

La transfección del gen de ATPasa (tipo vacuolar) de *Leishmania mexicana* incrementa la virulencia en aislado no virulento de *Leishmania enriettii*

Transfection of the ATPase gene (vacuolar type) from Leishmania mexicana enhances virulence in a non-virulent strain of Leishmania enriettii

Alexis Fernández¹ & Noris Rodríguez^{2*}

RESUMEN

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos, después de la transfección en *Leishmania (L.) enriettii* del gen de ATPasa del tipo vacuolar extraído de *Leishmania (L.) mexicana*. Los promastigotes transfectados fueron evaluados *In vitro*, utilizando líneas de macrófagos e *In vivo*, utilizando dos modelos experimentales (Ratones Balb/c y Hámsteres dorados). El progreso de la infección fue registrado semanalmente por las mediciones realizadas en el sitio de inoculación. Se colectaron muestras de piel, ganglio poplíteo, hígado, bazo, corazón y sangre para realizar el diagnóstico parasitológico; utilizando histopatología y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los grupos inoculados con *L. enriettii* transfectadas presentaron diferencias significativas en el tamaño de la lesión respecto al grupo control sin transfección. La PCR fue positiva en piel y ganglios linfáticos las primeras semanas y posteriormente en bazo, hígado, corazón y sangre, lo cual pone en evidencia la migración de los parásitos a otros órganos. En los grupos control los parásitos fueron detectados solamente en el lugar de inoculación y no en otros tejidos. Los resultados demuestran el papel del gen ATPasa del tipo vacuolar en los procesos de invasión de *Leishmania* a la célula huésped y el incremento de la virulencia de *L. enriettii* después de la transfección del mencionado gen en estos parásitos.

Palabras clave: Virulencia, *Leishmania*, ATPasa vacuolar

SUMMARY

In this study we examined the effect of the transfection of the vacuolar type ATPase gene from Leishmania (L.) mexicana to Leishmania (L.) enriettii. Transfected promastigotes were evaluated in vitro using macrophages and in vivo using two experimental models (Balb/c mice and Golden Hamsters). The progression of the infection was recorded weekly by measurements taken at the inoculation site. Samples of skin, the popliteal ganglion, liver, spleen, heart and blood were taken for parasitological diagnosis: histopathology and the polymerase chain reaction (PCR). The groups inoculated with transfected L. enriettii showed significant differences in the size of the lesions with respect to the control group (without transfection). The PCR analysis showed positive for L. enriettii in the skin and lymph nodes during the first weeks post-infection and subsequently in the spleen, liver and heart, thus suggesting that the parasites migrate between organs. In the control group, parasites were detected in the skin at the inoculation site but not in the other organs tested. The results demonstrate the role the vacuolar ATPase gene plays in the invasion of the host cells by Leishmania, and the increase in the virulence of L. enriettii after transfection with this gene

Key words: Virulence, *Leishmania*, vacuolar ATPase.

INTRDUCCIÓN

La leishmaniasis es causada por diferentes especies de protozoarios pertenecientes al género *Leishmania* (Matlashewski, 2001; WHO, 2014). En el humano estos parásitos generan un amplio espectro

de manifestaciones clínicas, las cuales se han asociado tanto a la especie de *Leishmania* que causa la infección, como a la respuesta inmunológica del hospedero vertebrado (Convit & Pinardi, 1972; Convit & Pinardi, 1974; Rondón, 1993). En Venezuela, ésta enfermedad está ampliamente distribuida en todos

¹ Laboratorio de Ingeniería Genética, Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina, Ministerio del Poder Popular para la Salud. San Nicolás a Providencia, San José, Caracas. Venezuela.

² Laboratorio de Ingeniería Genética, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. San Nicolás a Providencia, San José, Caracas. Venezuela.

