

Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico

Identification of *Leishmania* species by the random amplified polymorphic DNA technique

Lianet Monzote Fidalgo^I; Raiza Ordeñana Pilotos^{II}; Jorge Fraga Nodarse^{III}; Ana M. Montalvo Álvarez^{IV}; Ivón Montano Goodrige^V

^I Máster en Ciencias. Investigadora Agregada. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Máster en Ciencias. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Máster en Ciencias. Investigador Agregado. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{IV} Licenciada en Biología. Investigadora Auxiliar. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^V Ingeniera Química. Especialista en Investigaciones. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la leishmaniosis ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades tropicales más importantes. El control de esta parasitosis es muy difícil, porque no existen vacunas y el tratamiento es tóxico e insatisfactorio. Es de crucial importancia establecer un método de diagnóstico oportuno junto a la identificación del parásito, lo cual incide en la selección del tratamiento adecuado y en el diseño de las medidas de control apropiadas. Recientemente, los avances en biología molecular han permitido la caracterización de especies de *Leishmania* por diferentes métodos. La técnica de ADN polimórfico amplificado al azar es una técnica simple para detectar el polimorfismo genético del ADN.

OBJETIVO: estandarizar la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar para su utilización en la tipificación de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo.

MÉTODOS: empleando una concentración de cebador de 5 pmol, 75 ng de ADN molde, 2 mM de cloruro de magnesio y 2 U de *Taq* ADN polimerasa en 25 mL de reacción, se obtuvieron patrones de amplificación reproducibles. La técnica optimizada de ADN polimórfico amplificado al azar se empleó para determinar las diferencias genéticas entre 10 cepas de referencia de *Leishmania*, con la utilización de 6 juegos de cebadores comerciales diseñados al azar. La relación filogenética entre las especies estudiadas se determinó utilizando la estrategia de agrupaciones mediante el método de UPGMA.

RESULTADOS: los cebadores OPA 3, 4 y 8 permitieron diferenciar las 10 cepas de referencia de *Leishmania* estudiadas. Se obtuvieron 2 grupos genéticos bien

definidos donde se agrupan las especies del subgénero *Leishmania* y *Viannia*, respectivamente; los 2 subgéneros mostraron diferencias genéticas.

CONCLUSIONES: de esta forma se cuenta en el laboratorio con la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar optimizada para la identificación de especies de *Leishmania*.

Palabras clave: *Leishmania*, técnica de ADN polimórfico amplificado al azar, identificación.

ABSTRACT

INTRODUCTION: leishmaniosis has been regarded by the World Health Organization as one of the most important tropical diseases. It is very difficult to control such parasitosis because there are not vaccines, and therapy is generally toxic and unsatisfactory. It is of vital importance to set prompt diagnostic method along with identification of the parasite in order to select the suitable treatment and to design the most convenient control measures. Recently, the advances in molecular biology have made it possible to characterize *Leishmania* species by different methods. The random amplified polymorphic DNA technique is a simple method to detect the genetic polymorphic DNA.

OBJECTIVE: to standardize the random amplified polymorphic DNA technique for its use in New World *Leishmania* species typing.

METHODS: by using 5 pmol primer concentration, 75 ng of template DNA, 2 mM of magnesium chloride and 2 U of polymerase DNA *Taq* in 25 μ L reaction, two reproducible amplification patters were obtained. The optimized random amplified polymorphic DNA technique served to determine the genetic differences among ten reference strains of *Leishmania*, with 6 sets of randomly designed conventional primers. The UP GMA method-based grouping strategy determined the phylogenetic relation among the studied species.

RESULTS: OPA primers -3, 4 and 8 allowed distinguishing the ten reference strains of *Leishmania* under study. Two well defined genetic groups including species of *Leishmania* and *Viannia* subgenres were obtained; these 2 subgenres showed genetic differences.

CONCLUSIONS: in this way, our laboratory has the optimized random amplified polymorphic DNA for the identification of *Leishmania* species.

Key words: *Leishmania*, random amplified polymorphic DNA technique, identification.

INTRODUCCIÓN

El método convencional para el diagnóstico de la leishmaniosis es la identificación del parásito en cultivo o por histopatología. Como alternativa, se han desarrollado métodos inmunológicos (intradermorreacción de Montenegro, la técnica de inmunofluorescencia indirecta y prueba de aglutinación directa).^{1,2} En los últimos años, los avances en la biología molecular han abierto la posibilidad de desarrollar herramientas específicas para el diagnóstico de enfermedades. Una de las más

utilizadas es la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), la que constituye una técnica de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la leishmaniosis.³ Paralelamente, se han desarrollado otros métodos moleculares para realizar diversos estudios, entre los que se incluye la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).⁴

La técnica del RAPD se basa en la amplificación de segmentos de ADN genómico mediante la tecnología de la RCP, a partir de cebadores oligonucleótidos cortos, diseñados previamente al azar.⁵ El patrón de bandas que se obtiene como resultado permite conocer el polimorfismo genético entre las diferentes especies o cepas (aislamientos). La habilidad de este método de detectar variaciones al nivel genético, ha permitido estudiar daños y mutaciones en el ADN, caracterizar aislamientos de diversos protozoos, el mapeo de genes, el estudio de poblaciones, así como el análisis epidemiológico y taxonómico.⁴⁻⁶ En este trabajo el propósito consistió en optimizar el método de RAPD, en el laboratorio, para la caracterización genética de cepas de referencia de *Leishmania*.

