



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS 274C/T,  
1465-85G/A Y A318V DEL GEN NRAMP1 EN LA  
LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA Y VISCERAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

**P R E S E N T A :**

**AAXIN MICHEL ORTIZ FLORES**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

Tutora: Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

División de Estudios Profesionales

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:  
"Estudio de los polimorfismos 274C/T, 1465-85G/A y A318V del gen NRAMP1 en la  
leishmaniasis cutánea localizada y visceral"

realizado por Aaxin Michel Ortiz Flores

con número de cuenta 40007091-7 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

Propietario Dra. Ana Flisser Steinbruch

Propietario M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán

Suplente M. en C. Mirza Gabriela Romero Valdovinos

Suplente Dra. Guillermina Ávila Ramírez

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 24 de Octubre del 2006  
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. Zenón Cano Santana



1. Datos del alumno  
Ortiz  
Flores  
Aaxin Michel  
56 76 05 78  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
40007091-7
2. Datos del tutor  
Dra  
María Angélica Alfonsina  
Olivo  
Díaz
3. Datos del sinodal 1  
Dra  
Ana  
Flisser  
Steinbruch
4. Datos del sinodal 2  
M en C  
Isabel Cristina  
Cañeda  
Guzmán
5. Datos del sinodal 3  
M en C  
Mirza Gabriela  
Romero  
Valdovinos
6. Datos del sinodal 4  
Dra  
Guillermina  
Ávila  
Ramírez
7. Datos del trabajo escrito  
Estudio de los polimorfismos 274C/T, 1465-85G/A y A318V del gen NRAMP1 en la leishmaniasis cutánea localizada y visceral  
51 p  
2006

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Angélica le agradezco la oportunidad y el apoyo en la realización de mi tesis.

A la Dra. Ana Flisser, por sus consejos y ayuda cuando más los necesite.

A mis sinodales Isabel Cristina Cañeda Guzmán, Mirza Gabriela Romero Valdovinos y Guillermina Ávila Ramírez por sus comentarios y correcciones.

A todos los integrantes del laboratorio de biología molecular e histocompatibilidad del Hospital “Dr. Manuel Gea González”, especialmente a Vic.

**A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

## DEDICATORIAS

A mi mamá por todo su amor, apoyo incondicional, por creer en mi y por a pesar de todo, nunca darse por vencida y seguir luchando día con día, gracias.

A mi abuelo el Capitán Gerardo Flores Fuentes, por brindarme su apoyo durante toda mi vida, por ser como un padre para mi, por su cariño y amor.

A mi hermana Eunice y mis hermanos Daniel y Carlos, por su amor y forma de ser.  
A Lalo por ser como un hermano para mi.

A mis tías, a mis primos y a toda mi familia por su apoyo, comprensión y cariño.

A la familia Morales Castillo por su apoyo.

A mis todos mis amigos especialmente a Angélica y José Luís por su amistad, cariño y apoyo incondicional.

A todos mis maestros y a todas las personas que son parte de mi vida.

A Ricardo por todo su amor, apoyo, por estar en las buenas y en las más malas y por compartir su vida conmigo.

## EN MEMORIA DE

Mi padre Ernesto Ortiz Díaz, porque aunque no lo conocí, se que me quería.

Mamá Lala por ser como una segunda madre para mi y por todo lo que me dio.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCION .....	3
Clasificación del género <i>Leishmania</i> .....	5
Formas del parásito y ciclo de vida.....	6
Respuesta inmunológica .....	8
Variación genética y genes susceptibles a la leishmaniasis.....	10
El caso de: <i>Nramp1</i> .....	12
2. ANTECEDENTES .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVO GENERAL .....	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
Población de estudio .....	21
Extracción de DNA .....	22
Análisis de los polimorfismos del gen <i>NRAMP1</i> .....	22
Polimorfismos del gen <i>NRAMP1</i> , alelos e iniciadores específicos.....	23
PCR de las regiones polimórficas del gen <i>NRAMP1</i> .....	23
Verificación de la amplificación.....	24
Digestión de los productos de la PCR con endonucleasas de restricción .....	24
Determinación de los alelos del gen <i>NRAMP1</i> .....	24
8. RESULTADOS.....	27
Amplificaciones de los polimorfismos del gen <i>Nramp1</i> .....	27
Digestiones de los polimorfismos del gen <i>Nramp1</i> .....	28
Genotipos y alelos .....	30
Análisis estadístico .....	35
9. DISCUSIÓN .....	36
10. CONCLUSIONES .....	42
11. GLOSARIO .....	43
12. APENDICE.....	45
13. BIBLIOGRAFIA .....	48

## RESUMEN

La Proteína de Resistencia Natural Asociada a Macrófagos 1 (Nramp1) regula la activación del macrófago y tiene múltiples efectos pleiotrópicos, incluyendo la regulación de TNF- $\alpha$ , IL1B y las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad, liberación de óxido nítrico y flujo de L-arginina. La proteína es un transportador de protones/cationes bivalentes que se localiza en las membranas de los compartimientos endosómicos tardíos y lisosómicos, pero no en los endosomas tempranos. Estudios recientes demuestran que Nramp1 tiene un efecto directo en el procesamiento de antígenos posiblemente regulando la actividad de las proteasas en el compartimiento endosómico tardío. En el humano, se han descrito hasta la fecha 20 polimorfismos del gen *NRAMP1*, los estudios de segregación en leishmaniasis visceral mostraron ligamiento y asociación con los polimorfismos GT<sub>n</sub>, 274C/T y 469+14G/C en dos poblaciones del Sudán, además de que algunos polimorfismos se asocian con otras enfermedades intracelulares como lepra, malaria y tuberculosis. El objetivo de este trabajo es evaluar la asociación de 3 polimorfismos del gen *NRAMP1* con leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis cutánea localizada (LCL). Se analizaron 78 muestras de sujetos con LCL y 14 con LV, incluyéndose 127 y 90 testigos, todos ellos residentes de las áreas endémicas de Pichucalco y Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, respectivamente. Se realizó la PCR de las regiones polimórficas 274C/T, 1465-85G/A y A318V, el producto de la PCR fue digerido con las enzimas MnlI, BsrI e Itai, para determinar los alelos: 274C/T 1 y 2, 1465-85G/A 1 y 2, A318V 1 y 2. Las digestiones se analizaron en geles de acrilamida al 6%. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas en cada grupo. El grado de heterocigocidad encontrado fue de 32.05% para pacientes y 59.06% para testigos en LCL, 50.0% para pacientes y 40.0% para testigos en LV para el polimorfismo 274C/T; 48.7% para pacientes y 53.5% para testigos en LCL, 50.0% para pacientes y 44.4% para testigos en LV para el polimorfismo 1465-85 G/A; 0% para pacientes y testigos en LCL y LV para el polimorfismo A318V. Además se encontró que el genotipo 274C/T 2/2 del gen *NRAMP1* se asocia a susceptibilidad en la LCL ( $X^2Y= 8.8$ ,  $p 0.003$ ), hay 2.6 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad si un individuo es portador de este genotipo y el 24.8% de la asociación a susceptibilidad se debe a este genotipo específico. El alelo 274C/T-1 del gen *NRAMP1* se asocia a resistencia en la LCL ( $X^2Y= 10.8$ ,  $p 0.001$ ) y el 50.1% de la protección se debe a este alelo. El genotipo 274C/T 1/2 del gen *NRAMP1* ( $X^2Y= 15.2$ ,  $p 0.0001$ ) se asocia a resistencia en la LCL y el 31.3% de la protección se debe al marcador, lo cual puede ser atribuido a la participación del alelo 1. El alelo 1465-85G/A-1 del gen *NRAMP1* se asocia a la resistencia en la LV ( $X^2Y = 5.1$ ,  $p 0.02$ ) y 25.9% de la asociación a un fenotipo protector se debe a este alelo. También se aporta información con respecto a la frecuencia de los polimorfismos 274C/T, 1465-85G/A y A318V en las poblaciones estudiadas. En este trabajo se reporta por primera vez que el genotipo 274C/T 2/2 del gen *NRAMP1* se asocia significativamente a susceptibilidad con LCL en una población mexicana. Aunque esta variante no representa un cambio en la estructura de la proteína, los polimorfismos cercanos que están en desequilibrio de ligamiento podrían ser los verdaderos responsables de los cambios en la función de la proteína.

## 1. INTRODUCCION

La leishmaniasis es causada por parásitos intracelulares obligados del género *Leishmania*: las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían dependiendo de la especie y características del parásito, como la infectividad, patogenicidad, virulencia; así como de factores y respuestas propios del hospedero, estado nutricional, inmunológico, susceptibilidad genética, edad. Se reconocen cuatro formas clínicas: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), cutánea difusa (LCD), mucocutánea (LMC) y visceral (LV). En casi todos los casos la leishmaniasis es principalmente zoonótica, ya que los parásitos provienen en su mayoría de animales salvajes.

Esta enfermedad se transmite por la picadura de insectos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, después de 7 a 10 días de la picadura, una pequeña pápula aparece, usualmente indolora, pero puede producir mucha comezón. En casi todos los casos la pápula eventualmente se convierte en úlcera, produciendo una lesión creciente en forma de cráter, con un borde característico elevado e inflamado (Figura 1.a); otra forma de la enfermedad es la LCD (Figura 1.b), en la que se desarrollan un gran número de nódulos no ulcerados en casi todo el cuerpo. En la LMC (Figura 1.c) se producen lesiones metastásicas en la mucosa nasal, faringe y laringe, éstas pueden surgir varios meses o años después de la lesión original y suelen ser extremadamente mutilantes. Otros sitios a donde se puede diseminar la enfermedad son al hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, causando de esta forma la LV (Figura 1.d, Lainson y Shaw, 2005).

Esta enfermedad se encuentra principalmente en regiones tropicales y subtropicales, en ambientes de bosques tropicales hasta desiertos, en áreas rurales y peri urbanas. La Organización Mundial de la Salud estima que hay 350 millones de personas en riesgo, en 88 países alrededor del mundo ([http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html)), cada año 1.5-2 millones de personas desarrollan la enfermedad y mueren aproximadamente 70,000 personas al año. Noventa por ciento de la LC se desarrolla en Afganistán, Arabia Saudita, Argelia, Brasil, Irán, Pakistán, Perú y Siria; 90% de la LV ocurre en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán y 90% de la LMC se presenta en Bolivia, Brasil y Perú (Murray *et al*, 2005).



Fig 1. Lesiones de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis, a) Leishmaniasis cutánea localizada, b) Leishmaniasis cutánea difusa, c) Leishmaniasis mucocutánea y d) Leishmaniasis visceral. (Fig. a, b y d tomada del Laboratorio de Leishmaniosis, InDRE, SSA, México, 2000 y Programa de Control y Prevención de Enfermedades Transmitidas por Vector, SSA, Chiapas, México, 2000. Fig. c (tomada de Yamaguchi, 1981).

En América Latina la leishmaniasis está ampliamente distribuida, con excepción de Chile y Uruguay que parecen estar libres de esta enfermedad, se han encontrado casos desde el sur de Argentina hasta Texas. Es difícil calcular la incidencia ya que no es una enfermedad de notificación obligatoria en la mayoría de países donde se presenta. De las enfermedades tropicales en América Latina, hoy en día la LV ocupa el 2º lugar de importancia después de la malaria, en 1980 se calcularon 6,000 casos tan sólo en Brasil.

En México el primero que describió la leishmaniasis fue Seidelin en 1912, quien la llamó “úlceras de los chicheros”, por encontrar lesiones ulcerosas con mucha frecuencia en el pabellón auricular de ese tipo de trabajadores (Becker, 2006).

En nuestro país, la mayoría de los casos que se han encontrado son de LCL, principalmente en el sureste del país en los Estados de Campeche, Chiapas, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán, lo que constituye el foco sur. También se han encontrado casos en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (foco norte). Los casos de LCD son de menor frecuencia y se han encontrado en los Estados del foco norte y del foco sur, con la excepción de Quintana Roo y Yucatán (Fig. 2), en ambos tipos de LC la especie identificada ha sido *Leishmania mexicana*. Se han detectado algunos casos de LMC en los Estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz, causados aparentemente por *L. braziliensis*, (Velasco-Castrejon, 1987 y 1994; Grimaldi y Tesh, 1993; Chance, 1986) y en cuanto a la LV, existe un foco en la cuenca del Balsas, en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla causados por *L. chagasi*, existiendo otro foco en Chiapas (Velasco-Castrejon, 1987).

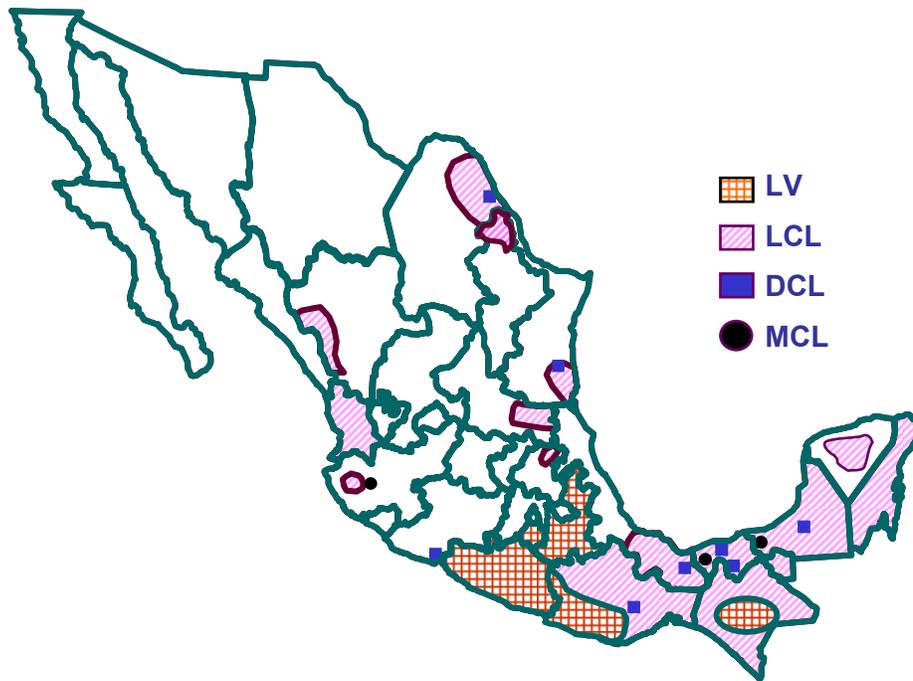


Fig. 2. Estados de la República Mexicana en donde se localizan los diferentes tipos de leishmaniasis (Modificado de Velasco Castrejón, 1994).

