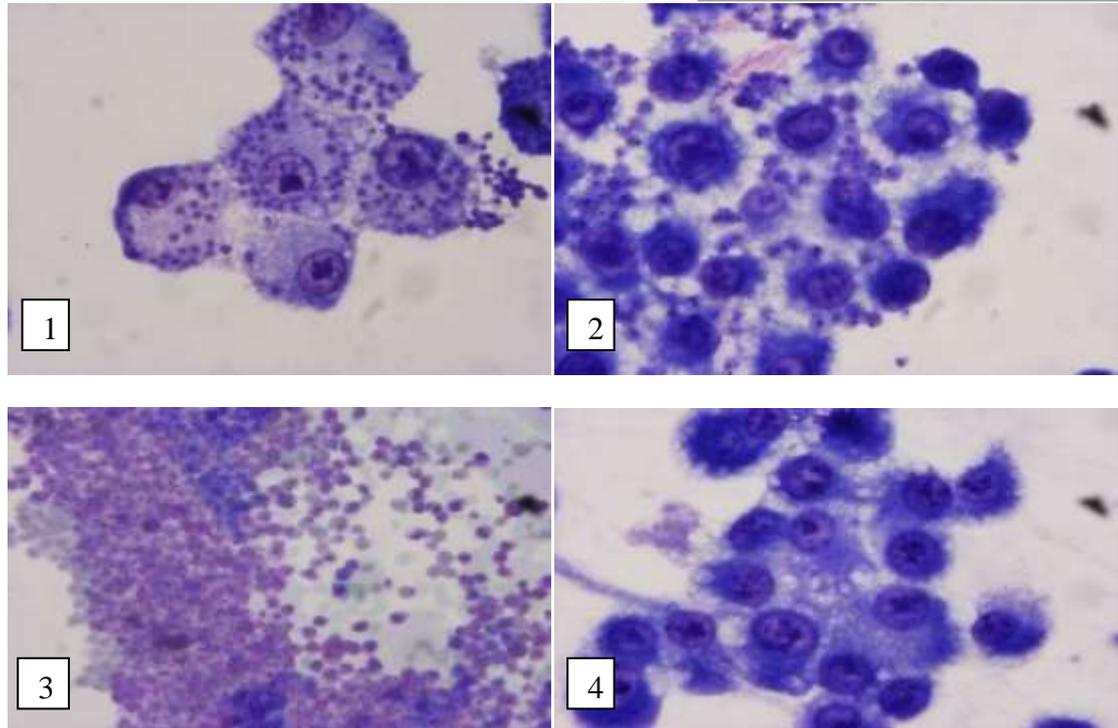


Fig. 1. Infección de macrófagos con *Leishmania braziliensis*. 1. Cepa 11 2. Cepa LB3. 3. Amastigotes libres en Cepa LB2. 4. Control macrófagos sin infección.

2. Estudio mediante PCR de la fosfomanomutasa (PMM).

En las figuras 2-5 se muestran los perfiles electroforéticos del amplicón de PMM de las cepas estudiadas. Las cepas INL y la cepa de referencia tienen un perfil electroforético de ADN con un peso molecular de 500 pares de bases (pb). Las cepas L presentaron un perfil electroforético de ADN con un peso molecular de 600 pb. Las cepas 396 y IIFB presentaron un perfil electroforético de ADN con un peso molecular de 500 pb.



Fig.2. Cepas: 213, 459, 466, 481, 505, 524, 554, 582, 606, 626 (de izq. a der.).

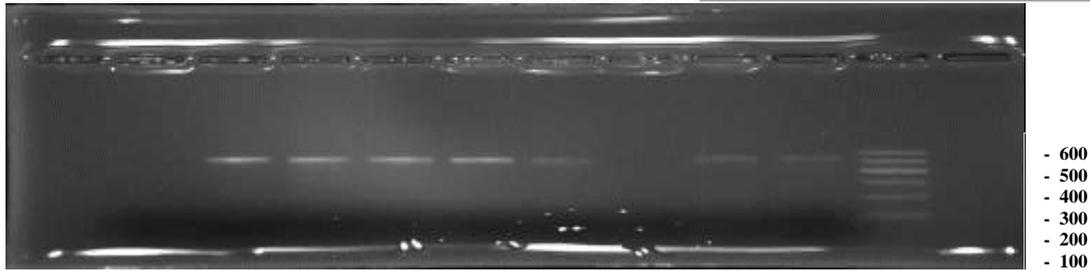


Fig. 3. Cepa: 65, 396, 413, 436, 464, 471, 474, 503 (de izq. a der.).