*Autor de correspondencia: nmrodric@gmail.com

los estados, siendo el Estado Nueva Esparta una zona endémica para la forma visceral de la enfermedad, y no se reportan casos de leishmaniasis cutánea (LC) (Zerpa, 2002). En nuestro país la LC esta asociada a dos especies del parásito, siendo la mas predominante *L. braziliensis* con respecto a *L. mexicana* (Rodríguez *et al.*, 2001). En general, *Leishmania* tiene un espectro que va de poco virulento a muy virulento. La virulencia está definida como el grado de patogenicidad de un microorganismo lo cual se refleja en el espectro de signos y síntomas clínicos observados en las enfermedades humanas (Chang, 1990; Chang & Mc Gwire, 2002). La virulencia en *Leishmania* puede estar modulada por factores ambientales y genéticos, además de sus hospedadores mamíferos (Blackwell, 1996) y de los insectos vectores (Titus & Ribeiro, 1998). En *Leishmania* muchos investigadores definen “genes de virulencia”, como aquellos importantes en la supervivencia y/o patogenicidad del parásito dentro del insecto vector o en el hospedador mamífero pero que no afectan el crecimiento de los parásitos en medios de cultivo (Beverly, 2002). Es evidente que *Leishmania* posee moléculas relacionadas con la infección (determinantes invasivos/evasivos), los cuales permiten el establecimiento de los parásitos intracelularmente, en los fagolisosomas o vacuolas parasitófagas del macrófago (Chang & Dwyer, 1976). Estos determinantes en su mayoría están incluidos en la literatura como “factores de virulencia”. Todas estas moléculas al parecer juegan un papel importante en la infección de los macrófagos por *Leishmania*, dentro de las cuales se pueden citar: Lipofosfoglicanos, Cistein proteasas, Glicosil fosfatidilinositol, Glicosilfosfolípidos, Fosfoglicanos, Proteofosfoglicanos, Glicoproteínas, Histonas y ATPasas (Guy & Belosevic, 1993; Spath *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2002; Spath *et al.*, 2003; Mottram *et al.*, 2004). Todas ellas ayudan a *Leishmania* a establecerse exitosamente en el interior del macrófago, de esta manera la respuesta al proceso mediante el cual, el parásito *Leishmania* produce la leishmaniasis es compleja y en ella están involucrados múltiples factores asociados con el parásito y la célula huésped (Rodríguez, 2003). En los últimos años, con los grandes avances en biología molecular, en especial la tecnología de ADN recombinante y transfección genética se ha podido demostrar la participación de otros genes en los procesos de virulencia en *Leishmania*, como son los genes que codifican para la proteína fosfomanosa isomerasa (Garami e Ilg, 2001), disulfito isomerasa

(Ben Achour *et al.*, 2002) y los genes relacionados con Ca²⁺ATPasa (Lu *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002). El Ca²⁺ es de suma importancia en los procesos de invasión de los parásitos intracelulares, y su concentración citosólica es dependiente de transportadores como lo son las Ca²⁺ATPasas existentes en la membrana plasmática, retículo endoplasmático y acidocalcisomas (Carafoli & Brini, 2000; Moreno & Docampo, 2003). La participación de la Ca²⁺ATPasa del retículo endoplasmático en los procesos de virulencia fue puesta en evidencia, luego de la transfección del gen *Lmaal* en cepas de *L. mexicana* y *L. braziliensis*, observándose un incremento de la virulencia en los parásitos relacionados directamente con una sobre expresión de esta proteína. Los estudios apuntan hacia la búsqueda de diferencias entre las Ca²⁺ATPasas en diferentes especies de la familia Trypanosomatidae, con respecto a la estructura homóloga de mamíferos, con el objeto de establecer diferencias relevantes desde el punto de vista terapéutico, en el desarrollo de drogas contra las enfermedades causadas por estos parásitos (Benaim, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de secuencias y transfección genética

Se diseñaron secuencias iniciadoras (“primers”) a partir de secuencias específicas para ATPasas del tipo vacuolar reportadas en el banco de genes (XM_001682262.1). V1 (5′-TCCAATTTCCGCCGAGAG-3′) y V2 (5′-CATCAAGGCTGAGACGAG A-3′). La RT-PCR se realizó con los “primers” diseñados y se utilizó como blanco ARN de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21). Se seleccionó el producto de mayor homología al ser hibridado con la sonda *LmaVac* (Fernández & Rodríguez, 2005). El ADN de interés fue enviado al Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CESAAN) en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

La secuencia seleccionada fue clonada en el vector P2.2 NEO el cual confiere resistencia al aminoglucósido geniticina G418 (Promega) y transfectada por electroporación (Gene pulser II, Biorad) en promastigotes de *Leishmania (L) enriettii* (MCAV/BR/45/L88).