### Clasificación del género *Leishmania*

*Leishmania* es uno de varios géneros de la familia Trypanosomatidae, clase Kinetoplastida, orden Trypanosomatida. Las propiedades de la familia de los Trypanosomatidae son la posesión de un cinetoplasto, un solo flagelo que se origina de la bolsa flagelar y una alternancia entre los hospederos vertebrado y artrópodo durante su ciclo de vida. El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, según el sitio en que se desarrollen en el intestino de la mosca trasmisora. La localización de *Leishmania* es suprapilórica, próxima a la probóscide, mientras que *Viannia* se aloja en las porciones media y posterior del intestino (Becker, 2006). Estos parásitos necesitan de dos tipos de hospederos, invertebrados y vertebrados, estos últimos son mamíferos, en los cuales el parásito reside en las células del sistema fagocítico mononuclear, dentro de los fagolisosomas; los hospederos invertebrados o vectores pertenecen al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, estos son moscas dípteras pequeñas de la familia Psychodidae, en la cual sólo las hembras son hematófagas y por lo tanto son las que transmiten la enfermedad (Bates y Ashford, 2005).

## Formas del parásito y ciclo de vida

El parásito existe principalmente en 2 formas morfológicas: amastigote en el hospedero vertebrado y promastigote en el vector. Los amastigotes son intracelulares, ovoides, no tienen movilidad y se encuentran dentro de una vacuola parasitófora (VP) de células fagocíticas como el macrófago. Los promastigotes son extracelulares, alargados, tienen flagelo y se localizan dentro del intestino del vector y en los cultivos (Fig. 3).

En estudios experimentales se ha observado que el desarrollo del parásito en el vector es suficientemente rápido para que se produzcan los promastigotes infectivos cuando la hembra está lista para volver a alimentarse, lo cual puede ser tan pronto como de 5 a 7 días bajo condiciones óptimas; el desarrollo del parásito ocurre exclusivamente en el intestino de la mosca y comienza cuando ingiere macrófagos infectados (los macrófagos se desintegran en cuestión de horas) o amastigotes libres. El primer paso es la transformación, de amastigote a promastigote procíclico pasando por diferentes estadios de promastigotes, hasta alcanzar la forma infectiva que son los promastigotes metacíclicos, los cuales se acumulan en la parte anterior y media del intestino de la mosca, este proceso toma de 24 a 48 horas. En experimentos *in vitro* se ha observado que la transformación de los parásitos a promastigotes coincide con la división de estos (Bates y Ashford, 2005).

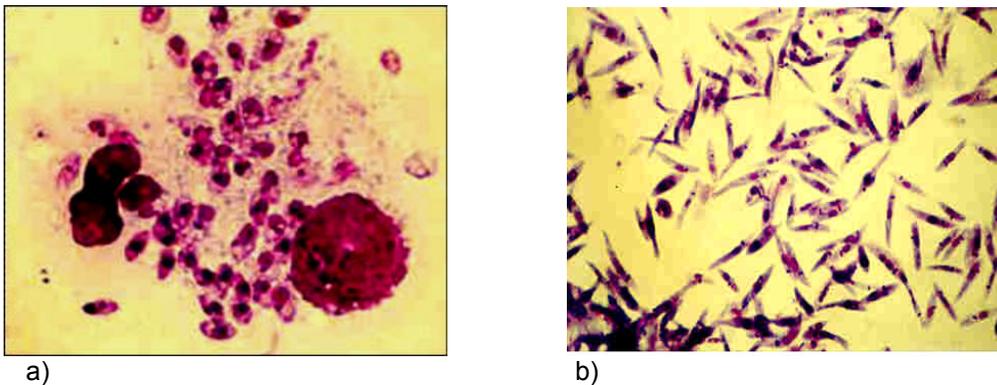


Figura 3. Estadios principales de la *Leishmania* sp. a) Conjunto de amastigotes dentro de un macrófago y b) Cultivo de promastigotes (Laboratorio de Leishmaniosis, InDRE, SSA, México, 2000).

La transmisión se realiza cuando una mosca infectada pica a un hospedero mamífero, para alimentarse. Existe un debate en cuanto a los mecanismos precisos que ayudan en la transmisión y el grado hasta el cual participan los parásitos; las dos principales propuestas son que los promastigotes metacíclicos son directamente inoculados a través de la probosis del

vector; o que son regurgitados desde el intestino, mientras la mosca se alimenta. Durante la transmisión el parásito es inoculado con saliva de la mosca, la cual favorece la infectividad en el hospedero vertebrado. El desarrollo de la leishmania continúa cuando a los promastigotes metacíclicos se fijan moléculas del complemento, que sirven como ligandos para unirse a receptores del complemento en macrófagos, para de esta forma promover la fagocitosis; aunque no se puede descartar la participación activa del parásito. Después de la fagocitosis los parásitos son internalizados en un fagosoma, el cual después se fusiona con lisosomas y/o endosomas para formar la vacuola parasitófora o fagolisosoma, durante este proceso el promastigote se transforma en amastigote, aproximadamente en 2 días; los amastigotes ya transformados completamente, crecen y se dividen por fisión binaria en la VP, hasta romper al macrófago, para de esta forma infectar a otros (Fig. 4, Bates y Ashford, 2005; Antoine *et al*, 1998).

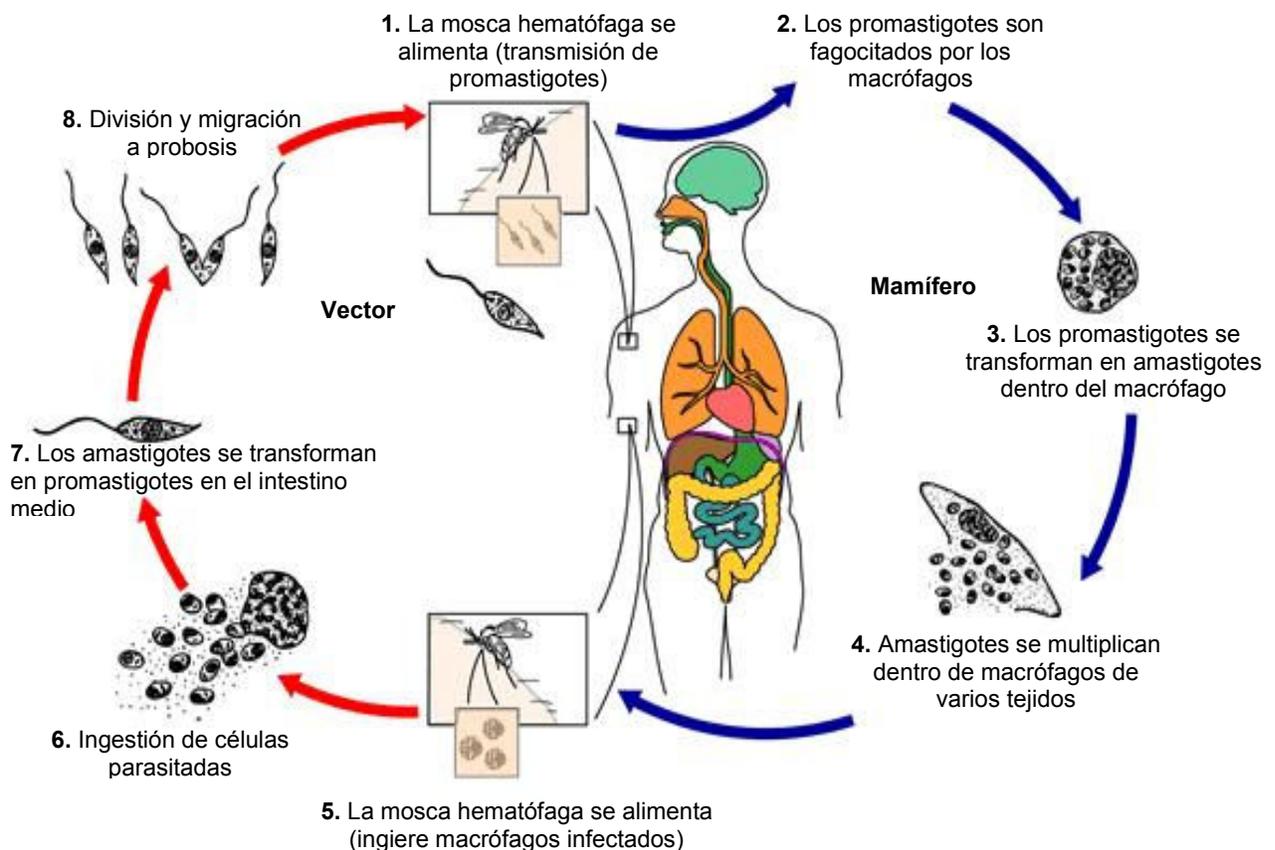


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania sp.*, tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

## Respuesta inmunológica

En el modelo murino se pueden reproducir muchos aspectos de la leishmaniasis humana incluyendo una variedad de estados susceptibles, dependiendo de la cepa de ratón usada. Los ratones con fondo genético BALB/c, cuando son infectados con *L. major* son muy susceptibles a la enfermedad, al infectarlos desarrollan úlceras grandes que se expanden y sufren metástasis, para finalmente morir. Por otro lado las cepas de ratones C57BL/6 y CBA/N son resistentes, estos desarrollan pequeñas lesiones que curan de 10 a 12 semanas y son resistentes a la reinfección. La mayoría de las otras cepas son intermedias en susceptibilidad. En los ratones, el resultado de la infección depende de su fondo genético y de la activación polarizada de uno de los dos subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, Th1 o Th2, esta subdivisión de células se basa en el patrón de citocinas que produce. Las células Th1 producen interferón (IFN)- $\gamma$ , interleucina (IL)-2 e IL-12; mientras que las tipo Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10. La inmunidad protectora en los ratones depende de la inducción de células T que secretan citocinas tipo Th1 que activan a los macrófagos y matan a los organismos intracelulares, principalmente a través de mecanismos mediados por óxido nítrico (NO). Los ratones BALB/c producen principalmente citocinas Th2, en particular IL-4, que regula negativamente la expresión de la subunidad  $\beta 2$  de los receptores de la IL-12; este patrón se establece unas horas después de la infección. Un factor importante en la decisión de formar un fenotipo u otro (Th1/Th2), es el ambiente temprano de citocinas, la IL-12 es una de las citocinas que contribuye significativamente a establecer el fenotipo Th1 ya que induce la producción de IFN- $\gamma$  por células T y asesinas naturales (NK), esta citocina induce la producción de NO y la eliminación de los parásitos por los macrófagos (Handman, 2001).

La fuente más importante de IL-12, es probablemente el conjunto de células dendríticas, las que al igual que los macrófagos son células presentadoras de antígenos (APC) y son muy importantes en la respuesta inmunológica contra la leishmaniasis. Las células dendríticas al ser infectadas, contienen pocos parásitos pero son muy eficientes en estimular células Th0, por el contrario, los macrófagos son hábiles rastreadores de *Leishmania* pero son permisivos a la infección, a menos que sean estimulados por citocinas. Se ha demostrado que las células dendríticas de la piel infectadas con *L. major*, (también conocidas como células de Langerhans) pueden migrar del sitio de infección a ganglios linfáticos donde estimulan células T específicas para *L. major*. Durante esta migración y su interacción subsecuente con células T, las células dendríticas maduran a potentes APC que activan a otros macrófagos para la eliminación del parásito. Otra citocina importante en la resolución de la infección es el factor de necrosis

tumoral (TNF)- $\alpha$ , la manera en la que esta citocina participa es en su capacidad para incrementar la activación del macrófago y la producción de NO (Rogers *et al*, 2002).

Los macrófagos son las principales células que actúan como hospedero para las leishmanias, pero estas células al ser activadas eliminan a los parásitos, ya que cuentan con sistemas de defensa potentes como el estallido oxidativo y la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs, Sacks y Sher, 2002). La forma en que los macrófagos activados eliminan a los parásitos es a través del estallido oxidativo, que es inducido por la adhesión y fagocitosis de agentes patógenos, este proceso resulta de la activación de una oxidasa (NADPH), que cataliza la reducción de oxígeno al anión superóxido ( $O_2^-$ ), un ROI extremadamente tóxico para los parásitos. El  $O_2^-$  también genera otros agentes oxidativos, incluyendo radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Por otro lado, cuando los lisosomas se fusionan con el fagosoma, la actividad de la mieloperoxidasa produce hipoclorito a partir de iones de cloro y peróxido. Otro de los mecanismos efectores clave para la eliminación de la leishmania es cuando los macrófagos se activan (principalmente por citocinas Th1) y expresan altos niveles de sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), la cual es una enzima que oxida a la L-arginina y produce L-citrulina y NO (Kuby, 1997).

Debido a que el macrófago es un ambiente hostil para la leishmania, especializado en la destrucción de patógenos y una de sus funciones principales es iniciar una respuesta inmunológica, la *Leishmania* ha desarrollado mecanismos sofisticados de evasión (Gregory y Olivier, 2005), entre los que se encuentran la modificación de compartimientos dentro del macrófago, como la VP o fagolisosoma; un compartimiento que tiene pH ácido, contiene hidrolasas y dentro del cual reside el parásito la mayor parte de su vida, las VPs varían morfológica y funcionalmente dependiendo de la especie de *Leishmania* que albergan (Antoine *et al*, 1998).

Una vez que la *Leishmania* está bien establecida dentro del macrófago, causa activación aberrante de varias funciones del macrófago, particularmente en la secreción de citocinas quimiotácticas, ya que el parásito inhibe la producción de citocinas, principalmente las que están involucradas en la respuesta inflamatoria. En las etapas tempranas de la infección, la inhibición de funciones del macrófago, que son perjudiciales para la sobrevivencia del parásito, es muy importante y se da por: la represión de genes, la modificación post-transcripcional de proteínas, particularmente degradación, como ocurre con las moléculas del complejo principal de

histocompatibilidad (MHC) clase II y por la activación de moléculas y rutas de supresión (Gregory y Olivier, 2005).

Las principales moléculas causantes de estos mecanismos de evasión son la lipofosfoglicana (LPG) y la proteasa de 63-kDa (gp63), que son proteínas de superficie que actúan como ligandos y factores de virulencia. La LPG es la molécula más abundante de la leishmania y es responsable de la inhibición temprana de la fusión fagolisosómica, la eliminación de ROIs y la inhibición del estallido oxidativo. La gp63 también es responsable de este último mecanismo, así como de la inhibición de enzimas fagolisosómicas (Bogdan y Röllinghoff, 1998).