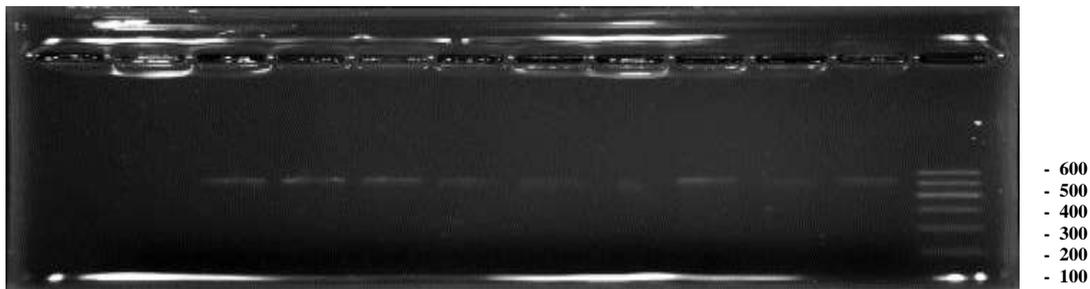


Fig.4. Cepas:2, 11, 412, 415, 448, 484, 485, 522, M2904, IIFB (de izq. a der.).



Fig.5. Cepas: LD1, LB2, LB3, LC3 (de izq. a der.).

3. Estudio mediante PCR- RFLP de la fosfomanomutasa (PMM).

En las figuras 6-8 se muestran los perfiles electroforéticos de los RFLP del gen de PMM tras digestión con EcoRI.

Las cepas INL y la cepa de referencia, presentaron un mismo perfil electroforético de enzima PMM, con dos cortes de restricción, con pesos moleculares alrededor de 100 pb y 300 pb.

Las cepas L presentaron un mismo perfil electroforético de enzima PMM, con un solo corte de restricción alrededor de 200 pb.

Las cepas IIFB, 396 presentaron un mismo perfil electroforético de enzima PMM, con tres cortes, con pesos moleculares alrededor de 100 pb, 300 pb.

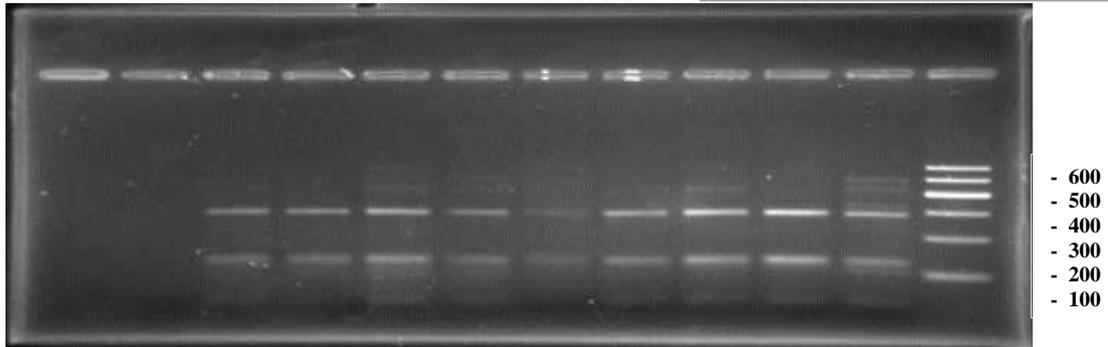


Fig.6. Cepas: 213, 459, 466, 481, 505, 524, 582, M2904, IIFB (de izq. a der.).