Ensayos In vitro

Se infectaron macrófagos de la línea J774-G8 en una relación de 1:10 con promastigotes transfectados (LeT) y sin transfectar (Le). Se evaluó el proceso de unión de los parásitos a los macrófagos a diferentes tiempos, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 horas. Para la observación al microscopio, las células fueron fijadas y teñidas con el reactivo de Giemsa. Se contaron 15 campos en cada experimento por cuadruplicado.

Ensayos en animales experimentales

Previa aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina, se procedió a los estudios en animales experimentales en el Bioterio del Instituto. Se utilizaron 80 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad y 40 hámsteres dorados hembras. Los ratones se dividieron en 8 grupos de 10 ratones cada grupo. 4 grupos de ratones fueron inoculados en la almohadilla plantar con 1×10^6 promastigotes transfectados (LeT) y 4 grupos fueron inoculados con 1×10^6 promastigotes no transfectados (Le). El tamaño de la lesión se determinó semanalmente solamente en el modelo murino, se utilizó como control de la infección la pata colateral no infectada. Los hámsteres fueron divididos en cuatro grupos. Dos grupos fueron inoculados en la almohadilla plantar con 1×10^6 LeT y dos grupos con 1×10^6 Le. No se tomaron medidas del tamaño de lesión en estos grupos experimentales, ya que este modelo fue utilizado sólo para evaluar la presencia de parásitos en distintos

órganos. Después de la infección se sacrificaron semanalmente hasta la decima semana, 4 ratones y 2 hámsteres de cada grupo y se tomaron muestras para histopatología, cultivo en medios artificiales y PCR para el diagnóstico parasitológico, utilizando primers universales para la detección de *Leishmania* sp 13A (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3') y 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCAAGTT-3') (Rodgers *et al.*, 1990)

Consideraciones éticas

Los animales experimentales fueron tratados bajo las normas y principios de la guía internacional para la investigación biomédica que involucra animales (Bankowski Z. & Howard-Jones N., 1986); así mismo se solicitó la correspondiente autorización del Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina.

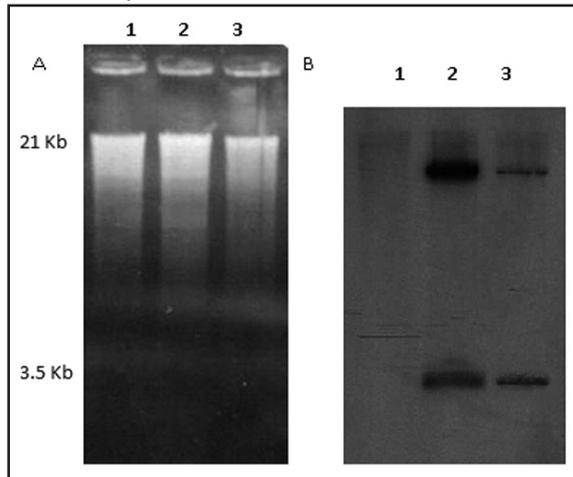
RESULTADOS

El análisis de la secuencia seleccionada presentó 95% de homología con ATPasa vacuolar del tipo P de *Leishmania mexicana* (Fig. 1). Así mismo se pudo comprobar la eficiencia del método utilizado para la transfección del gen a los parásitos. La presencia del gen fue evidenciada mediante la hibridación de los productos de digestión del ADN genómico obtenido de los promastigotes transfectados con la enzima BamHI, utilizando la sonda LmaVac32P (Fig. 2A). En la Fig. 2B se observa la alta homología entre la sonda utilizada y un fragmento de 3,5 Kb que

Fig. 1. Análisis comparativo de la secuencia obtenida, con las secuencias depositadas en el banco de genes, la secuencia con mayor homología se denomina GXM_003873873.1, que corresponde a una ATPasa vacuolar del tipo P.