### Variación genética y genes susceptibles a la leishmaniasis

La cantidad y tipo de variación genética en una población son potencialmente afectadas por varios factores, como la selección, entrecruzamiento, deriva génica, flujo génico y mutación. Estos factores tienen diferentes efectos, por ejemplo la mutación puede ser considerada siempre como un aumento en la cantidad de variación y tanto la deriva génica como el entrecruzamiento reducen la cantidad de variación, por otro lado la selección y el flujo génico pueden incrementar o reducir la variación genética, dependiendo de la situación particular; la combinación de dos o más de estos factores puede generar virtualmente cualquier cantidad o patrón de variación genética. Con respecto a las mutaciones, la identificación de genes relacionados con enfermedades debido a que sufren cambios que causan pérdida o alteración de su función, llevó a la búsqueda y relación de variaciones génicas entre individuos y poblaciones. Una de las primeras técnicas usadas para medir la variación genética del DNA, fue a través de endonucleasas de restricción, las cuales reconocen y cortan secuencias específicas de DNA, generando de esta forma diferentes patrones (Hedrick, 2000)

Mediante la secuenciación del genoma humano, se abre la posibilidad de identificar variantes génicas en diferentes poblaciones, asociar su presencia con fenotipos individuales (incluyendo susceptibilidad a enfermedades) y determinar el impacto funcional de dichas variaciones. Hoy en día, la fuente más abundante de variación genética en el genoma humano proviene de los polimorfismos de un nucleótido o SNPs (se han encontrado aproximadamente 9 millones de SNPs) y la asociación de los SNPs con enfermedades tiene un gran potencial para la aplicación clínica directa, al proporcionar más y nuevos marcadores genéticos específicos para usos de diagnóstico y posibles blancos terapéuticos. Con el mejoramiento de los métodos de

descubrimiento de SNPs, como la secuenciación, es cuestión de tiempo antes de poder evaluar un gran número de variaciones genéticas en las regiones codificadoras y reguladoras para identificar SNPs funcionales, para estudios de asociación directa (Suh y Vijg 2005). La diversidad genética parece no sólo estar limitada a nivel de polimorfismos, sino también a una combinación específica de alelos (haplotipos) ligados, en sitios cercanos (Sachidanandam, 2001).

Antes de investigar la variación genética en poblaciones humanas, estudios en cepas de ratones, permitieron encontrar hallazgos importantes acerca del fondo genético y su relación a la respuesta contra diferentes patógenos, en este caso específicamente contra la leishmaniasis. Al realizar análisis genéticos de los fenotipos de la enfermedad en cepas de ratones endogámicos, recombinantes y retrocruzas, infectados con *L. major* y *L. mexicana*, fue posible el mapeo de genes de susceptibilidad en cinco diferentes regiones del genoma, *Scf-2* cromosoma 4 del ratón/9p del humano, *Scf-1* cromosoma 11 del ratón/17q del humano, grupo Th2 cromosoma 11 del ratón/5q del humano, el MHC cromosoma 17 del ratón/6p del humano y *Nramp1* cromosoma del ratón 1/2q35 del humano (Blackwell, 1996).

El gen *Scf-2* se identificó y mapeo en el ratón como un gen que controla un fenotipo único de “no crecimiento de la lesión” en ratones DBA/2 infectados con *L. mexicana*, debido a que no se sabe nada más de este gen, se propone posibles candidatos por su localización como la tirosina cinasa JAK, la cual es importante en la vía de activación del macrófago mediada por INF- $\gamma$  (Blackwell, 1996).

El gen *Scf-1* se identificó y mapeo en el ratón como uno de los genes responsables en controlar la curación de lesiones en cepas endogámicas infectadas con *L. major*. Este gen se ubica en la región distal del cromosoma 11 del ratón, donde se encuentra el gen de la iNOS, *Nos2*, que es importante en la generación de NO, además de una serie de genes para las monocinas JE, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  y RANTES, quienes son producidas por macrófagos activados y son importantes en el reclutamiento de monocitos al sitio de infección (Blackwell, 1996).

Al analizar el crecimiento de la lesión en cepas endogámicas recombinantes de ratones infectados con *L. major*, se encontró evidencia de la participación del grupo Th2 en controlar etapas tardías de la infección, este complejo incluye genes de IL4, IL5 e IL9. Estudios en el

humano han identificado polimorfismos en los genes de IL4 e IL9 asociados con susceptibilidad a asma (Blackwell, 1996).

El uso de cepas de ratones congénicos H-2 ha demostrado evidencias del papel del MHC en regular todas las infecciones en el ratón, pero no tan dramáticamente como la infección por *L. donovani*. El uso de anticuerpos anti-IA (equivalente al HLA-DQ en el humano) y anti-IE (equivalente al HLA-DR en el humano) in vivo y el análisis de cepas de ratones transgénicos para I-E demostraron que el polimorfismo en las moléculas clase II es directamente responsable de las diferencias en el fenotipo de la enfermedad, pues los haplotipos I-E<sup>d/k</sup> son responsables de la respuesta no curativa. El análisis molecular de los genes HLA-clase II de pacientes mexicanos, demostró la existencia de cuatro alelos involucrados en la susceptibilidad a desarrollar LCL: DRB1\*0407 (p 0.004), DQA1\*03011 (p 0.01), DPA1\*0401 (p 0.01), DPB1\*0101 (p 0.004) y se encontró también el alelo de protección DPB1\*0401 (p 0.003). Grandes diferencias en niveles de TNF- $\alpha$  en suero en pacientes diagnosticados con LMC, LCL y LCD vs. testigos sugiere que los polimorfismos de los genes de clase III podrían estar involucrados en la regulación de los fenotipos de la enfermedad (Olivo-Díaz *et al*, 2004; Blackwell, 1996; De la Rosa-Lopez, 2005).

#### El caso de: *Nramp1*

El gen *Nramp1* se localiza en el cromosoma 1 y codifica para la proteína natural de resistencia asociada a macrófagos, fue reconocido primero como *Ity/Lsh/Bcg* por su papel en controlar las fases tempranas de la infección con *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani* y *Mycobacterium bovis*, en ratones; esto se determinó a través de retrocruzas de cepas de ratones, identificándose posteriormente una mutación que resulta en una sustitución no conservada de una glicina por un ácido aspártico en la posición 169, en el cuarto dominio transmembranal de la proteína, el efecto de esta mutación crea un fenotipo susceptible (Blackwell *et al*, 2000).

*Nramp1* también conocido como transportador de solutos 11a1 (Slc11a1, de la familia de transportadores de iones de metales) miembro 1, es una proteína integral de membrana con 10 a 12 dominios transmembranales, con un tamaño de 548 aminoácidos, tiene un motivo estructural de transporte, un dominio de homología Src 3 (SH3), característico de proteínas de señalización y 5 sitios de fosforilación para la proteína C cinasa (PKC) (Yip *et al*, 2003). Esta

proteína se localiza en la membrana de endosomas tardíos principalmente en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Usando como modelo ovocitos de *Xenopus* se demostró que la proteína es un transportador de cationes divalentes como Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>, dependiendo del pH (Blackwell *et al*, 2001). En la figura 5 se muestra un diagrama hipotético de la proteína Nramp1.

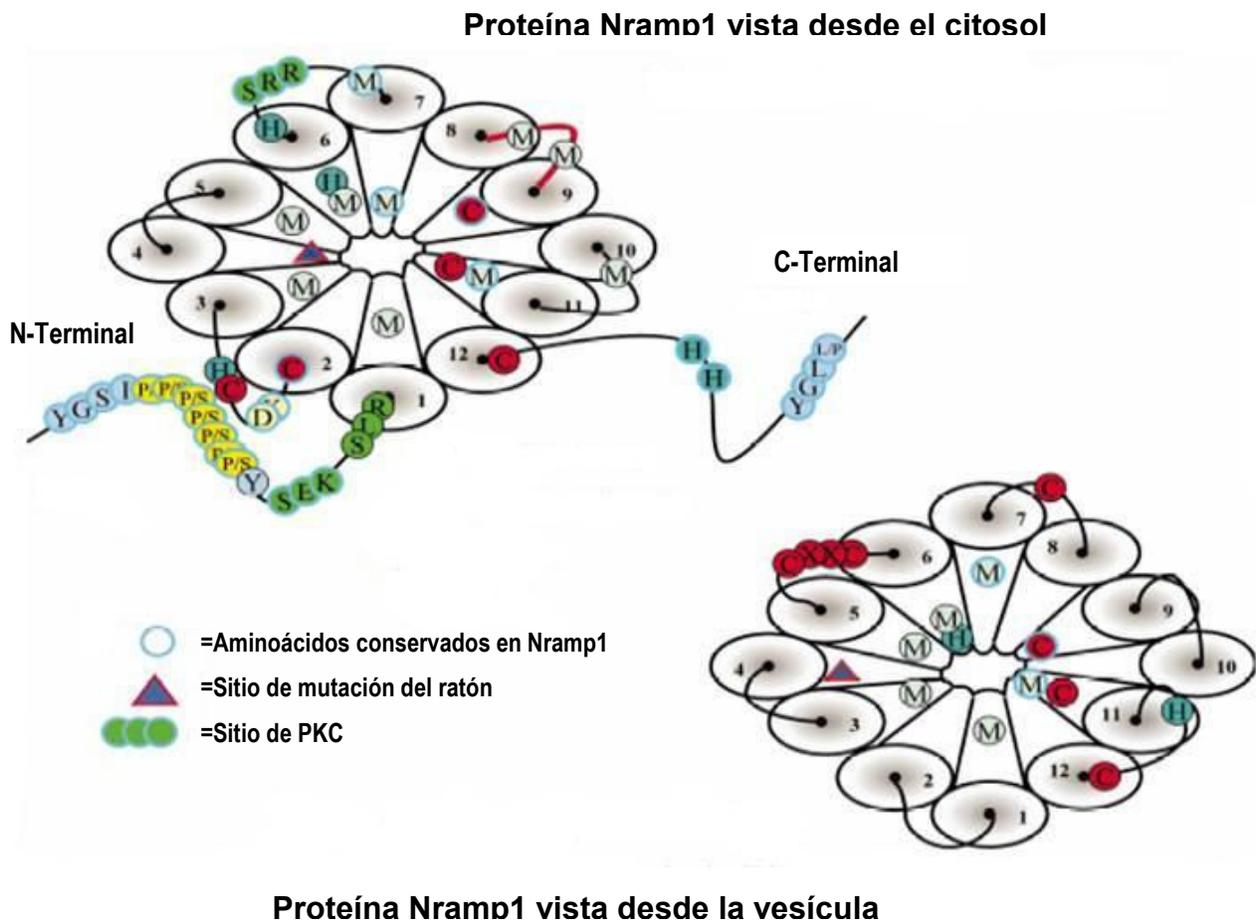


Figura 5. Diagrama hipotético de la proteína Nramp 1. Hasta el momento no se sabe del todo como se relacionan la secuencia de la proteína y la estructura con la función y se especula la manera en la que se encontraría en la membrana de los endosomas y que características de la molécula podrían ser importantes para su función (Blackwell *et al*, 2001).

En el modelo de ratón se observó que el gen Nramp1 participa en una etapa temprana de la activación de macrófagos, a través de la regulación de: el gen KC, un quimioatrayente de

neutrófilos que pertenece a la familia CXC de pequeñas citocinas, la IL-1 $\beta$ , moléculas de MHC clase II, TNF $\alpha$ , iNOS, flujo de L-arginina, liberación de NO, estallido oxidativo y actividad antimicrobiana; específicamente se observó un aumento en la expresión de la iNOs y la generación de NO y ROI's. La forma en que esta proteína puede tener estos efectos sobre el macrófago se debe a que transporta iones del citosol al fagolisosoma, que podrían participar en diferentes reacciones, generando radicales tóxicos para los parásitos intracelulares, como en la reacción de Fenton que usa el Fe<sup>2+</sup> para generar radicales OH, otra reacción importante es la de Haber Weiss que utiliza el Fe<sup>3+</sup> para generar O<sub>2</sub> (Fig. 6, Blackwell *et al*, 2001).

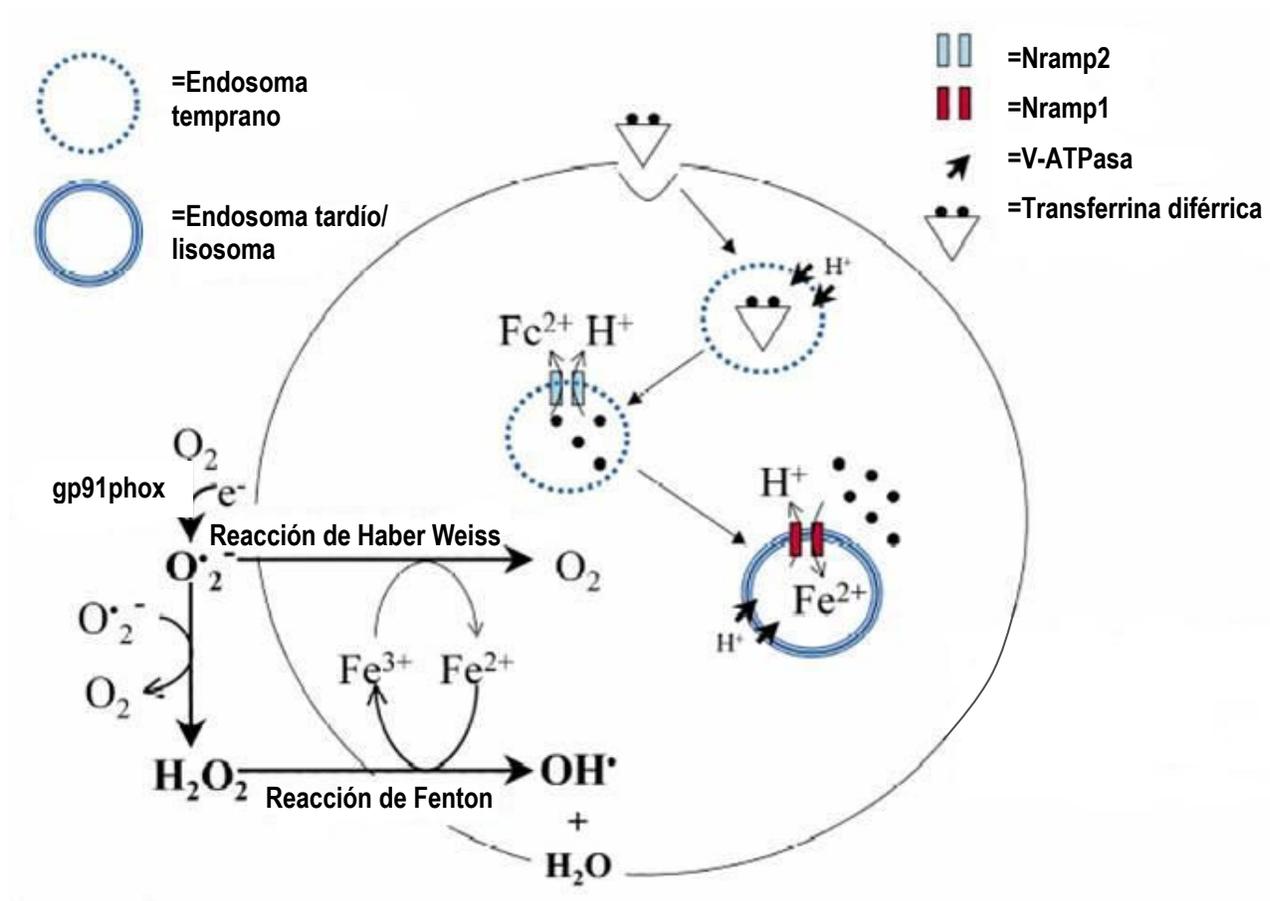


Figura 6. Modelo de la homeostasis de cationes divalentes y su relación con las vías antimicrobianas dependientes de oxígeno. La actividad transportadora del Nrap1 traslada iones divalentes del citosol a los lisosomas, donde la reacción de Fenton genera radicales tóxicos. En macrófagos silvestres se ha observado mayor estabilidad del mRNA de Nrap1 que en los mutantes (Blackwell *et al*, 2001).

