

Secuencia parcial del genoma del maxicírculo de *Leishmania braziliensis*, comparación con otros tripanosomátidos

Paola Nocua¹, Cesar Ramírez¹, José María Requena², Concepción Judith Puerta^{1*}

¹Laboratorio de Parasitología Molecular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, España.

* cpuerta@javeriana.edu.co

Recibido: 14-12-2010; Aceptado: 23-02-2011

Resumen

Objetivo. Con el fin de aportar nueva información relevante para estudios de genotipificación y filogenética del género *Leishmania*, en este estudio se determinó y comparó la secuencia del maxicírculo de *Leishmania braziliensis*, cepa MHOM-BR-75-M2904, con las secuencias del maxicírculo reportadas para otras especies de tripanosomátidos. **Materiales y métodos.** La búsqueda de las secuencias del maxicírculo se realizó en las bases de datos de secuencias no ensambladas del GeneDB versión 2.1, así como en el GenBank, utilizando los genes *ND8* y *RPS12* de *L. braziliensis* como sonda inicial. Estas secuencias se ensamblaron y se compararon con sus homólogas en otros tripanosomátidos mediante el uso de herramientas bioinformáticas como LALIGN y ClustalW2. El tamaño total del maxicírculo se determinó mediante ensayos de Southern blot. **Resultados.** Se ensamblaron dos fragmentos del maxicírculo de *L. braziliensis* de 6535 y 4257 nucleótidos, cuyos genes presentaron elevada sintenia y similitud en sus secuencias con los previamente reportados en otras especies de *Leishmania*. Similitud que se extiende incluso a los patrones de edición de estas moléculas. **Conclusiones.** A pesar de ser *L. braziliensis* la especie más divergente del género *Leishmania* en cuanto a su genoma nuclear, el maxicírculo presenta una elevada conservación. Resultado que sugiere que el patrón de edición presente en las diferentes especies de *Leishmania* hasta ahora estudiadas se conserva también en el subgénero *Viannia*, lo que indica una elevada conservación en la edición de los transcritos mitocondriales a nivel de género.

Palabras clave: ADN del cinetoplasto (ADNk), edición del ARN, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, maxicírculo.

Abstract

Maxicircle genome partial sequence of *Leishmania braziliensis*: assembling and comparison with other trypanosomatids. Objective. With the aim to provide new insights for genotyping and phylogenetic studies of the *Leishmania* genus, in this study the sequence of the maxicircle in *Leishmania braziliensis*, strain MHOM-BR-75-M2904, was determined and compared with those reported in other trypanosomatids species. **Materials and methods.** Searches for maxicircle sequences were performed in the unassembled sequences of GeneDB database version 2.1, as well as in the GenBank, using the *ND8* and *RPS12* genes of *L. braziliensis* as the initial probes. These sequences were assembled and compared with the homologous sequences of trypanosomatids using the bioinformatics tools LALIGN and ClustalW2. The size of maxicircle was determined by Southern blot assays. **Results.** Two maxicircle fragments of 6535 and 4257 nucleotides were assembled. The sequences of these genes showed high synteny and similarity with the sequences in other *Leishmania* species. This similarity even was extended to the editing patterns of these molecules. **Conclusions.** Although *L. braziliensis* is the most divergent species of the *Leishmania* genus in their nuclear genome, the maxicircle has a high conservation. This result suggests that the pattern of editing present in the different *Leishmania* species studied has been conserved also in the subgenus *Viannia*. These results indicate a high conservation in the editing of mitochondrial transcripts at the genus level.

Key words: kinetoplast DNA (kDNA), RNA editing, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, maxicircle.

Resumo

Seqüência do genoma parcial do maxicirculo de *Leishmania braziliensis*: montagem e comparação com outros tripanossomatídeos. **Objetivo.** Com o fim de contribuir nova informação relevante para estudos de genotipagem e filogenética do gênero *Leishmania*, neste estudo determinou-se a seqüência do maxicirculo de *Leishmania braziliensis*, cepa MHOM-BR-75-M2904, comparando-se com as seqüências do maxicirculo reportadas para outras espécies de tripanossomatídeos. **Materiais e Métodos.** A busca das seqüências do maxicirculo foi realizada nas bases de dados para seqüências não alinhadas no GeneDB versão 2.1, assim como no GeneBank, utilizando o genes *ND8* e *RPS12* de *L. braziliensis* como sonda inicial. Essas seqüências foram alinhadas e comparadas com as suas homologas em outros tripanossomatídeos, mediante o uso de ferramentas bioinformáticas como L-ALIGN e ClustalW2. O tamanho total do maxicirculo foi determinado mediante ensaios de *Southern blot*. **Resultados.** Foram alinhados dois fragmentos do maxicirculo de *L. braziliensis* de 6535 e 4257 nucleotídeos, cujos genes apresentaram elevada sintonia e similaridade nas suas seqüências com os genes previamente reportados nas outras espécies de *Leishmania*. A similaridade vista estende-se, inclusive, aos padrões de edição para estas moléculas. **Conclusões.** Apesar de *L. braziliensis* ser a espécie mais divergente do gênero *Leishmania*, no que se refere ao seu genoma nuclear, o maxicirculo apresenta uma alta conservação. Esse resultado sugere que o padrão de edição apresentado nas espécies de *Leishmania* até agora estudadas, é conservado também no subgênero *Viannia*, o que indica uma alta conservação na edição dos transcritos mitocondriais ao nível de gênero.

Palavras-chave: ADN de kinetoplasto (ADNk), edição de ARN, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, maxicirculo.

Introducción

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades producidas por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*, los cuales son transmitidos en América por la picadura de insectos del género *Lutzomyia* (1). Esta enfermedad tiene un amplio rango de manifestaciones las cuales abarcan desde la infección cutánea, mucocutánea a visceral (2). Dentro de los principales agentes etiológicos de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Colombia se encuentra la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (1).