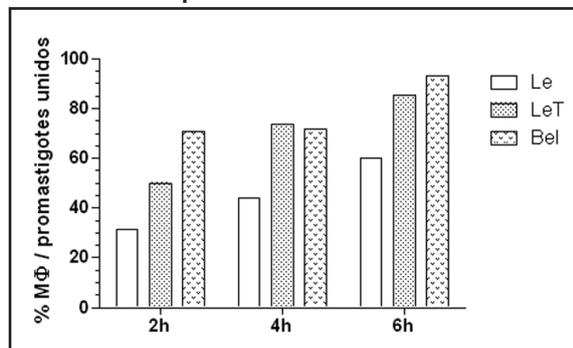
Query	1	TACGGCGTGGCTTATGTGGTGCCCCGCAAGCCGTCCAATTTGCGCGGAGAGGATGAGAAN	60
Sbjct	1258	TACGGTGTGGCTTATGTGGTGCCCCGCAAGCCGTCCAATTTGCGCGGAGAGGATGAGAAG	1317
Query	61	GTGGGAAGGGGGACA-TGGCCCCAGGGTCAACCACTGCTGCAGACGTCCACNCCCATGAAC	119
Sbjct	1318	GTGGGAAGCGGGACACTGGCCCCACGGTCAACCACTGCTGCAGACGTCCACGCCCATGAAC	1377
Query	120	GCGTCTGCAGTTCTCGGCGGCGCGCAGGCCGCCCGTGTGCGCGGGCTTCTCGTGGAGTGC	179
Sbjct	1378	GTGTCTGCGGTTCTCGGCGGCGCGCAGGCCGCCCGTGTGCGCGGGCTTCTCGTGGAGTGC	1437
Query	180	ATCGCTATGAACACCAAGGCTACCTGGGTCCGGGTGGAGTCCCTCAACGCNAANCAGTCN	239
Sbjct	1438	ATCGCTATGAACACCAAGGCTACCTGGGTCCGGGTGGAGTCCCTCAACGCNAAGCAGTCG	1497
Query	240	ACNGTGAGGCTCACTGGTACCAAAACGGA	268
Sbjct	1498	ACGGTGAGGCTCACTGGTAGCAAAACGGA	1526

Fig. 2A. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de ADN total con BamH1. 2B. Hibridación con la sonda Lmavac32P. 1.- *Leishmania enriettii* (MCAB/BR/45/L88) sin transfectar; 2.- *Leishmania (L.) mexicana* (MHOM/BZ/82/Bel21); 3.- *Leishmania enriettii* (MCAB/BR/45/L88) Transfectada.



está presente en la cepa de referencia (Bel 21) carril 1 y también se observa en la cepa transfectada (LeT) en el carril 2. Adicionalmente se observó una alta homología al hibridar el ARN mensajero con la sonda Lmavac32P con un transcripto de aproximadamente 1,2 Kb (resultado no mostrado). Al evaluar la función biológica del gen transfectado *in vitro*, se pudo observar, después de dos horas de interacción de los parásitos transfectados (LeT) con los macrófagos J774-G8; un mayor número de promastigotes unidos a la célula, con respecto al grupo inoculado con promastigotes no transfectados (Le). A las cuatro horas el grupo LeT presentó un 73,3% de unión a los macrófagos con respecto a 43,9% del grupo

Fig. 3. Porcentaje de macrófagos con promastigotes unidos a la membrana, contados a diferentes tiempos.



Le. Después de seis horas de infección se observan parásitos del grupo LeT ya fagocitados por las células, mientras en el grupo infectado con Le, no se observaron parásitos dentro de los macrófagos. Se pudo evidenciar que los parásitos transfectados incrementaron significativamente su capacidad de unión al macrófago con respecto al grupo infectado con parásitos no transfectados (Fig. 3).