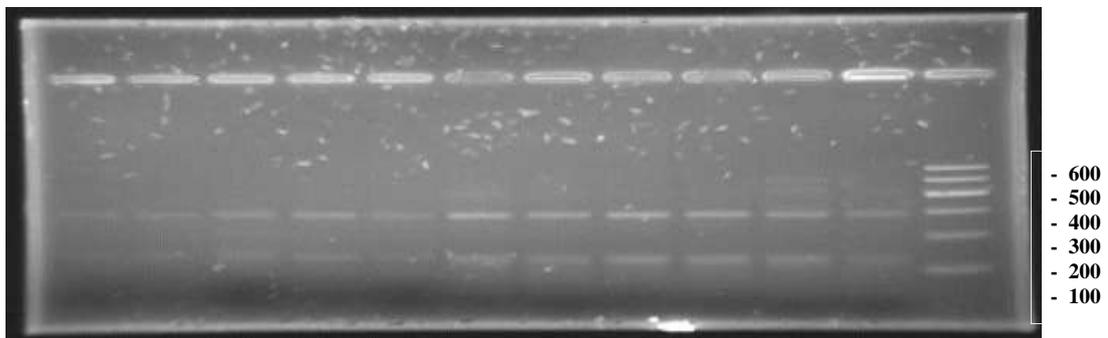


Fig.7. Cepas: 415, 448, 474, 522, 464, 606, 626, 65, 436, 396, 503 (de izq. a der.).

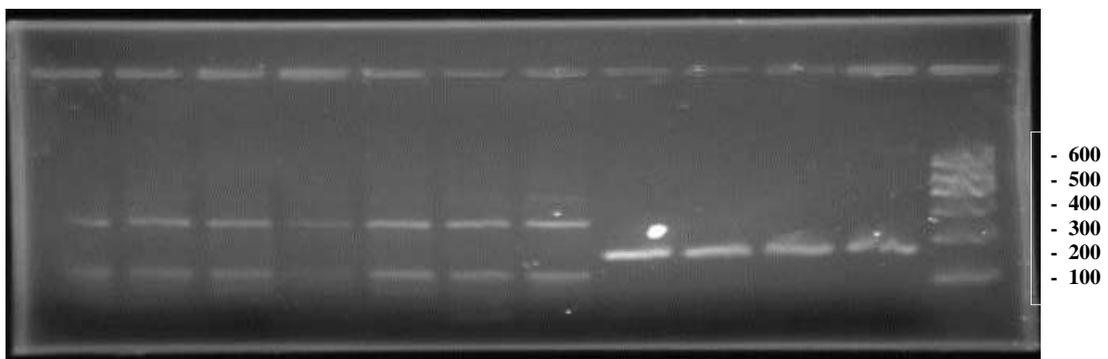


Fig. 8. Cepas: 11, 554, 484, 485, 413, 412, 2, LD1, LB2, LB3, LC3 (de izq. a der.).