En cuanto a la importancia de los dominios estructurales, se sugiere que el dominio SH3 fosforilado podría mediar el transporte de L-arginina, que es el sustrato para la síntesis de NO (Bellamy, 1999), mientras que la actividad de PKC puede estar ligada con la regulación del

transporte de Hierro, ya que la inhibición de PKC disminuye el transporte de hierro al fagosoma. Con respecto a los residuos específicos de cisteína, histidina y metionina, marcados como C, H y M en la figura 5, estos se encuentran conservados en proteínas Slc11a1 de mamíferos y aves, por lo que podrían ser de importancia en sus funciones básicas (Blackwell *et al*, 2001).

Otra hipótesis es que Nramp1 también contribuye a la acción microbicida, extrayendo los iones divalentes del fagolisosoma, privando de esta forma a los microorganismos de co-factores esenciales para enzimas (ej. superóxido dismutasa) o simplemente requeridos para su crecimiento (Mackenzie y Hediger, 2004). Las funciones celulares dependientes de iones de metales como cofactores ayudan a explicar los múltiples efectos de la proteína Nramp1 y su complejo papel en la susceptibilidad a diferentes enfermedades.

El papel de Nramp1 se confirmó con líneas celulares de macrófagos transfectados *in vitro*, análisis de genes “knock out” y ratones transgenicos (Blackwell *et al*, 2000); otros estudios incluyen diferencias entre macrófagos derivados de líneas susceptibles y resistentes a *Mycobacterium sp*, en las que estas últimas tenían mayor producción de intermediarios reactivos del oxígeno, así como los macrófagos silvestres y mutantes diferían en su capacidad de ser activados en respuesta a una serie de productos microbianos y/o citocinas propias (Bellamy, 1999). Esto llevó a la especulación de que algo similar ocurría en el humano, por lo que se buscó y mapeó el gen, en el cromosoma 2q35, que tiene un tamaño de 12 kb, esta compuesto por 15 exones, codifica para una proteína de 550 aminoácidos, tiene 83% de identidad y 93% de similitud con la proteína del ratón (Marquet *et al*, 2000), pero a diferencia de éste, en el humano se encontraron inicialmente 9 polimorfismos y posteriormente otros 3. En la figura 7 se observa la ubicación de los 12 polimorfismos (Liu *et al*, 1995; Blackwell *et al*, 2004).

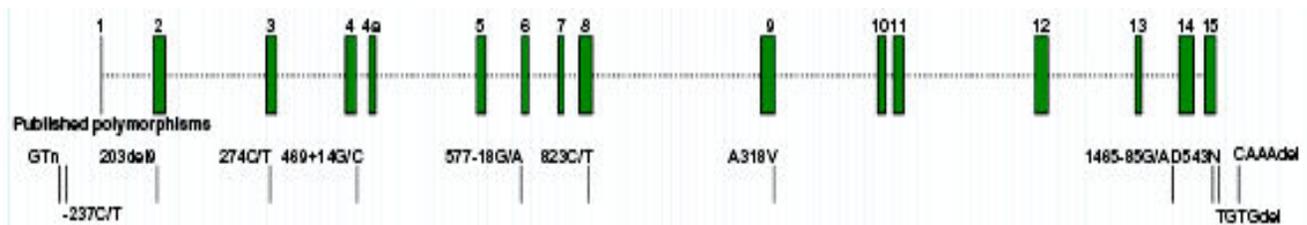


Figura 7. Ubicación y nombres de los 12 polimorfismos del gen NRAMP1 y los 15 exones (Blackwell *et al*, 2004).

A partir del descubrimiento de las variantes del *NRAMP1* en el humano, se buscó la relación que estas podrían tener con las enfermedades intracelulares ya estudiadas en el ratón, así como su influencia en diferentes poblaciones.

Al igual que se encontró el gen homólogo en el humano, se han identificado homólogos de *NRAMP1* en muchos organismos filogenéticamente diferentes, incluyendo *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Oryza sativa*, *Saccharomyces cerevisiae* y hasta *Mycobacterium leprae*. La conservación de homólogos de *NRAMP1* en especies de eucariontes y procariontes sugiere que los genes en la familia de *NRAMP* tienen un origen antiguo, de por lo menos 1,000 millones de años y una función de transporte y estructura conservada. El 37% de identidad entre la proteína del macrófago y su homólogo en *M. leprae* sugiere que el hospedero y el parásito podrían estar compitiendo por una sustancia esencial para la sobrevivencia del microorganismo (Bellamy, 1999).

## 2. ANTECEDENTES

Así como se ha reconocido la influencia del gen *Nramp1* en controlar la enfermedad causada por *Leishmania sp*, otras especies intracelulares como *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, también son influenciadas por este gen (Blackwell *et al*, 2000).

Debido a su importancia en la activación del macrófago, el interés en el gen ha ido en aumento y se ha analizado su posible relación con enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide en caucásicos canadienses y en coreanos, enfermedad del colon irritable en japoneses, esclerosis múltiple en caucásicos de África del Sur, sarcoidosis en afro-americanos y artritis reumatoide juvenil en una población al norte de Europa (Yip *et al*, 2003). Los estudios de asociación alélica muestran que el alelo 2 del polimorfismo de la región promotora del *NRAMP1* se asocia con susceptibilidad a la tuberculosis, esto se observó en un estudio de casos y controles de 72 individuos no relacionados en Brasil, así como también en Gambia con 400 casos y controles y en una población de aborígenes canadienses (Blackwell *et al*, 2000). Los estudios de familias han mostrado ligamiento entre alelos del *NRAMP1* y la tuberculosis en coreanos y japoneses. En la lepra se encontró una asociación, aunque débil, en *NRAMP1* y susceptibilidad en 20 familias de Vietnam (Bellamy, 1999); otros estudios incluyen el análisis del patrón de desequilibrio de ligamiento (LD) de los alelos del gen *NRAMP1*, así como de su regiones adyacentes, en una población de 300 individuos sanos de China, donde los resultados indicaron que el LD se mantiene 110 kb corriente arriba y corriente abajo del gen (Yip *et al*, 2003).

En cuanto a la asociación del gen *NRAMP1* y la leishmaniasis se ha encontrado que el haplotipo  $GT_n-274C/T-469+14G/C$  de una población del Sudán esta ligado y se asocia a susceptibilidad con la LV (Mohamed *et al*, 2004); en esta misma población se encontraron 8 polimorfismos nuevos (Blackwell *et al*, 2004). En un estudio de familias se observó que el marcador  $(CA)_n$  segrega con la enfermedad, en la población Aringa del Sudán (Bucheton *et al*, 2003); sin embargo en otro trabajo también en familias, en una población de Brasil, no se encontró asociación con la leishmaniasis (Blackwell *et al*, 1997).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Hace más de 20 años se determinó un factor genético involucrado en la respuesta temprana a la infección con patógenos intracelulares como *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani* y *Mycobacterium bovis* en cepas de ratones endogámicos. El gen reconocido como *Nramp1* crea un fenotipo susceptible a estos microorganismos por una mutación que cambia una glicina por un ácido aspártico en el cuarto dominio de la proteína, causando una alteración en su estructura; esto se ha comprobado en líneas celulares de macrófagos *in vitro*, análisis de genes “knock out”, transgénicos y ratones *in vivo* (Blackwell *et al*, 2000). En el humano no hay un polimorfismo equivalente a la mutación murina, sino varias mutaciones o SNPs. Se han descrito varias asociaciones alélicas de los SNPs del gen *NRAMP1* en distintas infecciones intracelulares, como tuberculosis, lepra, meningitis meningococcica, leishmaniasis, así como en algunas enfermedades autoinmunes en diferentes poblaciones.

Dada la asociación de algunos polimorfismos como el 274C/T del *NRAMP1* en la leishmaniasis, sería importante analizar la contribución de los polimorfismos 1465-85G/A, 274C/T y A318V en la LV y la LCL en México, ya que por un lado, las especies involucradas no han sido ampliamente estudiadas y por otro lado, el fondo genético de los pacientes difiere del de las poblaciones previamente descritas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si alguno de los polimorfismos 1465-85G/A, 274C/T y A318V se asocia a la LCL y a LV, entonces se esperaría que la frecuencia génica/alélica entre pacientes y testigos tenga diferencias estadísticamente significativas.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la asociación de los polimorfismos 1465-85G/A, 274C/T y A318V del gen *NRAMP1* con la leishmaniasis cutánea localizada y con la leishmaniasis visceral, en dos poblaciones endémicas de leishmaniasis en el Estado de Chiapas, México.

#### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Determinar la frecuencia de los alelos de los polimorfismos 1465-85G/A, 274C/T y A318V.
- ❖ Determinar la frecuencia genotípica.
- ❖ Identificar los alelos asociados con leishmaniasis.
- ❖ Identificar los genotipos asociados con leishmaniasis.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de DNA de sangre periférica de cada individuo por fenol/cloroformo/alcohol isoamílico



PCR de cada muestra con los tres juegos de iniciadores, para cada polimorfismo



Electroforesis en gel de agarosa al 2%



Digestión del producto de amplificación con enzimas de restricción



Electroforesis en gel de acrilamida al 6%



Análisis estadístico

## Población de estudio

Las muestras se obtuvieron como parte de una encuesta seroepidemiológica para el diagnóstico de leishmaniasis a través del Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vector en el Estado de Chiapas, en conjunto con el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Los individuos que participaron en el estudio otorgaron su consentimiento verbal.

Pacientes con leishmaniasis cutánea localizada: Se incluyeron 78 sujetos con LCL de Pichucalco, Chiapas, México, con una relación de 1.4:1 hombre:mujer, edad promedio de 36 años, oscilando entre 1 año a 82 años de edad.

Testigos LCL: Participaron 127 individuos sanos, de la misma zona endémica, pareados por edad y residencia.

El municipio de Pichucalco pertenece a la Jurisdicción Sanitaria No. V, que se localiza en el límite de las montañas del norte y la llanura costera del Golfo, su extensión territorial es de 1,078 km<sup>2</sup>, su altitud oscila entre los 40 y 1,720 msnm y tiene una temperatura anual de 25°C. Su clima es cálido húmedo con lluvias todo el año, la vegetación original es selva alta. La población total del municipio es de 29,357 habitantes. El 41.53% realiza actividades agropecuarias y el 43.20% se emplea en actividades relacionadas con el comercio o la oferta de servicios a la comunidad ([http://www.finanzaschiapas.gob.mx/Contenido/Planeacion/Informacion/Geografia\\_y\\_Estadistica/productos/Perfiles/pdfs/pichucalco.pdf](http://www.finanzaschiapas.gob.mx/Contenido/Planeacion/Informacion/Geografia_y_Estadistica/productos/Perfiles/pdfs/pichucalco.pdf)).

Pacientes con leishmaniasis visceral: Se reclutaron 14 sujetos con LV de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México, con una relación de 1.8:1 hombre:mujer, con una edad promedio de 4 años 6 meses, oscilando entre 1 año 6 meses a 11 años.

Testigos LV: Se incluyeron 90 individuos sanos, de la misma zona endémica, pareados por edad y residencia.

El municipio de Tuxtla Gutiérrez pertenece a la Jurisdicción Sanitaria No. I, está ubicado en la depresión central del Estado, que es una zona semiplana rodeada por la Sierra Madre de Chiapas, la Altiplanicie de Chiapas y las Montañas del Norte, su extensión territorial es de 412.40 km<sup>2</sup>, su altitud es de 550 msnm. El clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias en verano, la vegetación es de selva baja. La población total del municipio es de 434,143

habitantes, 75.16% se emplea en actividades relacionadas con el comercio o la oferta de servicios a la comunidad ([http://www.finanzaschiapas.gob.mx/Contenido/Planeacion/Informacion/Geografia\\_y\\_Estadistica/productos/Perfiles/pdfs/tuxtlagutierrez.pdf](http://www.finanzaschiapas.gob.mx/Contenido/Planeacion/Informacion/Geografia_y_Estadistica/productos/Perfiles/pdfs/tuxtlagutierrez.pdf)).

El diagnóstico de los pacientes fue confirmado mediante intradermorreacción de Montenegro (IDR), presencia del parásito en improntas y aspirados de médula ósea y por inmunofluorescencia indirecta (IFI). En los testigos se confirmó la ausencia de enfermedad por IFI. El diagnóstico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Leishmaniosis del InDRE.

### Extracción de DNA

Se tomaron 20 mL de sangre periférica de cada sujeto, añadiendo EDTA como anticoagulante. Se obtuvo el sedimento de leucocitos (pastilla) por centrifugación a 1,600 x g a 4°C, durante 15 min. Los eritrocitos se eliminaron mediante dos o tres lavados con una solución de lisis de células rojas conteniendo: MgCl<sub>2</sub> 5 mM, centrifugando cada vez a 1,600 x g a 4°C durante 15 min. La pastilla se resuspendió y se trató con una solución de lisis conteniendo: NaCl 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0; Tris-HCl 10 mM, pH 7.6; SDS 0.2%; proteinasa K 300 µg/mL y se incubó a 53°C durante 12 h.