Estos resultados fueron corroborados con lo obtenido en los experimentos *in vivo*, con ratones Balb/c, donde se observó un mayor tamaño en la lesión en el grupo de ratones inoculados con LeT con respecto al grupo inoculado con Le, en el cual no se observaron lesiones en ninguno de los animales inoculados. Las medidas obtenidas fueron analizadas para determinar la significancia estadística utilizando un análisis de varianza para medidas repetidas. El grupo LeT presentó diferencias significativas con respecto al grupo Le, siendo las lesiones producidas por LeT 10 veces mayor, 3 mm en promedio, en relación con Le, donde el promedio de las lesiones fue de 0.3 mm ($P \leq 0.05$) (Fig. 4).

Se evidenció por PCR la presencia de parásitos en otros órganos a partir de la cuarta semana post infección, tal como se muestra en la Tabla I, la cual representa los resultados obtenidos para el modelo murino y de hámsteres. En la misma se observa que a partir de la primera, la PCR resulta positiva en la piel (sitio de inoculación) de ambos modelos, sin embargo en ganglio fue evidente la presencia del parásito a partir de la cuarta semana

Fig. 4. Medidas semanales expresadas en milímetros del tamaño de la lesión en ratones Balb/c luego de la infección experimental con *L. enriettii* no Transfectada (□), *L. enriettii* Transfectada (▨) y *L. mexicana* (○).

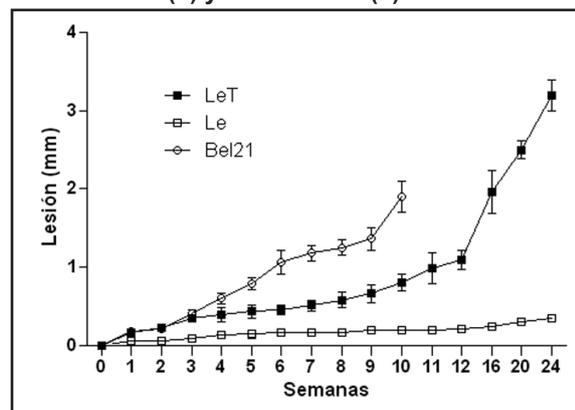
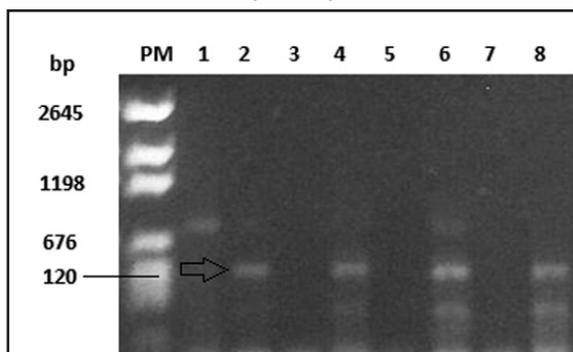


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de PCR obtenidos después de 35 ciclos de amplificación, donde se observa la banda diagnóstica de 120 pb para *Leishmania* sp en muestras de distintos órganos: Líneas 1-5.- Muestras de órganos extraídos de ratones infectados con *L. enriettii* Transfectada; línea 6.- *L. enriettii* Transfectada; línea 7.- Control negativo; línea 8.- *L. mexicana* (Bel 21).



en ratones, donde también la PCR fue positiva para otros órganos como bazo e hígado a partir de la sexta semana, sin embargo para los hámsteres la presencia de los parásitos en los órganos mencionados, fue evidente a partir de la octava semana y en ganglios a partir de la quinta semana post inoculación. En la Fig. 5 podemos observar el producto amplificado de 120 pb que evidencia la presencia de ADN de *Leishmania* en muestras de bazo (línea 2) y ganglio (línea 4). La

PCR no detectó parásitos en corazón (línea 3) ni en hígado (línea 5), tomadas en la cuarta semana. Sin embargo los estudios histopatológicos realizados a las 16 semanas post infección, demostraron la presencia de parásitos en las biopsias tomadas a los grupos infectados con LeT tanto en el modelo murino como en el modelo de hámster, observándose amastigotes en biopsias de hígado, bazo, corazón y piel (resultado no mostrado). En los grupos infectados con Le no se observaron parásitos en órganos como ganglio, bazo, hígado o corazón; solo se observó la presencia de leishmanias en el sitio de inoculación.