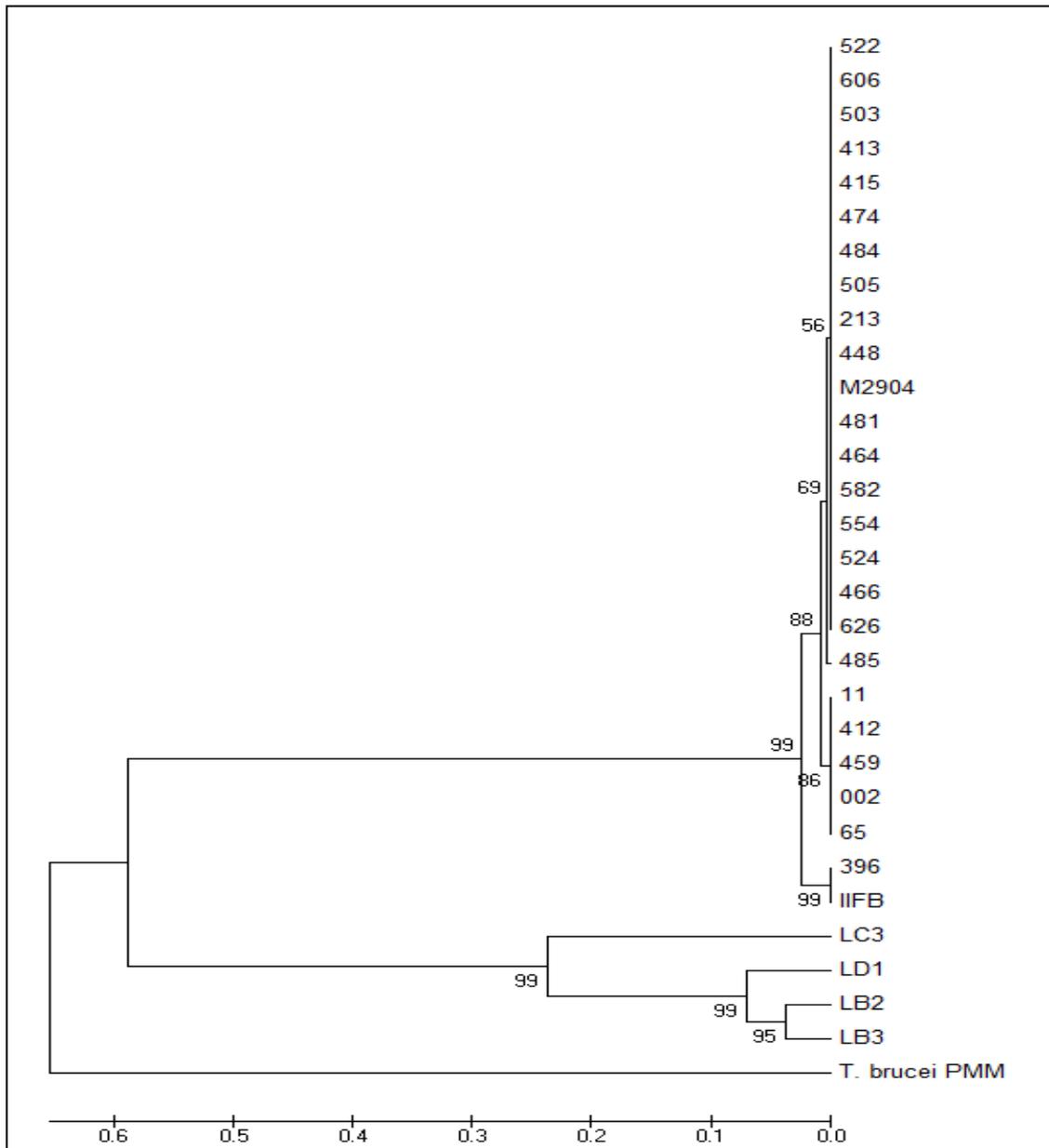


Fig.9. Árbol filogenético mostrando las relaciones de las cepas bajo estudio, con el Test UPGMA tree (método de Kimura 2-parametros), con el marcador molecular PMM. Se utilizó como secuencia outgroup a *T. brucei*.

En el Test UPGMA tree, podemos apreciar una escala de 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 sustituciones / sitio.

Nota:

No se obtuvieron resultados de amplificación para la cepa 471, por lo que fue eliminada del estudio. La secuenciación enviada de la cepa 436, presentó

muchas bases erróneas, por tanto fue también eliminada del estudio.

Discusión

Al correlacionar las variables, capacidad de infección y perfiles electroforéticos de PCR, podemos apreciar que las cepas INL, presentan diferentes rangos de infección, y perfiles electroforéticos de PCR, no existiendo relación precisa entre estas variables. Las cepas L, resultaron más uniformes en la capacidad de infección, y presentan un perfil electroforético igual. Se pueden presentar diversos factores coadyuvantes en la capacidad de infección, como pueden ser diferentes genes asociados a esta, o características intrínsecas o individuales de infección en cada cepa en estudio, por tanto no se pueda establecer una relación precisa en estas variables. Como lo mencionan algunos autores, la mayor o menor infección del parásito *Leishmania* puede ser modulada por diversos factores, ambientales y genéticos, así como por su hospedador vertebrado (Blackwell 1996) y por los vectores (Titus, Ribeiro 1988).