Las leishmanias, al igual que los otros géneros pertenecientes al orden *Kinetoplastida*, se caracterizan por la presencia de un organelo denominado cinetoplasto, correspondiente al ADN mitocondrial o ADNk del parásito (3). El cinetoplasto es una red compleja formada por dos clases de moléculas de ADN circular concatenadas entre sí: los minicírculos y los maxicírculos. Los primeros tienen un tamaño que varía entre 0,7 – 1.0 kb dependiendo de la especie de kinetoplastido, se encuentran repetidos entre 5000 - 50000 veces por cinetoplasto, codifican para los ARN pequeños ricos en uridinas conocidos como ARN guías (ARNg) y se caracterizan por presentar una amplia variabilidad en sus secuencias (4 - 6). Los maxicírculos por su parte, con tamaños de 20 - 38 kb y 20 - 50 copias por cinetoplasto, son moléculas conservadas con excepción de la región divergente (DR), la cual se caracteriza por poseer elementos repetidos y tener una extensión variable, siendo de 4073 nt en *Leishmania tarentolae* (4, 7, 8).

Los maxicírculos contienen dos ARN ribosomales (ARNr), algunos ARNg y codifican para 18 genes estructurales incluyendo la proteína ribosomal S12 (RPS12), varias de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial como la apocitocromo b (CyB), las subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa (COI, COII, COIII) y las subunidades 1, 3, 4, 7, 8 y 9 de la NADH deshidrogenasa (ND1, ND3, ND4, ND7, ND8 y ND9), aparte de cuatro marcos de lectura abiertos conocidos como MURF1, MURF2, MURF4 o ATPasa 6 (9) y MURF5 (4, 5, 10, 11). La información codificante de algunos de estos genes se encuentra encriptada, los transcritos generados con frecuencia carecen de codones que indiquen el inicio o fin de la traducción y la secuencia codificante está incompleta (12). Antes de ser traducidos, estos transcritos van a experimentar un proceso de edición, que, mediante la inserción y delección de residuos de uridinas en sitios específicos del ARN naciente o pre-editado, conduce a la creación de marcos de lectura correctos (13). Este mecanismo de edición, que tiene una progresión en sentido 3' – 5', es asistido por los ARNg, los cuales actúan de molde o plantilla (14 - 16). Así, el ARNg en su zona de anclaje en su extremo 5' forma una dúplex de 10 – 15 nt con el ARNm pre-editado. El número de uridinas adicionadas es guiado por la cantidad de adenosinas o guanosinas sin aparear con el ARN pre-editado presentes en el ARNg corriente abajo del dominio de anclaje. En tanto que los residuos de uridinas a deleccionarse se marcan por su ausencia en el extremo 3' del fragmento que sobresale del dúplex ARNg:ARNm (16).

Actualmente se conoce la totalidad del genoma del maxicírculo de algunas especies de kinetoplastidos como

L. tarentolae (5, 10), *Leishmania donovani* (11), *Trypanosoma brucei* (5, 17 - 19) y *Trypanosoma cruzi* (20) y, secuencias parciales de los maxicírculos de *Leishmania major* (21), *Leishmania amazonensis* (22), *Crithidia fasciculata* (23, 24) y *Phytomonas serpens* (25, 26).

En este artículo se reporta la secuencia de dos fragmentos no contiguos de la región codificante del genoma del maxicírculo de *L. braziliensis*, para un total de cobertura de 10,7 kb y, se presenta un análisis comparativo de estas secuencias con las de otros kinetoplastidos previamente reportadas.

Materiales y métodos

Parásitos

La cepa de *L. braziliensis* MHOM-BR-75-M2904 utilizada en este estudio fue caracterizada y proporcionada por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM, Cali - Colombia). Los parásitos fueron crecidos a 26 °C en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, USA) suplementado con 20% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (Eurobio, Les Ulis- Courtabeuf, Francia).

Ensayos de Southern blot

Para determinar el tamaño total del maxicírculo se realizó un ensayo de Southern blot utilizando ADN total del parásito, obtenido de acuerdo a Requena y colaboradores (1988), digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Bst*BI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sph*I y *Xho*I, de acuerdo a las indicaciones de la casa fabricante (Promega®, Wisconsin, USA). Las enzimas se seleccionaron con base en la presencia de sitios únicos de restricción en el genoma del maxicírculo de *L. tarentolae*, *L. donovani* y *L. major*. Los fragmentos resultantes fueron resueltos mediante electroforesis horizontal, en un gel de agarosa al 0,8% y transferidos a membrana de nylon por el método de transferencia salina (28), para su posterior hibridación con un fragmento que contiene 155 pb correspondiente al extremo 5' no editado del gen *ND8* de *L. braziliensis* (29, **Material supl. 1**), el cual no presenta identidad significativa con regiones del ADN nuclear del parásito. La sonda fue marcada con digoxigenina utilizando el estuche comercial DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Basel, Suiza). El protocolo de hibridación se realizó en condiciones de astringencia siguiendo las indicaciones del fabricante (Manual de Instrucción DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II). Posteriormente, se realizaron dos

lavados en condiciones astringentes con solución salina citrato (SSC) 0,1% y SDS al 0,1% a 68 °C por 15 min cada uno, seguidos de exposición a películas de rayos X Curix RP2 Plus (AGFA, Mortsel, Bélgica) durante 1h.