DISCUSIÓN

La utilización de métodos moleculares ha permitido el análisis funcional de las secuencias de interés en los parásitos protozoarios como *Leishmania* spp, de esta manera se han podido realizar estudios de genes en cuanto a su expresión y función dentro del parásito, así mismo se han podido identificar genes esenciales para la supervivencia, mecanismos de resistencia a drogas y de virulencia, producción de proteínas foráneas, identificación y expresión de antígenos de superficie entre otros (Cortazar & Walker, 2004). En este estudio se utilizó una cepa de *L. enriettii* de referencia internacional la cual es considerada de baja virulencia para mamíferos (Machado *et al.*, 1994; Laiso, 1997), para transfectar

Tabla I. Resultados de la PCR realizada con ADN total extraído de diferentes órganos de ratones y hámsteres infectados experimentalmente con LeT, utilizando primers universales para el género *Leishmania*. PCR positiva en órganos de ratones (†). PCR positiva en hámsteres (‡). PCR negativa (-).

	Semanas (post infección LeT)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PIEL	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡
GANGLIO	-	-	-	†	†	†	†	†	†	†
	-	-	-	-	‡	‡	‡	‡	‡	‡
BAZO	-	-	-	-	-	†	†	†	†	†
	-	-	-	-	-	-	-	‡	‡	‡
HIGADO	-	-	-	-	-	-	†	†	†	†
	-	-	-	-	-	-	-	‡	‡	‡
CORAZON	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
† RATONES	‡ HAMSTERES									

un gen de ATPasa vacuolar aislado de *L. mexicana* (Bel 21), para luego evaluar la función biológica de dicho gen. Los resultados muestran que *L. enriettii* transfectada es mucho más virulenta en ratones y hámsteres, generando nódulos visibles, dos semanas después de la infección experimental y desarrollando grandes nódulos a partir de la quinta semana, pero sin observarse necrosis de los mismos, lo cual sí ocurre en el caso de ratones inoculados con *L. (L) mexicana* (cepa BEL21). Esto nos sugiere que este gen podría estar modulando la respuesta de otros factores de virulencia, lo cual podría inducir este drástico cambio en la virulencia de los parásitos. Además se pudo observar un inusual tropismo de los parásitos transfectados a diferentes órganos (hígado, bazo) de los animales experimentales, esto fortalece la teoría de la participación de las ATPasas en el proceso de infección, tal como ocurre con el gen A2, el cual es considerado un factor de virulencia que juega un papel importante en la visceralización de *L. donovani* (McCall & Matlashewski, 2010). El papel del gen A2 se pudo demostrar al transfectar parásitos no patogénicos a mamíferos como lo es *L. tarentolae*, observándose que se establece la infección en hígado y bazo de ratones BALB/c inoculados en la vena caudal (Mizbani *et al.*, 2011). La infección por *Leishmania* depende de diferentes moléculas, las cuales se encuentran en la superficie del parásito o son secretadas, estas actúan como determinantes invasivos/evasivos y son expuestas al sistema inmunológico del hospedador (Chang & McGwire, 2002) además de moléculas citoplasmáticas altamente conservadas las cuales son esenciales para la supervivencia del parásito y mantenimiento de la infección (Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003), estas moléculas son denominadas “patoantígenos” (Probst *et al.*, 2001). De esta manera podríamos considerar que *L. enriettii* presenta una deficiencia en este tipo de moléculas y por esta razón no se establece la infección en el ratón y podríamos considerar que las ATPasas del tipo vacuolar representan factores “patoantigénicos” que estarían coadyuvando para incrementar la virulencia en *Leishmania*, ya que al incrementar el número de copias de este gen en el parásito transfectado, se incrementa su virulencia; mientras que en los grupos controles no se observó desarrollo de infección ni visceralización en el tiempo de experimentación. El mismo comportamiento ha sido reportado por otros autores en otra especie de *Leishmania* no patogénica como *L. tarentolae* (Breton *et al.*, 2005). De igual manera Marchesini &