Parásitos: se utilizaron promastigotes de 9 especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y una de *Trypanosoma* (tabla). Los parásitos fueron mantenidos con pase cada 3 o 4 d hasta el momento de su uso en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EE. UU.), suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 µg/mL) y suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, EE. UU.) inactivado con calor (56 °C, 30 min).

Extracción de ADN genómico: se usaron 10⁷ parásitos/mL de cada especie y se realizó la extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo.⁷

Determinación de la concentración óptima de los componentes de la mezcla de la reacción del RAPD: se utilizaron 2 especies: *L. amazonensis* y *L. donovani*. La amplificación del ADN se realizó en un volumen final de 25 mL que contuvo: 2,5 mL de tampón de amplificación 10X (tris-HCl 50 mM pH= 8,0; NaCl 100 mM; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; glicerol 50 % y Triton X-100 1 %) (Promega, EE. UU.), 200 µL de cada dinucleótido trifosfato (dNTP) (Promega, EE. UU.). Se evaluaron diferentes concentraciones de: cebador OPA 9 (Kit OPA, Operon Technologies, EE. UU.): 2,5; 5,0 y 7,5 pmol; ADN molde: 10, 25, 50, 75 y 100 ng; MgCl₂: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 y 4,0 mM; *Taq* ADN polimerasa (Promega, EE. UU.): 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 U. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Minicycler™ MJ Research, EE. UU.), con el perfil siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1 min), hibridación (36 °C, 1 min) y extensión (72 °C, 2 min), seguido de una extensión final a 72 °C por 15 min. Los resultados de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2 %, preparado en tampón TBE 0,5X con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). El gel se corrió a 150 V durante 1 h (Fuente: Pharmacia LKB, Multidrive XL). La visualización se realizó en un transiluminador. El análisis de la presencia o ausencia de tallas de bandas se realizó visualmente. Se consideró condición óptima, aquella donde se obtuvo un patrón de RAPD con el mayor número de bandas y la mayor intensidad. El método se aplicó a *L. amazonensis*, *L. donovani* y *L. braziliensis*, 3 d diferentes, con el cebador (OPA - 9).

Selección de los cebadores que permitan estudiar el polimorfismo genético entre cepas de Leishmania utilizando el RAPD: se realizó la técnica del RAPD bajo las condiciones previamente optimizadas, utilizando como cebadores el OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-8 y OPA-9 (Kit OPA, Operon Technologies, EE. UU.). Los resultados de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2 %.

Polimorfismo genético de cepas de Leishmania del Nuevo Mundo por RAPD: se hizo teniendo en cuenta las bandas individuales amplificadas para cada cebador, que fueron registradas como presentes o ausentes y se calculó el inverso del coeficiente de similitud de Jaccard S_j (Sj, modificado por Sneath, 1957). La relación filogenética entre las especies estudiadas fue determinada utilizando la estrategia de agrupaciones mediante el método de UPGMA,⁸ con el uso del paquete de programas FreeTree Versión 0.9.1.50.⁹ El dendograma se construyó basado en los datos de los cebadores utilizados.

Los avances en las técnicas moleculares han permitido el estudio de la variación genética de diversas especies de *Leishmania* que circulan en la naturaleza y ofrecen significativas ventajas comparadas con las técnicas convencionales.¹⁰ En este trabajo, se ha presentado la optimización del RAPD, con el objetivo de evaluar su futura utilización en el laboratorio para la identificación de especies de *Leishmania*. El número y la intensidad de los fragmentos producidos por la técnica del RAPD varían en función de la concentración de cebadores, ADN molde, MgCl₂ y Taq ADN polimerasa durante la reacción. Cada uno de los parámetros en estudio fueron analizados; se escogieron como condiciones óptimas aquellas donde se observara un mayor número de bandas con mayor intensidad al usar promastigotes de *L. amazonensis* y *L. donovani*. Las condiciones óptimas para realizar la técnica del RAPD para un volumen final de 25 mL de reacción fueron: 5 pmol de cebador, 75 ng de ADN molde, 2 mM de MgCl₂, 2 U Taq ADN polimerasa.