Obtención de la secuencia parcial del maxicírculo de *L. braziliensis*

La construcción de la secuencia parcial del maxicírculo de *L. braziliensis* se realizó mediante análisis BLAST de las secuencias reportadas en las bases de datos GeneDB de secuencias no ensambladas (<http://old.genedb.org/genedb/lbraziliensis/>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Como sonda inicial para los análisis de hibridación *in silico* del fragmento de 6535 pb se utilizó un fragmento de 155 pb correspondiente al extremo 5' no editado de la secuencia del gen *ND8* del parásito (29, **Material supl. 1**), mientras que para el fragmento de 4257 se utilizó el gen *RPS12* de *L. braziliensis*. La elongación de la secuencia en construcción se logró mediante pasos reiterativos de análisis BLAST/n de los extremos del fragmento ensamblado, seguido de análisis LALIGN con cada una de las entradas encontradas en el BLAST/n. Los números de acceso de las secuencias empleadas para el ensamblaje del maxicírculo se muestran en la **tabla 1 (Material supl. 2A y 2B)**, con su correspondiente valor de “e” de significancia de los análisis BLAST.

Análisis de las secuencias

Las secuencias génicas de *L. braziliensis* se identificaron por similitud con las secuencias reportadas en *L. tarentolae* (N° de acceso al GenBank M10126), cuyo maxicírculo ha sido secuenciado en su totalidad. Para ello, se compararon de forma individual cada una de las secuencias obtenidas con su contraparte en *L. tarentolae*, utilizando la herramienta LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). La comparación de varias secuencias se realizó mediante la herramienta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Los perfiles de restricción *in silico* se determinaron utilizando la herramienta NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). La determinación de la sintenia se realizó mediante comparación del orden de los genes entre los distintos maxicírculos de las especies analizadas. La dirección de la transcripción de los genes se determinó de acuerdo a la presencia del marco de lectura abierto, luego del ensamblaje del genoma, en la cadena sentido o antisentido. La presencia putativa de dominios funcionales en la proteína putativa MURF5 se determinó mediante la herramienta InterproScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

Tabla 1. Descripción de las entradas utilizadas para la construcción de la secuencia del maxicírculo de *L. braziliensis*

Fragmento	N° de acceso	Tamaño (nt)	e - value	Base de datos
6535 nts	AB095966.1	804	1 e ⁻²⁵	GenBank
	Brazil75c12.q1k	66	1.4 e ⁻⁵²	GeneDB
	Brazil63b03.p1k	238	5.0 e ⁻¹⁶	GeneDB
	Brazil1432f10.q1k	89	8.7 e ⁻⁶⁷	GeneDB
	Brazil182d06.q1k	318	6.9 e ⁻²¹	GeneDB
	Brazil81e11.q1ka	85	1.9 e ⁻⁴⁹	GeneDB
	Brazil227d04.p1k	226	1.2 e ⁻²⁸	GeneDB
	Brazil555h03.p1k	141	2.9 e ⁻²⁶	GeneDB
	Brazil1598g08.q1k	73	2.9 e ⁻⁹⁰	GeneDB
	Brazil621f05.p1k	355	4.6 e ⁻²¹	GeneDB
	Brazil466g05.q1k	49	1.1 e ⁻¹³	GeneDB
	Brazil606f10.p1k	519	5.7 e ⁻¹³	GeneDB
	Brazil281b06.p1k	77	8.5 e ⁻¹³	GeneDB
	Brazil1348c08.q1k	111	8.0 e ⁻²⁰	GeneDB
	Brazil1133b07.p1k	201	6.2 e ⁻⁶⁴	GeneDB
	Brazil20h04.p1k RevComp	274	4.6 e ⁻¹¹¹	GeneDB
	Brazil423g06.q1k	860	5.3 e ⁻³⁰	GeneDB
	Brazil27a07.q1k	142	2.7 e ⁻¹⁶⁰	GeneDB
	Brazil653a10.p1k RevComp	34	5.4 e ⁻²⁷	GeneDB
	Brazil1081f06.p1k RevComp	114	1.2 e ⁻²⁰	GeneDB
	Brazil251e11.p1k RevComp	151	1.1 e ⁻²²	GeneDB
	Brazil81e11.p1ka RevComp	50	5.1 e ⁻²⁹	GeneDB
	Brazil982e01.p1k	158	2.6 e ⁻²¹	GeneDB
	Brazil487c05.p1k RevComp	174	1.1 e ⁻³⁰	GeneDB
	Brazil802h07.q1k RevComp	92	3.6 e ⁻³⁴	GeneDB
	Brazil700a03.p1k RevComp	137	5.4 e ⁻²³	GeneDB
	Brazil1252c02.q1k RevComp	138	1.1 e ⁻²⁵	GeneDB
	Brazil595d07.p1k RevComp	91	1.6 e ⁻²¹	GeneDB
	Brazil1521b09.p1k RevComp	208	2.8 e ⁻¹⁵	GeneDB
	Brazil66e05.q1k RevComp	191	4.4 e ⁻⁴⁵	GeneDB
	Brazil226a12.p1k RevComp	118	4.4 e ⁻³⁸	GeneDB
	Brazil241b09.p1k RevComp	251	8.0 e ⁻³³	GeneDB
4257 nts	Brazil1501c09.q1k	72	8.0 e ⁻¹⁵	GeneDB
	Brazil1501c12.q1k	540	1.6 e ⁻⁰⁸	GeneDB
	Brazil1001a09.p1k	383	4.6 e ⁻²⁰	GeneDB
	Brazil1043b09.q1k	594	9.2 e ⁻⁰⁷	GeneDB
	Brazil1043b09.p1k RevComp	265	1.8 e ⁻¹⁵	GeneDB
	Brazil827b08.p1k	432	2.7 e ⁻⁵⁴	GeneDB
	Brazil484c11.q1k RevComp	257	2.3 e ⁻¹⁸	GeneDB
	Brazil483f03.p1k	328	3.4 e ⁻⁰⁵	GeneDB
	Brazil655c08.p1k	432	8.2 e ⁻¹⁵	GeneDB
	Brazil622d11.p1k	341	1.5 e ⁻⁰⁷	GeneDB
	Brazil483f03.q1k RevComp	461	1.3 e ⁻⁰⁹	GeneDB
	Brazil655c08.q1k RevComp	152	1.8 e ⁻¹³	GeneDB