Docampo en 2002, han demostrado que las protón ATPasas de *L. mexicana* regulan el pH intracelular durante la infección, permitiendo la supervivencia de los amastigotes y favoreciendo de esta manera la patogénesis. En otros organismos como *Candida albicans* también se ha demostrado la participación de las ATPasas del tipo vacuolar en la virulencia, al producir también cambios en el pH intracelular (Hayek *et al.*, 2014). En el caso de *L. enriettii*, experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio no evidencian cambios en el pH intracelular. Sin embargo, la expresión de la proteína codificada por el gen LmaVac, podría estar relacionada a la virulencia expresada en *L. enriettii* transfectada; tal como ha sido previamente demostrado en nuestro laboratorio (Fernández & Rodríguez, 2011; Fernández & Rodríguez, 2012), Nuestro trabajo demuestra el importante papel del gen ATPasa del tipo vacuolar en los procesos de invasión de *Leishmania* a la célula hospedadora, observándose una mayor unión de la cepa transfectada al macrófago. Es posible que esta proteína sea el ligando de algún receptor en la célula y así se facilite la adhesión y fagocitosis, que son los pasos iniciales para la infección por *Leishmania*. Algunas evidencias también indican que las ATPasas podrían estar involucradas en la virulencia, debido a la acción que éstas ejercen sobre otros blancos como las proteasas de cisteína, las cuales están involucradas en estos procesos (Mottram *et al.*, 2004). Es de suma importancia determinar cuales son los factores que están involucrados en los cambios del tropismo de los parásitos transfectados, ya que la *L. enriettii* no transfectada no visceraliza; este proceso también podría estar relacionado con la inhibición del proceso de necrosis, que comúnmente se observa en las lesiones en los ratones inoculados con especies virulentas, tal como ocurre en el grupo control inoculado con *L. mexicana* (Bel21), pero que no se observa en los ratones inoculados con la cepa transfectada.

La investigación continúa con el objetivo de determinar las bases genéticas, proteómicas e inmunológicas del fenómeno observado.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Marta Torrealba por su ayuda con el lavado y esterilización del material de laboratorio para la realización de los experimentos; al personal del Bioterio del Instituto de Biomedicina por su ayuda en el manejo y cuidado de los animales experimentales y al Centro de Secuenciación del IVIC por su colaboración para la secuenciación.

REFERENCIAS

- Bankowski Z. & Howard-Jones N. (1986). *International guiding principles for biomedical research involving animals*. CIOMS/WHO. Geneva, Switzerland.
- Ben Achour Y., Chenik M., Louzir H., & Dellagi K. (2002). Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infect. Immun.* **70**: 3576-3585.
- Benaim G. (2004). La Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores. *Acta Cientif. Venezol.* **55**: 304-314.
- Beverly S. (2002). Genetic and genomic approaches to the analysis of *Leishmania* virulence. En: *Molecular Medical Parasitology*. Marr, J., Nilsen, T. & Komuniecki, R. Eds. San Diego, California, USA.
- Blackwell J. M. (1996). Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitol.* **112**: S67-S74.
- Breton M., Tremblay M. J., Ouellette M & Papadopoulou B. (2005). Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* **73**: 6372-6382.
- Carafoli E & Brini M. (2000). Calcium pumps: Structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 152-161.
- Chang K. P., Akman L. & Nilsen J. S. (1999). *Leishmania* virulence y genetic heterogeneity. *Clin. Dermatol.* **17**: 269-273.
- Chang K. P., Chaudhuri G & Fong D. (1990). Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 499-529.
- Chang K. P. & Dwyer D. M. (1976). Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamsters macrophages in vitro. *Science.* **193**: 678-680.
- Chang K. P. & Mc Gwire B. S. (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **1**: 1-7.
- Chang K. P., Reed S. G., Mc Gwire B. S. & Soong L. (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica.* **85**: 375-380.
- Convit J. & Pinardi M. E. (1972). Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect to the host. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**: 603-610.
- Convit J. & Pinardi M. E. (1974). Cutaneous leishmaniasis: The clinical and immunological spectrum in South America. In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chaga's Disease*. Ciba Foundation Symposium N° 20 (new series). Amsterdam, Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland. pp. 159-169.
- Cortazar T. M. & Walker J. (2004). Manipulación genética y el estudio del parásito protozoario *Leishmania*. *Biomédica.* **24**: 438-455.
- Fernández A. & Rodríguez N. (2005). Molecular cloning and expression of a CaATPase (vacuolar type) from *Leishmania mexicana*. Proceedings of the XI European Multicoloquium of Parasitology. Monduzzi Editore. Italy. 98-102.
- Fernández A. & Rodríguez N. (2011). El gen de la ATPasa Vacuolar de *Leishmania amazonensis* induce cambios en la virulencia de *Leishmania enriettii*. XX Congreso Latinoamericano de Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Colombia.
- Fernández A. & Rodríguez N. (2012). Expresión de la proteína codificada por el gen Ca²⁺-ATPasa (Tipo Vacuolar) de *L. mexicana*. I Congreso Venezolano