El DNA se extrajo dos veces con fenol saturado equilibrado (con Tris-HCl) a pH 8.0 (v/v), seguida de dos extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (v/v) y dos con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v). En cada extracción se agitó suavemente la mezcla hasta su homogenización y se centrifugó a 4°C durante 15 min. El DNA se precipitó con NaCl 100 mM y un volumen de isopropanol. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 500 µL de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0).

### Análisis de los polimorfismos del gen *NRAMP1*

Todas las muestras se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con iniciadores específicos para cada uno de los polimorfismos (White *et al*, 1994; Blackwell *et al*, 1995). Los alelos de cada región se determinaron por digestión con endonucleasas de restricción.

Polimorfismos del gen *NRAMP1*, alelos e iniciadores específicos.

1) Posición 274C/T, donde se encuentra C o T en el nucleótido 274: TTC o TTT (Phe) en el codón 66 del exón 3.

274C/T-1                    5'-TGCCACCATCCCTATACCCAG-3'

274C/T-2                    5'-TCTCGAAAGTGTCCTCACTCAG-3'

El producto de la amplificación tiene un tamaño de 216 pb

La digestión con la enzima de restricción Mnl I define 2 alelos: Alelo 1 (T)= 167, 37 y 12 pb; Alelo 2 (C)= 102, 65, 37 y 12 pb.

2) Posición 1465-85G/A: G o A en el nucleótido -85 del intrón 13.

1465-85G/A-1            5'-GCAAGTTGAGGAGCCAAGAC-3'

1465-85G/A-2            5'-ACCTGCATCAACTCCTCTTC-3'

El producto de la amplificación tiene un tamaño de 241 pb.

La digestión con la enzima de restricción Bsr I, define 2 alelos: Alelo 1 (A)= 142, 75 y 24 pb; Alelo 2 (G)= 102, 75, 40 y 24 pb.

3) Posición A318V: C o T en el nucleótido 1029: GCG (Ala) o GTG (Val) en el codón 318 del exón 9.

A318V-1                    5'-TCCTTGATCTTCGTAGTCTC-3'

A318V-2                    5'-GGCTTACAGGACATGAGTAC-3'

El producto de la amplificación tiene un tamaño de 232 pb.

La digestión con la enzima de restricción Ita I define 2 alelos: Alelo 1 (Val)= 232 pb; Alelo 2 (Ala)= 171 y 61 pb.

PCR de las regiones polimórficas del gen *NRAMP1*

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 100  $\mu$ L. A cada muestra de DNA (10  $\mu$ L) se le adicionó la siguiente mezcla de reacción: 10  $\mu$ L de solución amortiguador de reacción 10 X, conteniendo MgCl<sub>2</sub> 15 mM; 10  $\mu$ L de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (0.20 mM de cada uno); 50 picomoles de cada oligonucleótido específico para cada región del gen *NRAMP1*; 2 U de enzima Taq polimerasa y finalmente se llevó a 100  $\mu$ L con

agua estéril. Las condiciones de amplificación que se usaron fueron: 96°C/5 min iniciales; 96°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min, durante 30 ciclos, con una extensión final de 72°C/10 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Thermo HyBaid Express.

### Verificación de la amplificación

Se tomaron 10 µL del producto de cada amplificación y se les añadieron 5 µL de amortiguador de corrida (50% glicerol, 0.05% rojo de cresol). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), durante 50 min a 90 voltios. Los geles se observaron con luz UV (312 nm) y se fotodocumentaron mediante un sistema UVP (UVP, Inc. CA., USA). En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular (de 100 pb a 2000 pb, Roche, Alemania). Las amplificaciones se almacenaron a -20°C hasta su digestión.

### Digestión de los productos de la PCR con endonucleasas de restricción

Las digestiones se realizaron utilizando 15 µL del producto de amplificación de la PCR (equivalente a aproximadamente 500-750 ng), la enzima específica para cada región y la solución amortiguadora correspondiente. En el cuadro 1 se muestran las condiciones específicas de cada reacción, las cuales se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL. Las muestras se incubaron en baño maría, durante 36 a 48 horas, a la temperatura correspondiente.

### Determinación de los alelos del gen *NRAMP1*

Para cada una de las regiones que se amplificaron, los productos de digestión se corrieron en mini geles de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bis-acrilamida 40%, 19:1) utilizando TBE 1X como amortiguador de corrida. La electroforesis se llevó a cabo con 10 µL de la digestión y 2.5 µL de la solución de rojo de cresol. En todos los geles se incluyó 1 carril con marcador de peso molecular (2000 a 100 pb, Roche, Mannheim, Alemania). Los geles se corrieron a 90 volts durante una hora. Posteriormente se tiñeron con BrEt a una concentración de 0.5 µg/mL en 50 mL de H<sub>2</sub>O durante 5 minutos, y las imágenes de los geles fueron digitalizadas en el sistema UVP (UVP, Inc. CA., USA).

Cuadro 1. Condiciones específicas para la digestión de los productos de la PCR de cada región del gen *NRAMP1*.

Polimorfismo y Enzima	274C/T-1 Mnl I	A318V Ita I	1465-85G/A Bsr I
Amortiguador 10 X para cada enzima	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
Espermidina	50 mM	50 mM	50 mM
BSA	2.5 µg	-	-
Enzima	3 U	2.5 U	2.5 U
Temperatura de incubación	37°C	37°C	65°C

BSA=Albúmina Sérica Bovina

#### Análisis estadístico de los alelos del gen *NRAMP1*

Se calcularon las frecuencias alélicas (FA) y genotípicas (FG) por conteo directo, para obtener la proporción de sujetos, que son portadores de un determinado alelo y genotipo. Para probar asociaciones significativas entre los alelos, genotipos y alguna de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, se utilizó la prueba de Chi cuadrada ( $X^2Y$ ) con la corrección de Yates (esta corrección hace la prueba mas estricta y se evita una significancia al azar) con los datos obtenidos del conteo directo. Una vez obtenida la  $X^2Y$ , se buscó la probabilidad (p) con un intervalo de confianza de 95% y un grado de libertad (El valor de alfa o limite de significancia estadística es de  $p<0.05$ ).

$$X^2 Y = \frac{(ad-bc-N/2)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

- a = número de pacientes positivos para el alelo
- b = número de pacientes negativos para el alelo
- c = número de testigos positivos para el alelo
- d = número de testigos negativos para el alelo

Para establecer la asociación de alelos particulares con las formas clínicas de la enfermedad, se calculó la razón de momios (RM). La RM es una estimación de la intensidad de la asociación e indica cuantas veces más riesgo de desarrollar la enfermedad tiene un individuo portador del alelo en cuestión, cuando ésta se encuentra significativamente incrementada en los pacientes, sugiere la presencia de un alelo de susceptibilidad. Se calcula según la fórmula de Haldane (Haldane, 1956).

$$RM = \frac{(2a+1)(2d+1)}{(2b+1)(2c+1)}$$

La fracción etiológica (FE) es una medida relativa que indica cuanto de la asociación se debe al marcador que se encuentra significativamente aumentado. Mientras más se acerca el valor a la unidad, más se debe la enfermedad al marcador. Se calcula como sigue (Haldane, 1956):

$$FE = \left( \frac{RM - 1}{RM} \right) \times \left( \frac{a}{a + b} \right)$$

La fracción preventiva (FP) es también una medida relativa, que indica cuanto de la protección se debe al marcador, en los casos en los que se encuentra un alelo significativamente disminuido y que por lo tanto significa protección. Se calcula como sigue:

$$hp = \frac{a}{a + b}$$

$$FP = \frac{(1 - RM)hp}{RM(1 - hp) + hp}$$

## 8. RESULTADOS

### Amplificaciones de los polimorfismos del gen Nramp1

Todas las muestras de DNA de los pacientes con LCL y LV, así como los testigos correspondientes de cada grupo, se amplificaron con los tres pares de iniciadores. En la figura 8 se observan las bandas obtenidas de algunas de las amplificaciones de la región 274 C/T con un tamaño de 216 pb, lo cual confirma que la amplificación específica de la región se llevó a cabo. En la figura 9 se puede ver el resultado de algunas de las amplificaciones de la región 1465-85 G/A, con un tamaño de 241 pb y de la región A318 V, que amplifica un producto de 232 pb, como se puede apreciar en la figura 10.

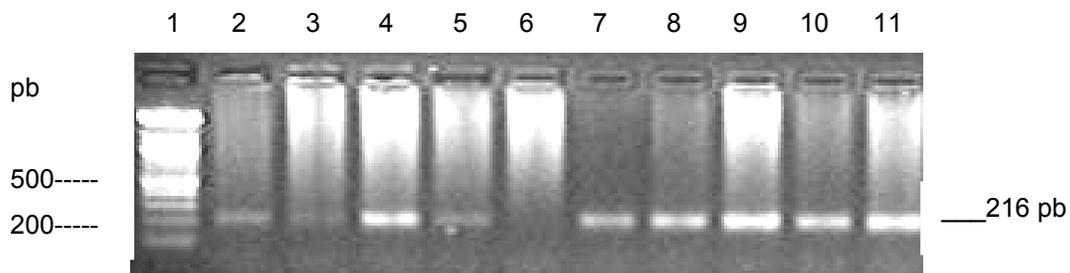


Figura 8. Amplificación de la región 274C/T del gen *NRAMP 1* de muestras de DNA de pacientes en los carriles 2-6 y testigos en los carriles 7-11. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular.

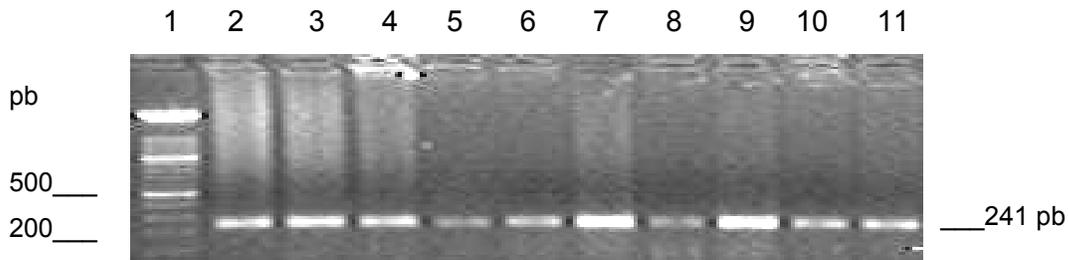


Figura 9. PCR de la región 1465-85G/A del gen *NRAMP 1* de muestras de DNA de pacientes en los carriles 2-6 y testigos en los carriles 7-11. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular.

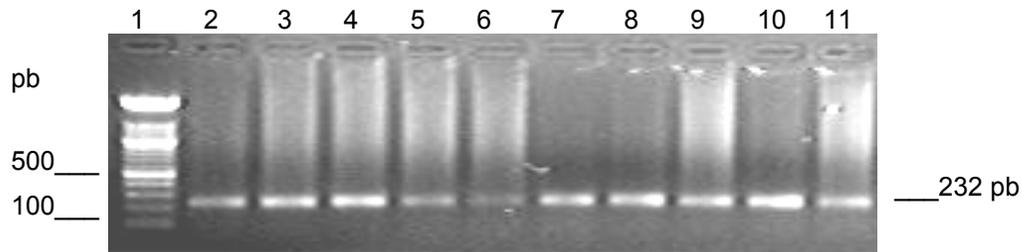


Figura 10. PCR de la región A318V del gen *NRAMP1* de muestras de DNA de pacientes en los carriles 2-6 y testigos en los carriles 7-11. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular.

### Digestiones de los polimorfismos del gen *Nramp1*

Para determinar los alelos de la población, todos los productos de la PCR se digirieron con endonucleasas de restricción específicas (ver cuadro 1) y los productos de la digestión se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

La digestión de los productos de la PCR de la región 274C/T, produce fragmentos de 167, 37 y 12 pb para el alelo 1 (T) y para el alelo 2 (C) fragmentos de 102, 65, 37 y 12 pb, como se puede observar en la figura 11. Para la región 1465-85 G/A, el alelo 1 (A) esta compuesto de tres fragmentos con un tamaño de 142, 75 y 24 pb y el alelo 2 (G) de fragmentos de 102, 75, 40 y 24pb (fig.12). La región A318V tiene 2 alelos, el alelo 1 (Val) es de 232 pb y el alelo 2 (Ala) es de 171 y 61 pb, pero como se ve en la figura 13 el 100% de las muestras fueron alelo 2, por lo cual no se observa ni el alelo 1, ni heterocigotos.

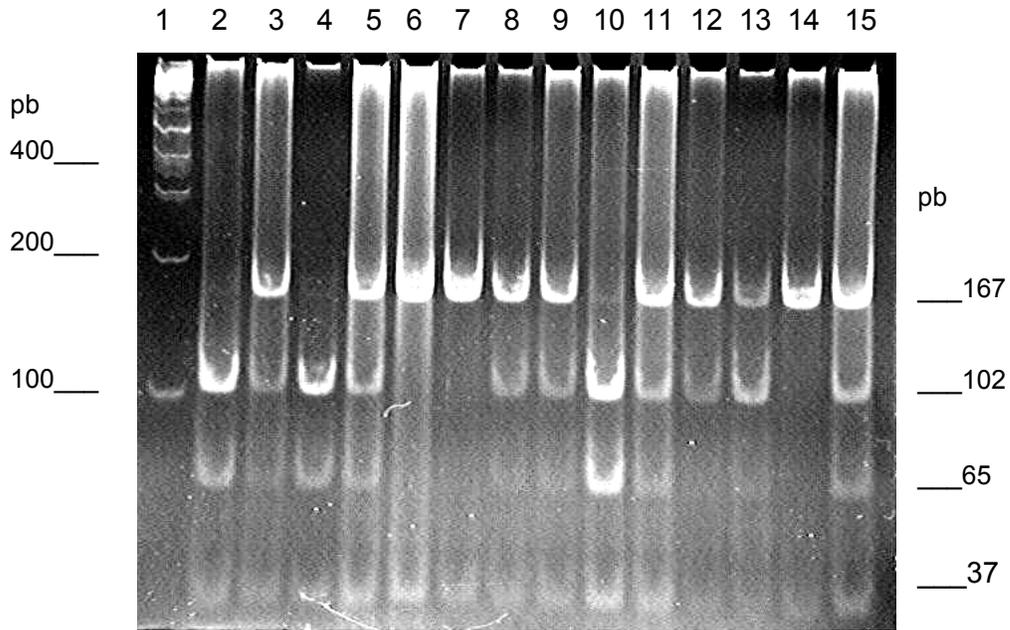


Figura 11. Digestión de los productos de la PCR de la región 274C/T, en los carriles 6, 7 y 14 se observa el alelo 1(167, 37 y 12 pb), en los carriles 2, 4 y 10 el alelo 2 (102, 65, 37 y 12 pb) y en el resto de los carriles los heterocigotos. En los carriles 2-8 se encuentran las muestras de pacientes y en los carriles 9-15 las de testigos y en el primer carril esta el marcador de peso molecular.