Resultados y discusión

Características de la secuencia parcial del maxicirculo de *L. braziliensis*

El maxicirculo completo de *L. braziliensis* posee un tamaño aproximado de 23 kb como se observa claramente en las digestiones realizadas con las enzimas *Hind*III y *Bst*BI (Figura 1). Resultados que concuerdan con lo reportado para *L. tarentolae*, 21 kb (10) y *L. donovani*, 20 kb, (11), y otros tripanosomátidos como *T. brucei*, 23 kb, y *T. cruzi*, 20 kb cepa CL Brener y 22 kb, cepa Esmeraldo (17 - 20).

A partir de 44 secuencias previamente reportadas en diferentes bases de datos, se logró determinar gran parte de la secuencia del maxicirculo de *L. braziliensis*. Se ensamblaron dos fragmentos del maxicirculo, el primero con un tamaño de 6535 nt que contiene tres ARN guías (ARNg) y

los ARN ribosomales (ARNr) 12S y 9S, además de codificar para las secuencias pre-editadas de las proteínas ND7, ND8, ND9, COIII, CyB y MURF5 (Figura 2, Material supl. 2A). El segundo fragmento con un tamaño de 4257 nts codifica para las secuencias correspondientes a los genes ND4, ND3 (conocido también como región G5), RPS12 y ND5, así como la región G4 (Figura 2, Material supl. 2B). La separación entre ambos fragmentos no es conocida, aunque su tamaño aproximado se puede deducir si se considera que los genes ND4 y CyB en *L. tarentolae* están separados por 6672 nt (10).

La organización genómica de la secuencia parcial del maxicirculo de *L. braziliensis*, esquematizada en la Figura 2, es bastante similar a la de *L. tarentolae* tanto en el orden (12S, 9S, ND8, ND9, MURF5, ND7, COIII, CyB-G4, ND4, ND3, RPS12 y ND5), como en la posición, longitud y secuencia de los genes.

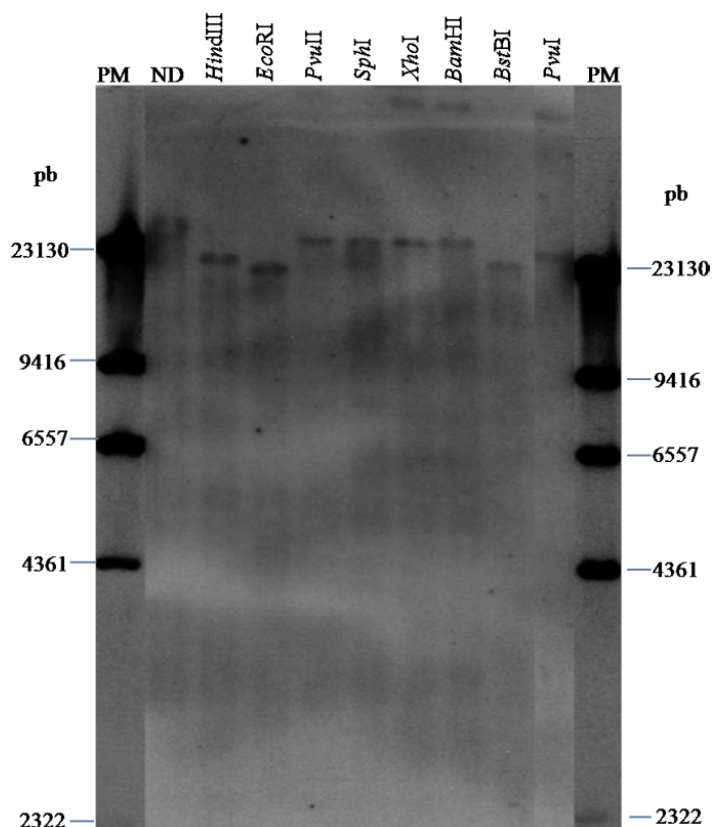


Figura 1. Estimación del tamaño en pares de bases del maxicirculo de *L. braziliensis* mediante ensayo de “Southern blot”. El ADN digerido con las diferentes enzimas de restricción se hibridó con una sonda que contiene 155 nts correspondiente a la secuencia pre-editada del gen ND8 de *L. braziliensis*. Marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (PM) y ADN no digerido (ND). Estos resultados de Southern blot en conjunto con los resultados del patrón de restricción obtenido *in silico* de la secuencia ensamblada, indican que mientras las enzimas *Pvu*II, *Sph*I, *Xho*I, *Bam*HI y *Pvu*I no presentan diana de restricción en el genoma del maxicirculo, las enzimas *Hind*III y *Bst*BI presentan una diana, linealizando y la endonucleasa *Eco*RI, dos dianas, originando dos fragmentos de restricción, uno cercano a 20 kb y otro a 3 kb. Este último no se observa en el Southern blot debido a que no es reconocido por la sonda utilizada.

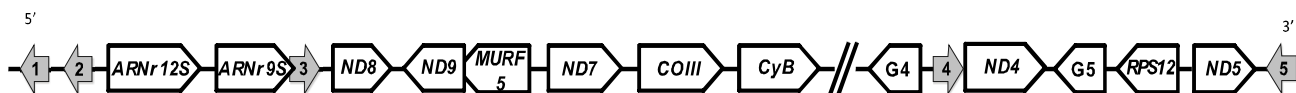


Figura 2. Esquema de la organización del maxicírculo del *L. braziliensis*. La orientación de las cajas indica el sentido de la transcripción. Las flechas corresponden a los ARN_g así: la 1 al gM150, la 2 corresponde al gND7-II, la 3 al gCyb-II, la 4 al gMURF2-II y la 5 al gND7-I. G5 corresponde al gen ND3.