Al correlacionar las variables, capacidad de infección y perfiles electroforéticos de RFLP, las cepas INL presentan un perfil electroforético igual, y su capacidad de infección es diferente, no pudiendo establecer una relación precisa entre estas variables. Estos resultados concuerdan con otros estudios, donde no encontraron diferencias en los perfiles electroforéticos RFLP en las especies de *Leishmania*, dentro del complejo de *Leishmania braziliensis* (Van Eys *et al.*, 1991), y difieren a los reportados por otros autores, que si determinaron la variabilidad intraespecífica de *Leishmania braziliensis*, mediante PCR-RFLP de regiones intergénicas (ITS) de genes rRNA (Buitrago *et al.*, 2005). Las cepas L, presentan un perfil electroforético igual de RFLP, y su capacidad de infección fue baja, a pesar de presentar la enzima PMM, no existiendo una relación entre presencia de la enzima PMM, con una mayor capacidad de infección, resultados que contrastan a lo referido por diversos autores, una asociación del gen PMM a una mayor capacidad de virulencia del parásito *Leishmania* (Ilgoutz, McConville 2001; Kedzierski *et al.*, 2006).

Una de las posibles causas de no poder establecer una relación precisa, entre la presencia de la enzima PMM y la capacidad de infección en las cepas en estudio, como lo han descrito diversos autores, los cuales mencionan que se debe tener en cuenta la gran heterogeneidad genética intraespecífica entre *Leishmania braziliensis* (Cupolillo *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2002). De igual forma, se encuentran diversos estudios, donde se demuestra la existencia de varios polimorfismos genéticos intraespecíficos (Gomes *et al.*, 1995; Descoteaux, Turco 1999) que afectan igualmente estas variables.

Adicionalmente como lo mencionan algunos autores, la diversidad de las cepas en las distintas áreas geográficas refleja la plasticidad de estos parásitos al adaptarse a diferentes especies de vectores (o poblaciones de estos); la incorporación de marcadores moleculares robustos podría permitir mejorar la



determinación de la diversidad genética de varias especies de *Leishmania* que circulan en la naturaleza (Rodríguez *et al.*, 2006; Descoteaux, Turco 1999). Igualmente, la toma de muestras a partir de pacientes puede también corresponder a una mezcla de diferentes parásitos y de genotipos (Bañuls *et al.*, 1999; Cupolillo *et al.*, 2003)

Los resultados muestran, que la confianza en un único marcador molecular, no es suficiente para determinar la variabilidad intraespecífica de *Leishmania braziliensis*, en las cepas en estudio, y aisladas en esta zona geográfica. Esto tiene graves implicaciones para algunos laboratorios, que dependen muchas veces de un solo marcador molecular para el diagnóstico a nivel intra e inter especie de *Leishmania*, viéndose reflejado esto, en un precario diagnóstico del parásito *Leishmania*, retardando el inicio oportuno del específico tratamiento, al paciente afectado.

Al correlacionar las variables, capacidad de infección con el Test UPGMA tree, podemos apreciar como las cepas 11, 65, 2, 412, 459 ubicadas en el mismo grupo filogenético, y con diferentes rangos de infección, en donde podemos resaltar como la cepa 11, presentó el segundo promedio total de infección más alto (875 amastigotes). No pudiendo establecer una relación precisa entre estas variables, ya que una de las cepas con mayor capacidad de infección, se encuentra agrupada filogenéticamente con una de las cepas de menor capacidad de infección. El restante de cepas INL, a pesar de tener dos (413, 522) de las tres cepas con mayor capacidad de infección, se ubicaron filogenéticamente en el mismo grupo de cepas con capacidad de infección baja y media. Queda claro también, que la distribución filogenética de la enzima PMM, no está relacionada con el mayor o menor grado de capacidad de infección en estas cepas bajo estudio.