Uno de los factores que ha limitado la utilización del RAPD en estudios de biología molecular es la reproducibilidad de los productos de la reacción. Esto depende de las condiciones en que se realiza la técnica; constituye una variación que enmascara los resultados, pero que puede evitarse si las condiciones de amplificación y cada uno de los componentes que intervienen en la reacción son optimizados.¹¹ En el presente estudio, se pudo comprobar la obtención de patrones reproducibles de RAPD realizados 3 d diferentes, tanto en el número de bandas como en su intensidad, con la utilización de ADN de 3 especies diferentes.

Se obtuvieron 121 bandas polimórficas y ninguna monomórfica, con 6 cebadores para determinar el polimorfismo genético entre las cepas de referencia de *Leishmania* y *T. cruzi* como especie fuera de grupo. El número medio de bandas amplificadas por cebador fue 20. Los patrones de amplificación con los cebadores OPA 3, 4 y 8 lograron diferenciar todas las especies utilizadas en el estudio. Sin embargo, los cebadores OPA 1, 2 y 9, mostraron perfiles específicos para todas las especies, excepto para *L. amazonensis* y *L. garnhami*, donde se observaron iguales patrones de amplificación. En el dendograma basado en los perfiles electroforéticos obtenidos por la técnica del RAPD con los 6 cebadores utilizados (Fig.), se observó claramente la existencia de 2 grandes grupos, uno para *T. cruzi*, y el otro donde se agruparon todas las especies del género *Leishmania*. Dentro de este último, se logró diferenciar subgrupos bien definidos, correspondientes con cada uno de los subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, con un coeficiente de similitud de 54 % ($S_j = 0,46$). Por otra parte, en el subgénero *Leishmania*, pudo también diferenciarse entre las especies causantes de las formas cutáneas (*L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. amazonensis* y *L. garnhami*) y la forma visceral (*L. chagasi* y *L. donovani*), con un coeficiente de similitud de 42 % ($S_j = 0,58$).

La mayoría de los estudios reportados para la diferenciación de especies de *Leishmania* utilizando RAPD, se han realizado con especies del Viejo Mundo, tanto las que producen la forma cutánea como visceral. Sin embargo, un pequeño número de investigaciones han sido realizadas con especies del Nuevo Mundo y en muchos casos, involucran pocas especies. Por estos motivos, se realizó la optimización del RAPD con 9 cepas de referencia de *Leishmania* (8 cutáneas, 2 mucocutáneas y 1 visceral) del Nuevo Mundo, teniendo en cuenta la escasez de

estudios realizados en nuestra área geográfica, así como la importancia médico epidemiológica que constituye contar en el laboratorio con una técnica para la tipificación de especies de *Leishmania*. Esto permitirá además, contar con patrones de especies de *Leishmania* que circulan en gran parte del continente.

Los resultados observados con las cepas de referencia del parásito deben ser considerados como preliminares, porque los perfiles obtenidos deben confirmarse con un número elevado de aislamientos de la misma especie. Esto permitiría además, la identificación de marcadores genéticos específicos de RAPD para el diagnóstico diferencial entre especies de *Leishmania*. No obstante, la simple interpretación de corridas electroforéticas en geles de agarosa, unido con la marcada variabilidad genética encontrada entre las especies de *Leishmania* por esta metodología, constituye una ventaja para los laboratorios que trabajan en este campo.¹² Contar con esta técnica molecular en el laboratorio permitiría la identificación genética de especies de *Leishmania* y podría constituir una herramienta útil para la realización de estudios encaminados a la identificación de nuevos blancos terapéuticos, factores de virulencia, antígenos para el desarrollo de vacunas y la comprensión de la resistencia a drogas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med. 2003;49:55-60.
2. Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veeken H. Development and application of 'simple' diagnostic tools for visceral leishmaniasis. Med Microbiol Immunol. 2001;190:69-71.
3. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diag Microbiol Infect Dis. 2003;47:349-58.
4. Guizani I, Dellagi K, Ben R. Random amplified polymorphic DNA technique for identification of Old World *Leishmania* species. Am J Trop Med Hyg. 2002;62:152-6.
5. Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk J Biol. 2001;25:2185-96.
6. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. Nucleic Acids Research. 1990;18:6531-5.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
8. Sneath PHA. Some thoughts on bacterial classification. J General Microbiol. 1957;17:201-26.
9. Mount DW. Phylogenetic prediction. En: Mount DW, editor. Bioinformatics. Sequence and genome analysis. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. p. 238-78.

10. Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;97:115-33.
11. Khandka DK, Tuna M, Tal M, Nejidat A, Golan G. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis*. 1997;18(3):2852-6.
12. Yaghoobi-Ershadi MR, Jafari R, Hanafi-Bojd AA. A new epidemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Ann Saudi Med*. 2004;24(2):98-101.

Recibido: 20 de mayo de 2008.

Aprobado: 23 de diciembre de 2008.

M. C. *Lianet Monzote Fidalgo*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba; Teléf.: 53 7 2020650. Correo electrónico: monzote@ipk.sld.cu