Más aún la orientación de la transcripción de los genes parece ser idéntica, en donde los genes 12S, 9S, ND8, ND7, COIII, CyB, ND4, RPS12 y ND5, se transcriben de la hebra sentido, mientras que los genes ND9, MURF5 y ND3 son transcritos a partir de la hebra anti-sentido. Al comparar con la secuencia parcial de los maxicírculos de otras especies como *L. major* (cepa MHOM/SU/73/5ASKH, N° de acceso al GenBank EU140338), *L. donovani* (cepa MHOM/SD/62/1S-C12D, N° de acceso al GenBank FJ416603) y *L. amazonensis* (cepa LV78, N° de acceso al GenBank HM439238) también se observaron resultados similares con excepción de algunas diferencias en el tamaño de las secuencias pre-editadas (Tabla 2). Por ejemplo, en relación a *L. donovani* se observan diferencias de 70 nts en los genes ND8 y CyB; mientras que en comparación con *L. major* las diferencias más notorias se presentaron con los genes ND8, ND9 y MURF5. Cabe resaltar que si bien la secuencia que codifica para MURF5 no ha sido descrita en el maxicírculo de *L. donovani*, esta fue identificada en este estudio en las posiciones 2159 - 2457 de la hebra antisentido, mediante un alineamiento con el gen respectivo de *L. tarentolae*.

Al extender el análisis a otros tripanosomátidos como *T. cruzi* (cepa CL Brener, N° de acceso al GenBank DQ343645 y cepa Esmeraldo, N° de acceso al GenBank DQ343646) y *T. brucei* (cepa EATRO 427, N° de acceso al GenBank M94286) se observaron diferencias marcadas con relación al tamaño de las regiones pre-editadas de los genes codificantes para ND7 y COIII presentando diferencias de 406 – 460 nts. También se observó variabilidad en relación a los genes ND8 y ND9 cuyo tamaño se conserva en *T. cruzi* pero no en *T. brucei*. A diferencia de la secuencia de CyB; el resto de las secuencias presentan diferencias hasta de 150 nts. Con relación a los kinetoplastidos *P. serpens* y *C. fasciculata* se encontraron diferencias en el tamaño de todas las regiones pre-editadas reportadas con un rango de 25 a 462 nts de diferencia (Tabla 2).

Los anteriores resultados muestran una considerable sintenia de los genes del maxicírculo entre las distintas especies del parásito que infectan lagartos y mamíferos, independientemente del subgénero. Así mismo, el elevado

porcentaje de similitud entre los genes pre-editados tanto en longitud como en secuencia sugiere patrones similares de edición entre las distintas especies. En este mismo sentido, las diferencias encontradas con otros géneros de tripanosomátidos como *Trypanosoma*, *P. serpens* y *C. fasciculata*, presuponen patrones de edición más distantes entre los mismos.

Secuencias pre-editadas

Secuencia pre-editada de la proteína ND8: anteriormente conocida como región G1, en *L. tarentolae*, esta secuencia se caracteriza por sufrir “pan-editing”, es decir edición extensiva a lo largo de toda la molécula (11, 22, 29, 32). Al comparar la secuencia pre-editada de *L. braziliensis* con la correspondiente en *L. tarentolae* se observó una identidad de 65,2%, valores muy cercanos a los observados al comparar con las regiones equivalentes en *L. donovani* y *L. major*, pero más distantes a los resultados obtenidos con otros tripanosomátidos, especialmente para *T. brucei* y *P. serpens* (Tabla 3). De especial interés, Ramírez et al. mostraron como los ARN respectivos de este gen sufren edición, alcanzando una identidad del 91,9% con respecto a la secuencia de *L. tarentolae* en la región editada (29).

Secuencia pre-editada de la proteína ND9: también conocida como G2, esta secuencia, al igual que para la secuencia codificante de la proteína ND8 en *L. tarentolae*, presenta una edición extensiva del mismo (11, 22, 32). Los porcentajes de identidad de la secuencia pre-editada de *L. braziliensis* resultaron ser de 71,9%, 71,2%, 66,5% y 53,4% con las secuencias de *L. tarentolae*, *L. donovani*, *L. amazonensis* y *L. major*, respectivamente. Al comparar con el resto de secuencias de las especies de tripanosomátidos analizados se observaron porcentajes de identidad inferiores, entre 43,9 y 55,3% (Tabla 3).

Secuencia pre-editada del marco de lectura abierto MURF5: estudios recientes de Maslov (22) indican que esta secuencia parece no sufrir edición en tripanosomátidos. Sin embargo, se constató que existe una variabilidad significativa tanto en su extremo amino como carboxilo

Tabla 2. Comparación de las secuencias pre-editadas del maxicírculo de *L. braziliensis* con otras especies de tripanosomátidos