- de Ciencia Tecnología e Innovación. Caracas, Venezuela.
- Garami A. & Ilg T. (2001). The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugate synthesis and virulence, *J. Biol. Chem.* **276**: 6566-6575.
- Guy R. A & Belosevic, M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect. Immun.* **61**: 1553-1558.
- Hayek S., Lee S. & Parra K. (2014). Advances in targeting the vacuolar proton-translocating ATPase (V-ATPase) for anti-fungal therapy. *Front. Pharma.* **5**: 1-8.
- Laiso R. (1997). On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 377-387.
- Lu H. G., Zhong L., Chang K. P. & Docampo R. (1997). Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **272**: 9464-9473.
- Machado M. I., Milder R. V., Pacheco R. S., Silva M. & Braga R. (1994). Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from Sao Paulo. *Parasitol.* **109**: 135-138.
- Marchesini N. & Docampo R. A. (2002). Plasma membrane P-type H⁺-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**: 225-236.
- Matlashewski G. (2001). *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol.* **190**: 37-42.
- McCall L. & Matlashewski G. (2010). Localization and induction of A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Mol. Microbiol.* **77**: 518-530.
- Mizbani A., Taslimi Y., Zahedifard F., Tahewri T. & Rafati S. (2011). Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. *Parasitol. Res.* **109**: 793-799.
- Moreno S. N. & Docampo R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 359-364.
- Mottram J., Coombs G. & Alexander J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 375-381.
- Probst P., Stromberg E., Ghalib H. W., Mozel M., Badaro R., Reed S. G. & Webb J. R. (2001). Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J. Immunol.* **166**: 498-505.
- Rodgers M. R., Popper S. J. & Wirth D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* **71**: 267-275.
- Rondón A. J. (1993). Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Clín. Dermatol. Venez.* **31**: 12-17.
- Rodríguez N. (2003). Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis. *Dermatol. Venezol.* **41**: 3-9.
- Rodríguez N., Cardona M., Zerpa O., Barrios M., Sosa A. & Fernández A. (2001). Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania* spp en áreas endémicas de Venezuela. *Bol. Mal. San. Amb.* **41**: 21-26.
- Rodríguez N. M., Docampo R., Lu H. G. & Scott D. (2002). Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca²⁺-ATPase gene Lmmal enhances virulence. *Cell. Microbiol.* **4**: 117-126.
- Spath F., Epstein L., Leader B., Singer S., Avila G., Turco S. & Beverly S. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 9258-9263.
- Spath F., Garraway L., Turco S. & Beverly S. (2003). The role of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections

in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 9536-9541.

Titus R. G. & Ribeiro J. M. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*. **239**: 1306-1308.

WHO (2014). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Consultado en fecha 16-07-2014

Zerpa O., Ulrich M., Benítez M., Ávila C., Rodríguez V., Centeno M., *et al.* (2002). Epidemiological and immunological aspect of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **97**: 1079- 1083.

Recibido el 20/12/2013
Aceptado el 23/06/2014