Las cepas L, a pesar de ubicarse en el mismo rango de infección, y presentar un mismo perfil electroforético de la enzima PMM, la distribución filogenética de la PMM fue diferente, mostrando diferentes ramas evolutivas. En estas cepas se puede apreciar una variabilidad intraespecífica, basados en la distribución filogenética de la enzima PMM. La distribución filogenética de la enzima PMM en las cepas L, se relacionó con menor grado de infección, ya que las cuatro cepas presentaron diferentes grados de infección, pero todas ubicadas en el rango más bajo. No pudiendo establecer una relación precisa en la distribución filogenética de la enzima PMM en estas cepas, con una mayor capacidad de infección, por el contrario se asocia a menor capacidad de infección.

Las cepas *Leishmania lainsoni*, están ubicadas en el mismo grupo, en relación al perfil electroforético de la enzima PMM y separadas filogenéticamente de las cepas bajo estudio.

Los perfiles electroforéticos de RFLP y su distribución filogenética en el Test UPGMA tree obtenidos en el estudio, concuerdan con otros autores, los cuales



mencionan, que la gran cantidad de bandas (perfiles), que pueden aparecer entre las diferentes especies de *Leishmania*, e incluso dentro de una misma especie, podrían indicar la proximidad o lejanía filogenética intra-especie o inter-especie (Montoya *et al.*, 2007).

En relación a los valores de bootstrap en el Test UPGMA tree, las cepas INL quedan situadas dentro de grupos con identidades nucleotídicas medias (identidades de secuencias $\geq 70\%$). Las cepas L quedan situadas dentro de grupos claros (con valores de bootstrap de 99%). Las cepas INL y cepas L quedan situadas dentro de un grupo claro (con valores de bootstrap de 99%). No se presentaron valores bootstrap con identidades nucleotídicas bajas ($\leq 50\%$), que indican filogenias de ramas poco claras.

Adicionalmente, en el Test UPGMA se presentan diferentes sustituciones, lo cual nos lleva a pensar que las cepas bajo estudio, posiblemente han presentado diferentes sustituciones génicas (mutaciones o polimorfismos), por ejemplo por recombinación homóloga, pudiendo dar como resultado gran variabilidad en la distribución filogenética de la enzima PMM, en las cepas en estudio.

Es recomendable realizar el análisis con otros métodos de agrupamientos filogenéticos, que nos permitan tener una mayor cantidad de información, con la cual podamos realizar diferentes análisis con las distintas variables usadas en este estudio. Es importante mencionar que el Test de agrupación empleado, no es más que la representación gráfica de una matriz de distancias, y que bajo ciertas condiciones, esta representación, puede ser tomada como una estimación de la filogenia.

El empleo de los métodos moleculares en los estudios de variabilidad intraespecífica del parásito *Leishmania* tiene gran importancia, por lo tanto es muy valioso considerar la utilización de distintos métodos moleculares, para de esta manera poder aclarar la relación de los distintos marcadores moleculares con la capacidad de infección del parásito.

Conclusiones

Las cepas INL presentan variabilidad intraespecífica en cuanto a la tasa de infección *in vitro* para macrófagos J774, con rangos de infección superiores a 700 amastigotes/100 núcleos, sin apreciarse diferencias en cuanto a los perfiles electroforéticos de la PCR para PMM.

Las cepas L resultan mucho más uniformes en cuanto a la capacidad de infección *in vitro* para macrófagos J774, situándose en un nivel bajo (0-400 amastigotes/100 núcleos), sin variaciones apreciables en los perfiles electroforéticos de la PCR para PMM.



Los perfiles de restricción con EcoRI producen 3 patrones RFLP, correspondientes a los grupos INL, L e IIFB 396, sin que se puedan apreciarse diferencias dentro de cada uno de los grupos.

Para las cepas estudiadas no fue posible establecer una correlación entre las variables capacidad infectante, expresión y distribución filogenética de la enzima PMM.

De nuestro estudio podemos concluir que la presencia de enzima PMM no resultó ser un buen marcador de virulencia de *Leishmania braziliensis*.

Bibliografía

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE 7(5): e35671.

Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P. 2009. Demonstration of Genetic Exchange During Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. Science. 324:265-268.

Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. International Journal of Parasitology. 29:1137-1147.

Blackwell JM. 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. Parasitology. 112:567-574.