Genes y secuencias		ESPECIES									
		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i>	<i>T. cruzi</i> CL Brener	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	<i>T. brucei</i>	<i>P. serpens</i>	<i>C. fasciculata</i>
12S ARNr	Posición	488-1659	438-1610	1-829	1-1112	1-328	4707-5867	4751-5903	1364-2512	217-1368	13-1153
	Tamaño (nt)	1172	1173	--	--	--	1161	1153	1149	152	1141
9S ARNr	Posición	1708-2319	1639-2249	849-1458	1141-1750	355-965	5906-6514	5947-6554	2542-3152	1388-1996	1202-1813
	Tamaño (nt)	612	610	610	610	611	609	608	611	609	612
ND8	Posición	2414-2863	2380-2600	1515-1858	1843-2100	1090-1298	6559-6837	6607-6877	3162-3522	2056-2264	--
	Tamaño (nt)	270	221	344	258	209	279	271	361	209	--
	Codón Inicio	AUG ○	AUG*	--	AUG ♦	--	--	--	AUG*	AUG	--
ND9	Posición	3072-2726	3006-2648	2202-1853	2459-2136	1624-1379	6901-7238	6942-7295	3802-3482	2577-2335	--
	Tamaño (nt)	347	359	350	324	246	338	354	321	243	--
	Codón Inicio	--	AUG*	--	AUG ♦	--	--	--	AUG*	--	--
MURF5	Posición	3331-3034	3268-2966	2457-2159	2731-2471	1937-1671	7274-7421	7326-7472	4021-3788	2825-2475	--
	Tamaño (nt)	298	303	299	261	267	148	147	234	351	--
	Codón Inicio	AUG	UUG ♦	UUG ♦	UUG ♦	--	--	--	AUG ♦	AUG ♦	--
ND7	Posición	3352-4513	3290-4458	2477-3646	2772-3946	1977-3120	7563-8317	7612-8367	4066-4767	2905-4041	1169-1868
	Tamaño (nt)	1162	1169	1170	1175	1144	755	756	702	1137	700
	Codón Inicio	UA	AUA ▲	AUA ►	AUA ♦	AUA ●	--	--	UGA*	AUU*	ACG*
COIII	Posición	4567-5423	4511-5362	3674-4549	3991-4843	3148-4008	8384-8806	8435-8859	4768-5206	--	2331-3194
	Tamaño (nt)	857	852	876	853	861	423	425	439	--	864
	Codón Inicio	AUG	AUG*	AUG ►	AUG ♦	AUG ●	--	--	AUG*	--	AUG*
CyB	Posición	5458-6535	5403-6481	4568-5668	4883-5960	4044-5123	8881-9960	8917-9996	5275-6354	--	3243-3353
	Tamaño (nt)	1078	1079	1101	1078	1079	1080	1080	1080	--	111
	Codón Inicio	AUG	AUG*	AUG ►	AUG ♦	UUA ●	--	--	AUG*	--	UG*
G4	Posición	444-224 ■	13079-12865	13080-12852	16-241 ♦	--	16383-16177	16408-16237	12726-12445	8470-8223	--
	Tamaño (nt)	221	216	229	226	--	207	171	283	248	--
	Codón Inicio	--	AUG*	--	AAU ♦	--	--	--	AUG ♦	--	--
ND4	Posición	506-1823 ■	13152-14465	13158-14474	--	--	16488-17801	16409-17622	12780-14090	8602-9861	--
	Tamaño (nt)	1318	1314	1317	--	--	1314	1213	1310	1259	--
	Codón Inicio	--	AUG*	AUG ♦	--	--	AUG	AUG	AUG	AUG	--
ND3 (G5)	Posición	2452-2210 ■	14695-14447 ►	1472-14459	763-520	--	17985-17793	17801-17614	14326-14059	10030-9900	40-190
	Tamaño (nt)	243	248	214	244	--	192	187	268	130	151
	Codón Inicio	--	UUU*	--	AUG●	--	--	--	UCA*	--	--
RPS12	Posición	1994-2237 ■	14645-14889 ►	14667-14917	710-953	--	1063-18253	17879-18065	14310-14481	10037-10246	183-392
	Tamaño (nt)	243	245	251	244	--	190	186	172	210	210
	Codón Inicio	--	AUU ♦	AUU ♦	AUU ♦	--	--	--	AUG*	AUG*	AUG*
ND5	Posición	2249-4023 ■	14924-16696 ►	14946-16718	--	--	18274-20043	18085-1985	14490-16259	10259	425
	Tamaño (nt)	1775	1773	1772	--	--	1769	1770	1770	--	--
	Codón Inicio	--	AUG*	AUG	--	--	--	--	AUG*	AUG*	AUG*

■ Estas posiciones corresponden a la segunda secuencia descrita.

○ Tomado de Ramírez *et al.*, 2010 (29)

* Tomado de base de datos <http://dna.kdna.ucla.edu/trypanosome/database.html>, Simpson *et al.*, 1998 (30)

♦ Tomado de Maslov 2010 (22)

● Tomado de Yatawara *et al.*, 2008 (21)

■ Tomado de Neboháèová, 2008 (11)

▲ Tomado de Blum *et al.*, 1990 (31)

Tabla 3. Porcentaje de identidad de las secuencias pre-editadas de *L. braziliensis* con las reportadas para otros tripanosomátidos

ESPECIE	GEN										
	ND8	ND9	MURF5	ND7	COIII	CyB	G4	ND4	ND3	RPS12	ND5
<i>L. tarentolae</i>	65,2	71,9	71,6	87,3	87,3	90,5	62,9	84,4	55,2	71,8	83,7
<i>L. donovani</i>	66,7	71,2	62,8	86,3	84,5	88,4	67,4	84,9	62,9	65,8	83,5
<i>L. amazonensis</i>	76	66,5	72,5	86,3	85,7	89,7	66,9	—	67,8	70,2	—
<i>L. major</i>	66,1	53,4	67,3	87,2	84,7	89,1	—	—	—	—	—
<i>T. cruzi</i> CL Brener	59	50,7	38,3	42,9	30,6	82,4	50,4	76,7	41,6	41,8	74,1
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	58,4	50,4	38,3	43,2	30,8	82,5	44,8	71,6	45,7	42,1	74,2
<i>T. brucei</i>	51,6	55,3	52,5	41,7	31,5	84,3	45,6	76,9	55	40,2	76,8
<i>C. fasciculata</i>	—	—	—	27,9	79,7	—	—	—	39,1	57,5	—
<i>P. serpens</i>	56,5	43,9	45,6	78,1	—	—	42,9	73,2	30,3	49,8	—