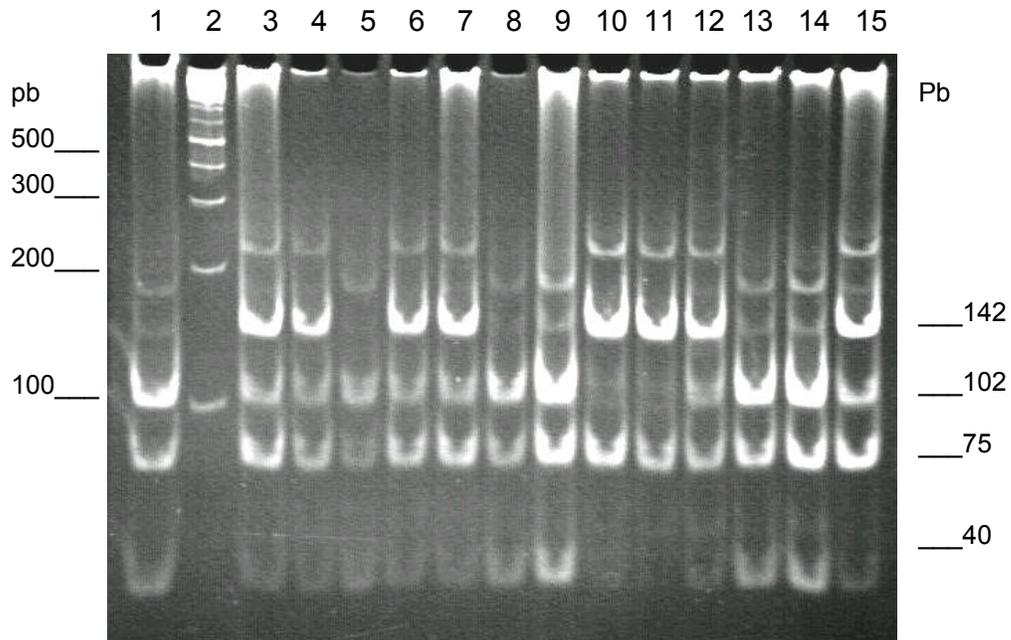


Figura 12. Digestión de los productos de la PCR de la región 1465-85G/A, en los carriles 10 y 11 se observa el alelo 1 (142, 75 y 24 pb), en los carriles 1, 5, 8, 9, 13 y 14 el alelo 2 (102, 75, 40 y 24 pb) y en el 3, 4, 6, 7, 12 y 15 los heterocigotos. En los carriles 2-8 se encuentran las muestras de pacientes y en los carriles 9-15 las de testigos y en el carril 2 esta el marcador de peso molecular.

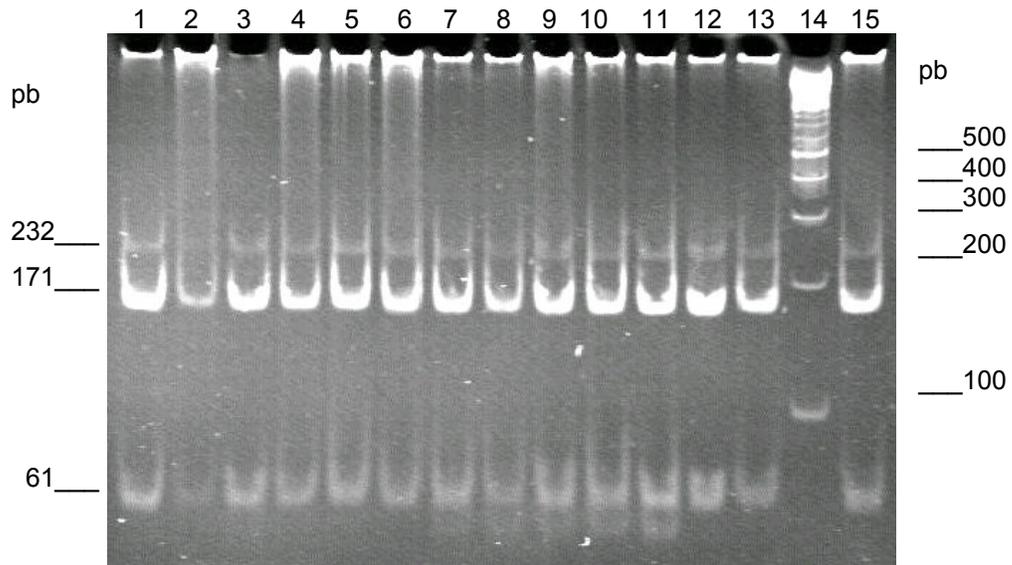


Figura 13. Digestión de los productos de la PCR de la región A318V, donde se observa que todas las muestras correspondieron al alelo 2 (171 y 61 pb). En los carriles 1-7 se encuentran las muestras de pacientes y en los carriles 8-13 y 15 las de testigos y en el carril 14 esta el marcador de peso molecular.

## Genotipos y alelos

Los resultados de los experimentos anteriores permitieron identificar el tipo de genotipo de cada paciente y testigo de LCL y de LV, para cada región polimorfica. A partir de estos datos se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas (cuadros 2-5) correspondientes para cada polimorfismo y para ambos grupos de leishmaniasis (LV y LCL), en las figuras 14-17 se pueden observar los datos graficados.

Cuadro 2. Frecuencia genotípica de los polimorfismos del gen *NRAMP1* de pacientes y testigos con LCL de Pichucalco Chiapas, México.

Genotipo	Pacientes LCL	Testigos
	FG (%) n=78	FG (%) n=127
274- 1/1	28.21	21.26
274- 2/2	39.74	19.69
274- 1/2	32.05	59.06
1465- 1/1	24.36	21.26
1465- 2/2	26.92	25.20
1465- 1/2	48.72	53.54
AV318- 1/1	0.00	0.00
AV318- 2/2	100.0	100.0
AV318- 1/2	0.00	0.00

FG= Frecuencia genotípica

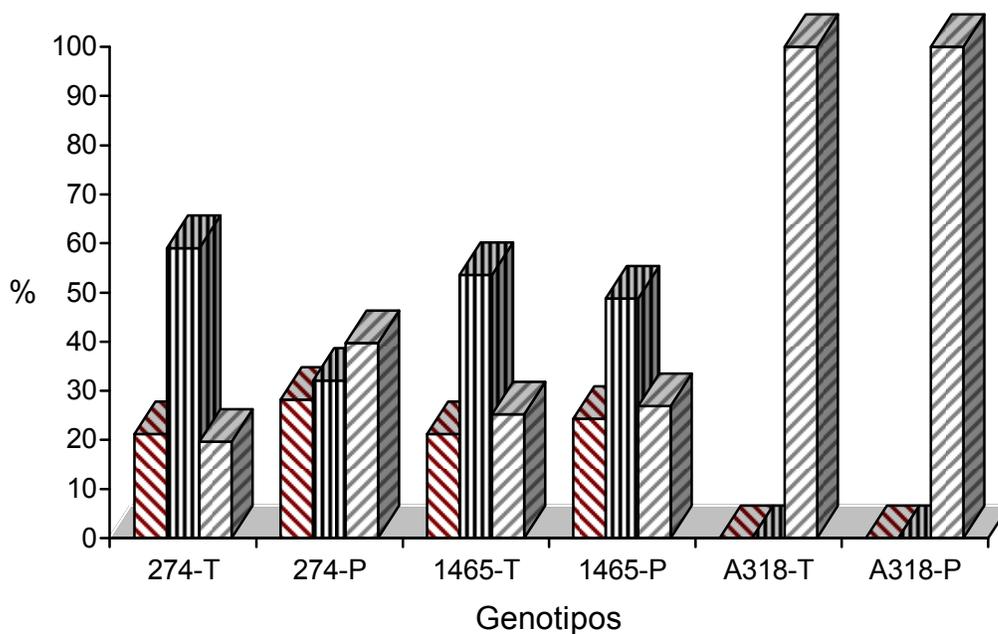


Figura 14. Frecuencia genotípica de testigos (T) y pacientes (P) de LCL de cada polimorfismo del gen *NRAMP1*. Genotipos 1/1 1/2 2/2

Cuadro 3. Frecuencia alélica de los polimorfismos del gen *NRAMP1* de pacientes y testigos con LCL de Pichucalco Chiapas, México.

Alelos	Pacientes LCL	Testigos
	FA (%) n=78	FA (%) n=127
274-1	44.23	50.79
274-2	55.77	49.21
1465-1	48.72	48.03
1465-2	51.28	51.97
A318-1	0.00	0.00
A318-2	100.0	100.0

FA= Frecuencia alélica

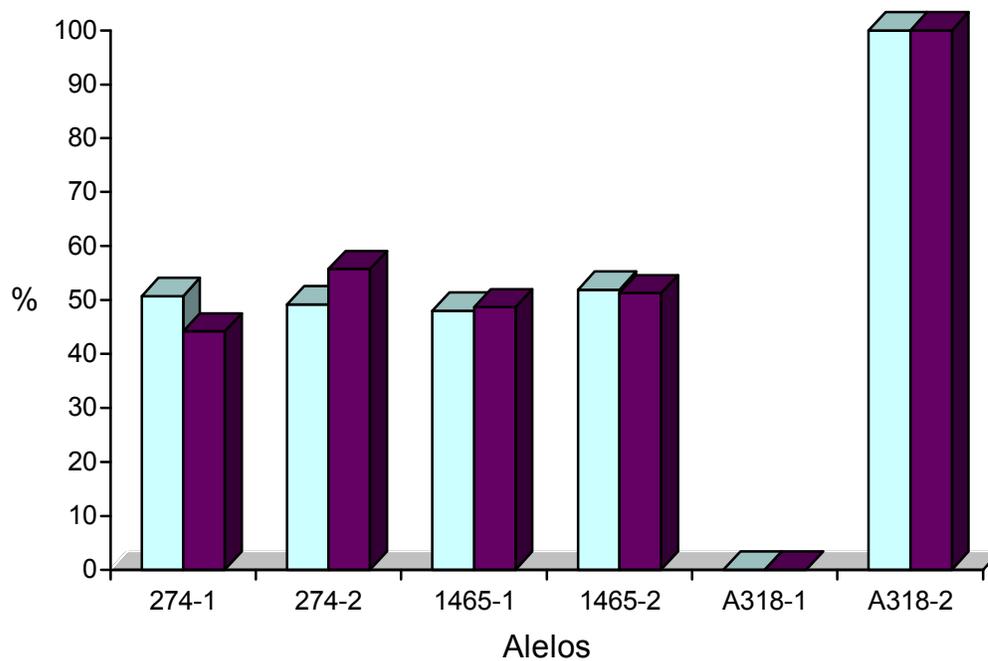


Figura 15. Frecuencia alélica (alelo 1 y 2) de testigos ■ y pacientes ■ de LCL para cada polimorfismo del gen *NRAMP1*.

Cuadro 4. Frecuencia genotípica de los polimorfismos del gen *NRAMP1* de pacientes y testigos con LV de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México.

Genotipo	Pacientes LV	Testigos
	FG (%) n=14	FG (%) n=90
274- 1/1	0.00	22.22
274- 2/2	50.00	37.78
274- 1/2	50.00	40.00
1465- 1/1	0.00	23.33
1465- 2/2	50.00	32.22
1465- 1/2	50.00	44.44
AV318- 1/1	0.00	0.00
AV318- 2/2	100.0	100.0
AV318- 1/2	0.00	0.00

FG= Frecuencia genotípica

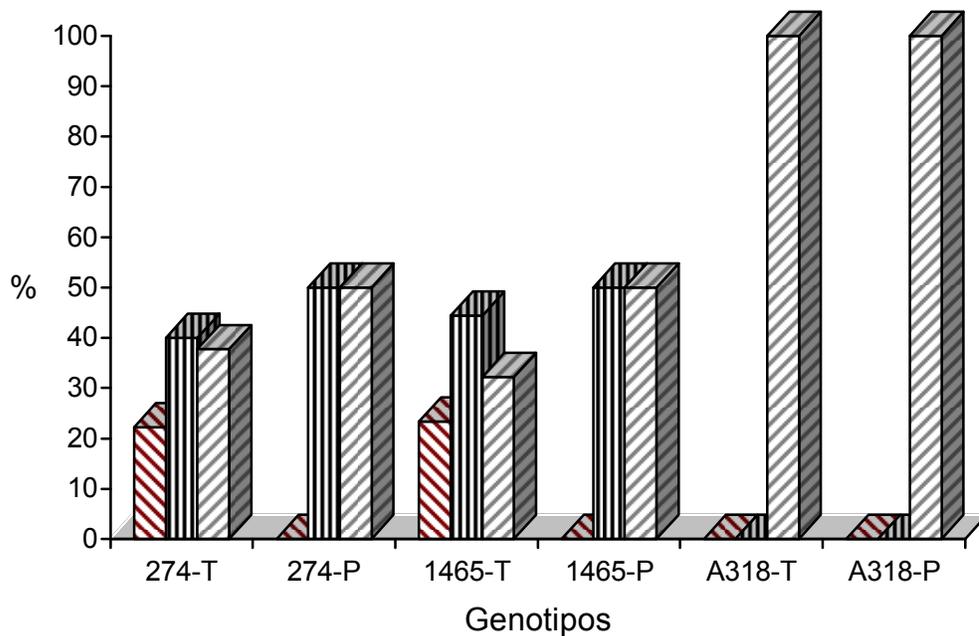


Figura 16. Frecuencia genotípica de testigos (T) y pacientes (P) de LV de cada polimorfismo del gen *NRAMP1*. Genotipos 1/1 1/2 2/2

Cuadro 5. Frecuencia alélica de los polimorfismos del gen *NRAMP1* de pacientes y testigos con LV de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México.