Buitrago Romero NL, Bastrenta B, Cupolillo E. 2005. Análisis de la variabilidad genética de Cepas de *Leishmania* en aislados naturales de la zona endémica del departamento de La Paz, Bolivia: implicaciones epidemiológicas. La Paz, Bolivia. 97 p.

Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, Korenaga M, Barroso PA, Mimori T, Cooper PJ, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2006. *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. Biomed Central Infectious Diseases.6:1-9.

Colussi PA, Taron CH, Mack JC, Orlean P. 1997. Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94:7873-7878.



Criscione C, Poulin R, Blouin M. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*.14:2247-2257.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, Naiff MF, Grimaldi Jr G. 2003. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(7):3126-3132.

Descoteaux A, Turco SJ. 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1455:341–352.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39 :783-791

Fraga J, Montalvo AM, de Doncker S, Dujardin JC, der Auwera GV. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*.10:238–245.

Garami A, Ilg T. 2001. Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. *European Molecular Biology Organization Journal*. 20:3657–3666.

Garami A, Mehlert A, Ilg T. 2001. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania Mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphatemannose synthase gene deletion mutants. *Molecular and Cellular Biology*. 21:8168-8183.

García Almagro D. 2005. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 96:1-24.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SD, Melo MN. 1995. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental Parasitology*. 80:681-687.

Hashimoto H, Sakakibara A, Yamasaki M, Yoda K. 1997. *Saccharomyces cerevisiae*VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*. 272:16308–16314.

Herwaldt B. 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*. 354:1191-1199.

Ilgoutz SC, McConville MJ. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal for Parasitology*. 31:899–908.



Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerrajr RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. 2002. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 96(1):111-121.

Kedzierski L, Malby RL, Smith B J, Perugini MA, Hodder AN, Ilg T, Colman PM, Handman E. 2006. Structure of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase highlights similarities with human isoforms. Journal of Clinical Microbiology. 363:215–227.

Luyo Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, Gomez Landires E, Hashiguchi Y, Nonaka S. 2004. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. Parasitology today.128:483–491.

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, Dedet JP, Lukes J, Miles MA. 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). International Journal for Parasitology.36:757–769.

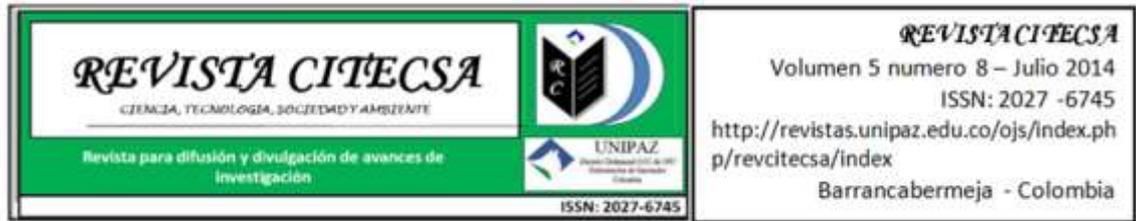
Miles MA, Yeo M, Mauricio IL. 2009. *Leishmania* Exploit Sex. Science. 324:187-188.

Montoya L, Gallego M, Gavignet B, Piarroux R, Rioux JA, Portus M, Fisa R. 2007. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 76(5):888-895.

Quesada Cortés A, Campos Muñoz L, Rubio Flores C, Martín Díaz MA, Navarro Sánchez M, Regojo Zapata RM, Lucas de Laguna R, Herranz Pinto P. 2005. Leishmaniasis cutánea: revisión y avances terapéuticos. Dermatología Práctica. 13(5):11-22.

Rodríguez GI, Marín C, Vargas F, Córdova O, Barrera M, Gutiérrez SR, Alunda JM, Sánchez MM. 2006. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. Experimental Parasitology. 112:44-51.

Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, Carme B. 2006. Use of PCR restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application on the assay to clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. 4:459-467.



Titus RG, Ribeiro JM. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*. 239:1306-1308.

Van Eys GJ, Guizani L, Ligthart GS, Dellagí, K. 1991. A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Experimental Parasitology*. 72:459-463.