terminal entre las distintas especies de *Leishmania* y kinetoplastos en general (22). Así, al realizar un alineamiento múltiple de la secuencia de *L. braziliensis* con las previamente reportadas, esta parece ser la situación en esta especie (**Figura 3**). Llamativamente, a semejanza de *T. brucei* y *P. serpens*, el codón de inicio de este marco de lectura parece corresponder a la tradicional metionina, en lugar de la leucina reportada en *L. tarentolae*, *L. donovani*, *L. major* y *L. amazonensis* (10, 11, 21, 22). A este respecto es importante señalar que al igual que para otros ADN mitocondriales el código genético del ADNk rompe con las reglas del código universal, en el sentido de que la tripleta UGA no representa un codón de terminación sino que codifica para el aminoácido triptófano (10), además de las tripletas que codifican para codones de inicio diferentes a la metionina como las codificantes para leucina e

isoleucina (33-35). Queda por definir si la variabilidad de los extremos de la proteína putativa MURF5 ejerce algún impacto en su posible función. Sin embargo, análisis *in silico* de dominios funcionales putativos muestran que esta proteína presenta un dominio trans-membrana, localizado en la región conservada de la misma.

Secuencia pre-editada de la proteína ND7: en *L. tarentolae* esta secuencia presenta edición en el extremo 5' de la molécula y en una región interna 170 nts corriente abajo del AUA de inicio (22). Al alinear la región pre-editada de *L. braziliensis* con la secuencia editada de *L. tarentolae* y realizar la simulación del proceso de edición *in silico* (**Figuras 4A y 4B**), se observó que esta secuencia puede presentar el mismo patrón de edición, común a las otras especies del parásito reportadas.

```

L.m  ———YKK—NLFLHKFLNLKFNNNIINIMYKIKFIFN—LYCIDNYSIYFNLNGILLWLNIL
L.d  ———KG—FLFIYKLSKLNNYNN—YKIKLLFNNYIYCIDNYNSIYFNLNGILILIWLNIL
L.t  STYTVTNNYHKNIILIFIHKILKLNTFNCTS—WKIILLLNN—LYCVDNYSIYFNLNGILLWLNLL
L.b  ———NLK—MFTYKLHKKKFYFLN—KINKFFNT—LHCIDIYNTIYFNLNGILLWLNII
T.b  ————MFLIHFVHYKTILQ——KYTFKFKHIFLSIDKYNSLFFNISGILILIWLNII
P.s  ————MFLYKPNNITTVAVLTYN—SFSFTIQK—YHCIDICMHLFLRLYGVFIWLNLS

L.m  HINIILVKYSFLILLNNLEYLIIFFFIINCLY—————
L.d  HINIILIKYSFLILLNNLEYLIIFFFIINMIYIYNLKRLLSFGREEREEGEES—————
L.t  HINIIIIKYSFLILLNNLEYLIIFFFLYNLISIKYKDV—————
L.b  HINIILIKYSFLILLNNLEYLIIISNI—————
T.b  HINIILIKYSFFILLNNLEYLIILIST—————
P.s  LVNLLIKNYFYLINLEYFIISLFKLLINIKWGGG—FKWGERGRGGVLVGKEEGKIEGVRLEKGF

```

Figura 3. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de MURF5 de *L. braziliensis* (*L.b*) con sus homólogos en *L. amazonensis* (*L.m*), *L. donovani* (*L.d*), *L. tarentolae* (*L.t*), *T. brucei* (*T.b*) y *P. serpens* (*P.s*). Las posiciones fuertemente conservadas se encuentran en cursiva, en negrita se encuentran los aminoácidos con cambios conservados y subrayados los aminoácidos con cambios no conservados.

A.

L.b AA-----AGCAGACUACAUGAAAAUAUAA-----AAAGG-----CACUUGUAUAGAU
:
L.t AUUUUUAUUUAGCCGCACUACACGAUAAUUUAUUUUUAUUUUUAUUAAUUGUUUUUUUACACUUGUAUAGAU

L.b UUACAUUUGGUCCACAACAUCUGCAGCUCAUGGUGUAUUUAUGUUGUUUUAUUGUAUCUUUCAGGUGAGUU
:
L.t UUACUUUCGGACCCCAGCAUCCAGCAGCCCCAUGGCGUAUUUAUGUUGUUUUAUUAUUCUUUCGAGAAUU

L.b UAUA AUGUAUAUAUGAUUUUAUAGGAUAUUUA CACCGUGGCACAGAAAAGUUAUGUGAAUAUAAAACA
:
L.t UAUAACGUAAUAUGAUUUUAUUGGUAUUUA CAUCGAGGUACAGAAAAGUUAUGUGAAUAUAAAACA