Alelos	Pacientes LV	Testigos
	FA (%) n=14	FA (%) n=90
274-1	25.00	42.22
274-2	75.00	57.78
1465-1	25.00	45.56
1465-2	75.00	54.44
A318-1	0.00	0.00
A318-2	100.0	100.0

FA= Frecuencia alélica

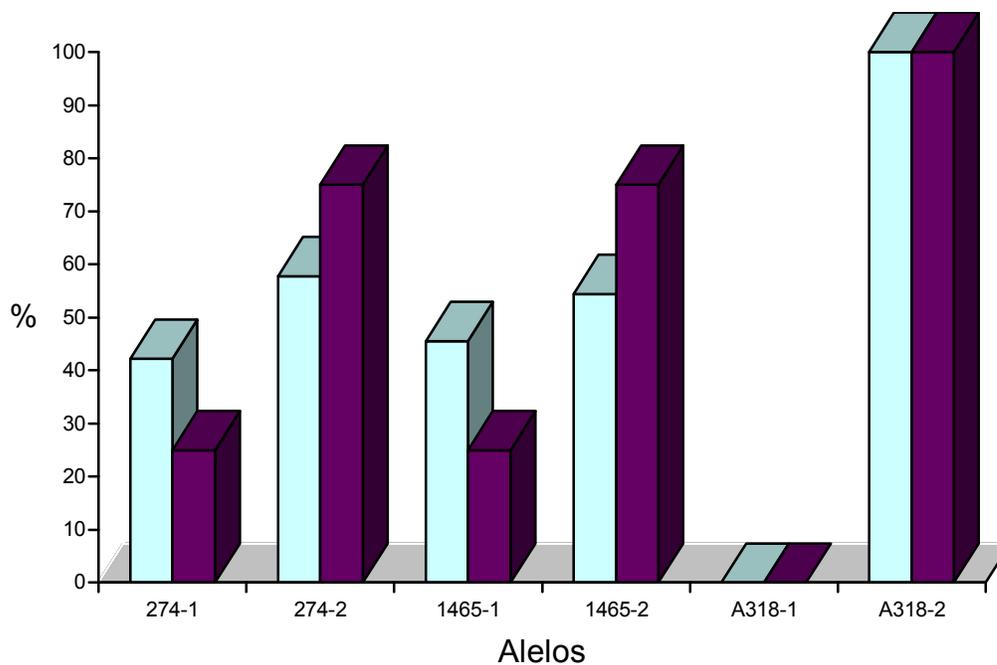


Figura 17. Frecuencia alélica (alelo 1 y 2) de testigos ■ y pacientes ■ de LV para cada polimorfismo del gen *NRAMP1*.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los alelos y genotipos con diferencias significativas se muestra en el cuadro 6. Se encontró que el genotipo 274 2/2 contribuye a la susceptibilidad con una RM = 2.6 y una FE= 24.83%, mientras que el genotipo 274 1/2 y el alelo 274-1 están asociados con protección. También se encontró al alelo 1465-85-1 involucrado en la protección, aunque con una FP menor.

Cuadro 6. Alelos y genotipos del gen NRAMP1 asociados a susceptibilidad y protección en la leishmaniasis.

<b>GENOTIPO</b>	<b>LCL/LV</b>	<b>X<sup>2</sup>Y</b>	<b>p</b>	<b>(95%IC)</b>	<b>RM</b>	<b>FE (%)</b>	<b>FP (%)</b>
274- 1/2	LCL	15.20	0.0001	(0.18-0.60)	0.33		39.26
274- 2/2	LCL	8.80	0.003	(1.42-5.01)	2.67	24.83	
<b>ALELO</b>							
274 -1	LCL	10.82	0.001	(0.20-0.70)	0.38		50.10
1465-85 - 1	LV	5.06	0.02	(0.17-1.03)	0.42		25.94

X<sup>2</sup> Y= X<sup>2</sup> Yates, p= probabilidad, IC= intervalo de confianza, RM= razón de momios, FE= fracción etiológica, FP= fracción preventiva.

## 9. DISCUSIÓN

Las variantes génicas o SNPs heredadas en la secuencia de DNA, contribuyen a la variación fenotípica, influenciando las características antropomórficas individuales, la respuesta al medio ambiente y el riesgo a enfermedades. Con la secuenciación del genoma humano, se ha visto que del 0.1% de variación que separa a un individuo de otro, la mayoría proviene de los SNPs. A través del análisis del genoma humano se han identificado variaciones en genes relacionadas con enfermedades, lo cual ha abierto la posibilidad de identificar las variantes genéticas de diferentes poblaciones humanas, asociar su presencia con fenotipos individuales, incluyendo susceptibilidad a enfermedades y determinar el impacto funcional de la variación. Son pocos los padecimientos en los que la mutación de un sólo gen es suficiente para causar la enfermedad. La mayoría de las enfermedades tienen una arquitectura genética compleja, en la que se involucra más de un gen. La asociación de SNPs con enfermedades tiene un gran potencial para la aplicación clínica directa, al proporcionar más y nuevos marcadores genéticos específicos para su uso en el diagnóstico y como posibles blancos terapéuticos (Suh y Vijg, 2005).

Un ejemplo de lo anterior es el gen *NRAMP1*, en el que se han identificado doce variantes o SNPs, las cuales se han relacionado con varias enfermedades causadas por patógenos intracelulares, entre estas se encuentra la leishmaniasis, una enfermedad tropical de importancia médica, ampliamente distribuida, multifactorial y endémica en varios estados de nuestro país, en la que se han determinado las variantes génicas asociadas. Dada la relación establecida entre el gen y la enfermedad, en este trabajo se evaluó la asociación de los polimorfismos 1465-85G/A, 274C/T y A318V del gen *NRAMP1* con la LCL y con la LV de dos poblaciones endémicas en el Estado de Chiapas, México. Con respecto a la LCL los resultados del análisis estadístico indican que el polimorfismo 274C/T fue significativo, específicamente el genotipo 2/2 se asocia a susceptibilidad ( $X^2Y= 8.8$ ,  $p 0.003$ ) y hay 2.6 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad si un individuo es portador del mismo. Por otro lado, la FE nos indica que este genotipo contribuye en 24.8% con el desarrollo de la LCL.

El alelo 1 del polimorfismo 274C/T se asocia a resistencia en la LCL ( $X^2Y=10.8$ ,  $p 0.001$ ), ya que el 50.1% de la protección se debe a este alelo. El genotipo heterocigoto ( $X^2Y= 15.2$ ,  $p 0.001$ ) también se asocia a resistencia en la enfermedad, este muestra que el 31.3% de la protección se debe al marcador, lo cual puede ser atribuido a la participación del alelo 1.

Con respecto a la LV, sólo se encontró asociación protectora con el alelo 1 del polimorfismo 1465-85G/A ( $X^2Y=5.06$ ,  $p 0.02$ ) que participa con un 25.94% en la protección a la enfermedad; en los genotipos de este polimorfismo no hubo diferencias significativas. En la LCL no se encontró ninguna asociación.

En el polimorfismo A318V no se obtuvo ningún dato significativo, debido a que el 100% de los pacientes y testigos, presentaron el genotipo 2/2 o alelo 2.

El hecho de que en la LV los polimorfismos 274C/T y A318V no tuvieron asociación significativa, podría ser atribuido al tamaño de muestra, ya que solo se obtuvieron 14 pacientes con LV confirmada.

Otro punto a considerar es que, aunque el polimorfismo 274C/T no es una variante funcional, ya que es una mutación silenciosa, pues los codones TTC y TTT codifican para una fenilalanina en la posición 66 y no hay un cambio de aminoácido que altere la estructura y función de la proteína, un polimorfismo cercano podría ser el causante real de la asociación en LCL y producir una alteración en la proteína que se traduzca en disminución de la eficiencia en el transporte de iones y que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con el alelo 2 del polimorfismo 274C/T.

Los estudios de asociación de los polimorfismos del gen *NRAMP1* con leishmaniasis en diferentes poblaciones son relativamente limitados, pero los trabajos realizados en LV en Sudán (Mohamed *et al*, 2004; Blackwell *et al*, 2004), muestran marcadas diferencias en la incidencia de la enfermedad entre aldeas vecinas, habitadas por diferentes grupos étnicos, donde la población Masalit tenía altas tasas de enfermedad clínica fatal si no se trataba y bajas tasas de respuesta positiva a la IDR, mientras que sus vecinos, la tribu Hawsa, tenían bajas tasas de enfermedad clínica y tasas altas de respuesta positiva a la IDR. Estas observaciones sugerían que el genotipo juega un papel importante en la susceptibilidad, ya que ambos grupos estaban expuestos al mismo medio ambiente, pues la tribu Masalit había migrado en los 1980s a su ubicación actual. Cuando analizó el desequilibrio de ligamiento de los distintos polimorfismos, encontró que un haplotipo G<sub>t<sub>n</sub></sub>-274C/T-469+14C/G de la región 5' se segregaba en las familias y además estaba asociado a la LV ( $p=0.01$ ), encontrándose en fuerte desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, los haplotipos D543N-3'UTRTGTG-3'UTRCAA de la región 3' del gen no se encontraban asociados a la LV, ni presentaron desequilibrio de ligamiento. Por otro lado, el

estudio de familias en la población Aringa de Sudán (Bucheton *et al*, 2003) mostró que el marcador  $(CA)_n$  (también denominado  $GT_n$ ) de la región 5' se segrega con la enfermedad. Para tratar de identificar otras variantes funcionales; debido a que la contribución de estos SNPs podría ser sólo un componente de la asociación real, secuenciaron DNA de pacientes de la tribu Masalit (Blackwell *et a.*, 2004). En la figura 18 se muestran los 8 nuevos polimorfismos identificados en esta población, de estas variantes sólo se encontró una que podría ser funcional, el SNP -86G/A. Desafortunadamente, la frecuencia en la variante fue tan baja (0.06), que es poco probable que influya en la susceptibilidad a la enfermedad por si sola, sugiriendo que hay más polimorfismos funcionales hacia la región 5' del gen. Estos resultados abren nuevas posibilidades en la búsqueda de SNPs particulares de cada población y en el análisis de su participación en otras enfermedades. Otra posibilidad que propone Blackwell, es que los polimorfismos podrían estar en desequilibrio de ligamiento con los genes *IL8RA/B* que codifican para los receptores de la interleucina 8 y para otras quimiocinas de la familia CXC, que se encuentran 230 kb río arriba del gen *NRAMP1* o *SLC11A1*, como se muestra en la figura 18.

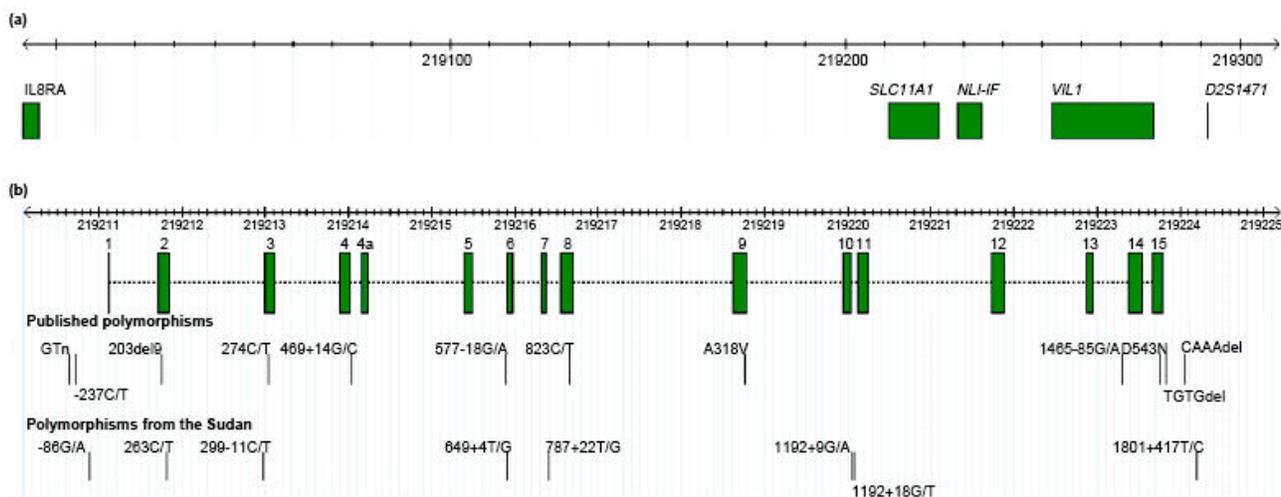


Figura 18. Región del cromosoma humano 2q35, que contiene el gen *NRAMP1* o *SLC11A1*. (a). Ubicación relativa del gen *NRAMP1* y otros genes que se usaron como marcadores. (b). Exones e intrones del gen *NRAMP1*, los polimorfismos descritos previamente y los nuevos polimorfismos encontrados en la tribu Masalit (Blackwell *et al*, 2004).

Sin embargo; aunque las variantes 274C/T no representan repercusiones funcionales en la proteína, los polimorfismos adyacentes descritos (Blackwell *et al*, 2004) podrían tener implicaciones en su estructura, ya que, por ejemplo, el polimorfismo -86G/A se encuentra dentro de un sitio de unión de (NF)- $\kappa$ B y podría ser una variante funcional en la regulación de la expresión génica, la variante -86G/A se encuentra muy cercana a la 274C/T. Los hallazgos anteriores sugieren que uno o varios de los marcadores cercanos al 274C/T podrían ser los

responsables de un cambio en la estructura de la proteína, que puede traducirse en la alteración de su función, por esta razón sería de interés analizar los polimorfismos de la región 5' encontrados hasta el momento: 203del9, -86G/A, 263C/T y 299-11C/T.

Considerando que algunos polimorfismos no son variantes funcionales, se ha visto que dentro de los codones sinónimos algunos son más abundantes que otros y los estudios evolutivos en eucariontes sugieren que las mutaciones sinónimas están bajo una presión de selección débil, al favorecer la eficiencia en la traducción o selección traduccional. También puede surgir selección para la velocidad de elongación, pues los codones tienen diferentes tasas de traducción, así como también para exactitud, ya que algunos codones son menos propicios a traducción errónea (Rocha, 2004; Comeron, 2006). Esta teoría explicaría porque se esta favoreciendo un genotipo o alelo sobre otro en el caso de las variaciones silenciosas, aunque no su asociación a la enfermedad, pero este marcador podría estar en desequilibrio de ligamiento con otras variantes funcionales.

Este trabajo también aporta información referente a la frecuencia alélica, de las regiones polimórficas del gen *NRAMP1* estudiadas en dos poblaciones mexicanas similares, pertenecientes al área norte y centro del Estado de Chiapas. La FA también puede ser útil para comparar similitudes genéticas entre diferentes poblaciones con leishmaniasis o con otras enfermedades intracelulares. En este trabajo se encontró que la frecuencia alélica el alelo 1 del polimorfismo 1465-85G/A de pacientes con LV (0.250) es idéntica a la de los testigos de una población China (0.250, cuadro 8) y también muy similar a la de individuos sanos de poblaciones de Hong Kong y de Canadá para el mismo alelo y marcador (0.31 y 0.30 respectivamente, cuadro 9).

Otras similitudes que se pueden observar son las frecuencias alélicas del alelo 1 del polimorfismo 1465-85G/A de testigos con LV; testigos y pacientes con LCL (0.460-0.487), que coinciden con la de canadienses con tuberculosis (0.500, cuadro 9). En las otras poblaciones estudiadas, la FA del mismo polimorfismo para el alelo 1 varía de 0.11-0.31 (cuadro 9).

Las frecuencias alélicas de la población mexicana estudiada, para el alelo 1 del marcador 274C/T en pacientes con LV (0.25), son muy similares a las de dos poblaciones caucásicas obtenidas por Liu *et al* (1995) y por Yip *et al* (2003; 0.25-0.35, cuadro 8), y a las de una población canadiense con tuberculosis (0.333, cuadro 9); sin embargo en el estudio realizado

por Mohamed *et al* (2004), en una población de Sudán para este mismo alelo y marcador, encontró una frecuencia de 0.20 para el alelo 1 y 0.80 para el alelo 2 y asociación a susceptibilidad a la LV. Aunque en el presente trabajo los datos no fueron significativos, probablemente por el tamaño de muestra, las frecuencias también son similares (LV: alelo1 = 0.25; alelo 2 = 0.75).

Por otra parte las frecuencias alélicas de testigos y pacientes con LCL y testigos con LV para el alelo 1 del polimorfismo 274C/T son muy similares entre si (0.422-0.508 para el alelo 1), pero difieren mucho de las poblaciones estudiadas previamente, las cuales presentan FAs menores para el mismo polimorfismo (0.0-0.35 para el alelo 1) encontrándose los valores extremos en una población de Hong Kong (cuadro 9) y en caucasicos (cuadro 8).

El grado de heterocigocidad encontrado fue de 32.1% para pacientes y 59.1% para testigos en LCL, 50.0% para pacientes y 40.0% para testigos en LV para el polimorfismo 274C/T; 48.7% para pacientes y 53.5% para testigos en LCL, 50.0% para pacientes y 44.4% para testigos en LV para el polimorfismo 1465-85 G/A; 0.0% para pacientes y testigos en LCL y LC para el polimorfismo A318V.

Cuadro 8. Frecuencias alélicas del polimorfismo 274C/T y 1465-85G/A del gen NRAMP1 de individuos sanos de diferentes poblaciones (Yip *et al*, 2003; Liu *et al*, 1995).

Polimorfismo	Alelo 1 (T)	Alelo 2 (C)	Población
274C/T	0.085	0.915	Chinos
274C/T	0.270	0.730	Caucásicos
274C/T	0.120	0.880	Asiáticos
274C/T	0.10 – 0.20	0.90 – 0.80	Africanos y Afroamericanos
274C/T	0.25 – 0.35	0.75 – 0.65	Caucásicos
1465-85G/A	0.250	0.750	Chinos

Cuadro 9. Frecuencias alélicas del polimorfismo 274C/T y 1465-85G/A del gen *NRAMP1* de testigos y pacientes con Tuberculosis, en dos poblaciones (Liu *et al*, 1995).

Polimorfismo	Alelo 1	Alelo 2	Testigos/Pacientes	Población
274C/T	0.0	1.0	Pacientes	Hong Kong
274C/T	0.077	0.923	Testigos	Hong Kong
274C/T	0.333	0.667	Pacientes	Canadienses
274C/T	0.10	0.90	Testigos	Canadienses
1465-85G/A	0.11	0.89	Pacientes	Hong Kong
1465-85G/A	0.31	0.69	Testigos	Hong Kong
1465-85G/A	0.50	0.50	Pacientes	Canadienses
1465-85G/A	0.30	0.70	Testigos	Canadienses

Al observar las frecuencias alélicas de los cuadros anteriores, podemos apreciar las diferencias entre poblaciones de diversos grupos étnicos, por lo cual es importante realizar estudios para determinar el perfil genético de varios marcadores involucrados en susceptibilidad, en un mayor número de poblaciones.

Como podemos ver, el fondo genético de un individuo es importante en la leishmaniasis, en este caso se informa por primera vez que el genotipo 274C/T 2/2 del gen *NRAMP1* se asocia significativamente a susceptibilidad con LCL. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la leishmaniasis es una enfermedad compleja, en la que hasta hoy se reconoce la participación de 5 diferentes regiones cromosómicas, en las que se encuentran el *Sc1*, *Sc2*, MHC, el grupo de citocinas Th2, incluyendo al *NRAMP1*, por lo cual es considerada como una enfermedad poligénica y multifactorial, ya que el riesgo y la susceptibilidad están ligados a diversos genes y factores.

## 10. CONCLUSIONES

- ❖ El genotipo 274C/T 2/2 del gen *NRAMP1* se asocia a susceptibilidad en la LCL ( $X^2Y= 8.8$ ,  $p 0.003$ ), hay 2.6 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad si un individuo es portador de este genotipo y el 24.8% de la asociación a susceptibilidad se debe a este genotipo específico.
  
- ❖ El alelo 274C/T-1 del gen *NRAMP1* se asocia a resistencia en la LCL ( $X^2Y= 10.8$ ,  $p 0.001$ ) y el 50.1% de la protección se debe a este alelo.
  
- ❖ El genotipo 274C/T 1/2 del gen *NRAMP1* ( $X^2Y= 15.2$ ,  $p 0.0001$ ) se asocia a resistencia en la LCL y el 31.3% de la protección se debe al marcador, lo cual puede ser atribuido a la participación del alelo 1.
  
- ❖ El alelo 1465-85G/A-1 del gen *NRAMP1* se asocia a la resistencia en la LV ( $X^2Y = 5.06$ ,  $p 0.02$ ) y 25.94% de la asociación a un fenotipo protector se debe a este alelo.
  
- ❖ Este trabajo aporta información con respecto a la frecuencia de los polimorfismos 274C/T, 1465-85G/A y A318V en dos poblaciones de Chiapas, México.

## 11. GLOSARIO

APC	Células presentadoras de antígenos
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albumina serica bovina
C	Cisteina
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
FA	Frecuencia alélica
FE	Fracción etiológica
FG	Frecuencia genotípica
FP	Fracción preventiva
gp63	Glicoproteína de 63 kDa
H	Histidina
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
IC	Intervalo de confianza
IDR	Intradermorreacción de Montenegro
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL	Interleucina
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INF- $\gamma$	Interferón gamma
INFGRI	Receptor 1 del INF- $\gamma$
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LD	Desequilibrio de ligamiento
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicana
LV	Leishmaniasis visceral
M	Metionina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
ml	Mililitros
mM	Milimolar

NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato
NK	Células asesinas naturales
NO	Oxido nítrico
Nramp1	Proteína natural de resistencia asociada a macrófagos 1
p	Probabilidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteína C cinasa
RM	Razón de momios
ROI's	Intermediarios reactivos de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH3	Dominio de homología Src3
Slc11a1	Transportador de solutos 11a1
SNP	Polimorfismo de un nucleótido
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris-borato EDTA
TE	Tris-HCl EDTA
TEMED	N, N, N, N-tetrametiletilendiamina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
$\mu$ l	Microlitros
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen a volumen
VP	Vacuola parasitófora
$\chi^2$	Chi cuadrada de Yates

## 12. APENDICE

Amortiguador para lisis de células blancas

10mM	Tris-HCl, pH 7.6
50mM	NaCl
10mM	EDTA, pH 8.0
0.2%	SDS
300µg/mL	proteinasas K

Amortiguador para lisis de células rojas

10mM	Tris-HCl, pH 7.6
10mM	NaCl
5mM	MgCl <sub>2</sub>

Fenol Saturado (Bidestilado)

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, porque el DNA puede quedarse dentro de la fase orgánica (fenólica) si el pH es ácido.

1. El fenol bidestilado se debe almacenar a -20° C. Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a 68° (Baño maría). Al fenol líquido se adiciona 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. La 8-hidroxiquinolina es un antioxidante, inhibidor parcial de RNAsa y es quelante débil de iones.
2. Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente, agitar con una barra magnética durante 15 min, permitir que se separen las dos fases, eliminando la fase superior (acuosa).
3. Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1M, pH 8.0. Agitar de igual forma que en el punto 2, remover la fase acuosa.
4. Repetir el paso 3, hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente pH 8.0).
5. Después de que el fenol está en equilibrio, remover la fase acuosa y adicionar 1 volumen de Tris-HCl 0.1M, pH 8.0 conteniendo 0.2% de 2-mercaptoetanol
6. Guardar en un frasco ámbar a 4° C por períodos mayores de 1 mes.

#### Cloroformo/alcohol isoamílico

Tomar 24 partes de cloroformo puro y añadir una parte de alcohol isoamílico, mezclar y guardar a 4°C.

#### Fenol/cloroformo

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar sólo la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar, dejar a 4°C toda la noche. Usar la fase inferior.

#### TE

10mM Tris-HCl, pH 8.0

1mM EDTA, pH 8.0

#### Mezcla de amplificación

10µL DNA

10µL Amortiguador 10 X

2µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

10µL dNTPs (0.20 mM de cada uno)

50pmoles Iniciador 1

50pmoles Iniciador 2

2 U Taq polimerasa

Llevar a un volumen final de 100 µL con agua estéril. Las condiciones de amplificación que se usaron fueron: 96°C/5 min iniciales; 96°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min, durante 30 ciclos, con una extensión final de 72°C/10 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Thermo HyBaid Express.

#### TAE 50X

242gr. Tris base

57.1mL Ácido acético glacial

100mL EDTA 0.5M pH 8.0

Aforar a 1LT con agua

TBE 5X

54gr.	Tris base
27.5gr .	Ácido bórico
20mL	EDTA 0.5M (pH 8.0)

Mini geles de poliacrilamida

2mL	Acrilamida:bis-acrilamida (40%, 19:1)
1.33mL	TBE 5X
9.97mL	Agua
15µL	Persulfato de amonio (25%)
13µL	TEMED

### 13. BIBLIOGRAFIA

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6:392-401.

Bates PA y Ashford RW. 2005. Old World leishmaniasis. En: Topley & Wilson's: Parasitology, Microbiology and microbial infections. (Eds) Cox FEG, Wilson GS y Mahy BWJ. Hodder Arnold. 10ª Ed. Londres, 283-311.

Becker I. 2006. Leishmaniosis. En: Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. (Eds) Flisser A, Pérez-Tamayo R. ETM. México, 394-409.

Bellamy R. 1999. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect* 1:23-27.

Blackwell JM. 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology* 112:S67-S74.

Blackwell JM, Barton CH, White JK, Searle S, Baker AM, Williams H, Shaw MA. 1995. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: Identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med* 1:199-205.

Blackwell JM, Black GF, Peacock CS, Millen EN, Sibthorpe D, Gnananandha D, Shaw JJ, Silveira F. 1997. Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Phylos. Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1331-1345.

Blackwell JM, Goswami T, Carlton A, Evans W, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M. 2001. SLC11A1(formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell Microbiol* 3:773-784.

Blackwell JM, Mohamed HS, Ibrahim ME. 2004. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol* 20:268-274.

Blackwell JM, Searle S, Goswami T, Miller EN. 2000. Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes Infect* 2:317-321.

Bogdan C, Röllinghoff M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28:121-134.

Bucheton B, Abel L, Kheir MM, Mirgani A, El-Safi SH, Chevillard C, Dessein A. 2003. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun* 4:104-109.

Chance ML. 1986. The six diseases of the WHO. Leishmaniasis. *Brit Med J* 283:1245-1247.

Comeron JM. 2006. Weak selection and recent mutational changes influence polymorphic synonymous mutations in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6940-6945.

De la Rosa-López G. 2005. Asociación de los genes de TNF- $\alpha$  con la susceptibilidad a desarrollar enfermedad por *Leishmania spp.* Tesis Maestría. ENCB, IPN, México, DF.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6:230-250.

Gregory DJ, Olivier M. 2005. Subversión of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* 130:S27-S35.

Handman E. 2001. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14:229-243.

Haldane JBS. 1956. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 20:309-311.

Hedrick Philip W. 2000. Genetics of population. 2ª Edición. Jones and Barlett Publishers.

Kuby J. 1997. Immunology. 3ª. Ed. W.H. Freeman and Company.

Lainson R y Shaw JJ. 2005. New World leishmaniasis. En: Topley & Wilson's: Parasitology, Microbiology and microbial infections. (Eds) Cox FEG, Wilson GS y Mahy BWJ. Hodder Arnold. 10<sup>a</sup> Ed. Londres, 313-349.

Liu J, Fujiwara M, Buu NT, Sanchez FO, Cellier M, Paradis AJ, Frappier D, Skamene E, Gros P, Morgan K, Schurr E. 1995. Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance –associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet* 56:845-853.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561-1577.

Mackenzie B, Hediger MA. 2004. SLC11 Family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Eur. J. Physiol.* 447:571-579.

Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, White JK, Cordell HJ, Howson JM, Peacock CS, Khalil EA, El Hassan AM, Blackwell JM. 2004. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet* 12:66-74.

Marquet S, Lepage P, Hudson TJ, Musser JM, Schurr E. 2000. Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP gene region on chromosome region 2q35. *Mamm Genome* 11:755-762.

Olivo-Díaz A, Debaz H, Alaez C, Juárez-Islas V, Pérez-Pérez H, Hobart O, Gorodezky C. 2004. Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol* 65:255-261.

Rocha EPC. 2004. Codon usage bias from tRNA's point of view: Redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization. *Genome Res* 14:2279-2286.

Rogers K A, DeKrey GK, Mbow L, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 209:1-7.

Sacks D, Sher A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3:1041-1047.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409:928-933.

Suh Y, Vijg J. 2005. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat Res* 573:41-53.

Velasco Castrejón O. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos del InDRE. 1994. SSA México. pp. 1-28.

Velasco-Castrejón O. 1987. Las leishmaniasis en México. *Rev Lat Microbiol* 29:119-126.

White JK, Shaw MA, Barton CH, Cerreti DP, Williams H, Mock BA, Carter N, Peacock CS, Blackwell JM. 1994. Genetic and physical mapping of 2q35 in the region of the NRAMP and IL8R genes: Identification of a polymorphic repeat in exon 2 of NRAMP. *Genomics* 24:295-302.

Yamaguchi T y Seiichi I. 1981. *Color Atlas of Clinical Parasitology*. Wolfe Medical Publications. Londres.

Yip SP, Leung KH, Lin CK. 2003. Extent and distribution of linkage disequilibrium around the SLC11A1 locus. *Genes Immun* 4:212-221.