L.b GUUGAACAGUGUUUACCGA---UGA-AGA-----
:
L.t GUAGAGCAGUGUUUACCGUAUUUUUGAUAGA-----

L.b UUGAUUGCUGUUAUUGGUAAGUUGAUGUUGUUUUUGGAUCAGUUGAUCCAUGAG--
:
L.t UUGAUGCAGUUAUCGGAAGUUGAUGUUGUUUUUGGUUCUGUUGACAGGUAAA

		10	20	30	40	50	60	70
L.b	AA-----	-AGCAGACu	ACAUGAAAAuu	AuAuuuuU	AuAuuuuAuu	AAuuGuuuuuuuu	GCACUUGU	AUAGAU
L.t	UUUUUUUUU	AGCCGACU	ACACGAUAAuu	AUAuuuuU	AuAuuuuAuu	AAuuGuuuuuuuu	ACACUUGU	AUAGAU
		10	20	30	40	50	60	70
		80	90	100	110	120	130	140
L.b	UUACAUUU	GGUCCACA	ACAUCUGC	AGCUCUA	UGGUGUAUU	AUGUUGUU	AUUGUAUCU	UUUCAGGUGAGUU
L.t	UUACUUUC	GGACCCAG	CAUCCAGC	AGCCCAUG	GCGUAUU	AUGUUGUU	AUUAUUCU	UUUCGAGAAUU
		80	90	100	110	120	130	140
		150	160	170	180	190	200	210
L.b	UAUAAUGU	AUAUAGA	UGUUAUU	AUAGGAU	UUUACACCG	UGGCACAG	AAAAGUU	AUGUGAAU
L.t	UAUAACGU	AUAUAGA	UGUUAUU	AUUGGGU	UUUACAUCG	AGGUACAG	AAAAGUU	AUGUGAAU
		150	160	170	180	190	200	210
		220	230	240				
L.b	GUUGAACAG	UGUUUACCG	uAuuuUGA	uAGA				
L.t	GUAGAGCAG	UGUUUACCG	uAuuuUGA	uAGA				
		220	230	240				
		1150	1160	1170	1180	1190		
L.b	UUAGUUGC	UGUUUUUGG	UAAUGUUG	AUGUUGUUUUUGG	AUCAGUUG	AUCGAUAG		
L.t	UUAGUAGC	AGUUUUCG	GAAAUUGU	AUGUUGUUUUUGG	UUCUGUUG	ACAGGUAAA		
		1150	1160	1170	1180	1190		

C.

	10	20	30	40	50	60	70	
L.b	ILFSRLHENYILYLLIVFLHLYRFTFGPQHAAHGVLCCLLYLSGEFIMYIDVIIGYLHRGTEKLCEYKTVEQC							
L.t	ILFSRLHDNYILYLLIVFLHLYRFTFGPQHAAHGVLCCLLYLSGEFITYIDVIIGYLHRGTEKLCEYKTVEQC							
	10	20	30	40	50	60	70	
	80	90	100	110	120	130	140	
L.b	LPYFDRLDYVSVVCNEHLLSLCFEYMLRCCLAIRCAFMRLLMCEFTRCFNGLCCSCMVMMDIGSLSPMLWSFEE							
L.t	LPYFDRLDYVSVVCNEHLLSLCFEYMLRCCLAIRCAFMRLLMCEFTRCFNGLCCSCMVMMDIGSLSPMLWSFEE							
	80	90	100	110	120	130	140	
	150	160	170	180	190	200	210	220
L.b	RDKLMTFFDLCCGCRMHLAFMCLLGLDDFVFGFVDFLLMLCISCLFVLDLYDLLFIGNRFLYLRLRGLAFFDV							
L.t	RDKLMTFFDLCCGCRMHLAFMCLLGLDDFVFGFIDFLLMLCISCLFVLDLYDLLFVGNRLLYLRLRGLAFFDI							
	150	160	170	180	190	200	210	220
	230	240	250	260	270	280	290	
L.b	FDLCFNSISGCLSRSLGMVWDVRLYSSYELYFILVFDYCFCYLGDAFDRFFLRFLDMRLVAVIGNVDVVFVGSVD							
L.t	FDLCFNSISGCLSRSLGMVWDVRLYSCYELYFMLVFDYCFCYLGDAFDRFLRLFDMRMSILLCKQCFVFGFFV							
	230	240	250	260	270	280	290	
	300	310	320	330	340	350	360	
L.b	R---CLFDYMYVDITTIETIISLFYSLWCCILPGCSFANVEHPKGEYSIFLCFLYGFISRLRIRCADFIHICLLD							
L.t	FGFVCLFDYMYVDVTIETIISLFYSLWCCILPGCSFANVEHPKGEYSIFLCFLYGFISRLRIRCADFVHICLLD							
	300	310	320	330	340	350	360	370
	370	380	390					
L.b	VMMRGFMIHDMSILLCKQCFVFGFFV							
L.t	VMMRGFMLHDLVAVIGNVDVVFVGSVD---							
	380	390						

Figura 4. Edición *in silico* de la secuencia ND7 de *L. braziliensis*. (A) Alineamiento de secuencias de nucleótidos entre *L. braziliensis* (pre-editada) y *L. tarentolae* (editada). (B) Alineamiento entre las secuencias editadas de *L. braziliensis* y *L. tarentolae*. (C) Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos correspondientes a *L. braziliensis* y *L. tarentolae*. Las líneas indican la continuidad de las secuencias.

Más aún, al comparar la secuencia putativa de aminoácidos resultante de la edición *in silico* de *L. braziliensis* con la secuencia reportada para otras leishmanias, se observó un porcentaje de identidad de 87,2% (Figura 4C), estando al igual que en otras especies del parásito, las divergencias ubicadas en el extremo carboxi terminal de la proteína. De especial interés, al igual que lo reportado para *L. tarentolae*, *L. amazonensis* y *L. major*, el codón de inicio de esta proteína parece corresponder al aminoácido no canónico isoleucina, al igual que en *P. serpens* (AF079967). Por otra parte, al comparar las regiones pre-editadas con las otras especies del parásito se encontraron porcentajes de identidad similares (86,7 – 87,3%, Tabla 3). Por el contrario, los porcentajes obtenidos con las otras especies de tripanosomátidos estuvieron alrededor del 40%, posiblemente de-

bido al “pan-editing” que sufren estas secuencias en *T. cruzi* (DQ343645 y DQ343646) y *T. brucei* (M94286).

Secuencia pre-editada de la proteína COIII: esta secuencia al igual que la respectiva de la proteína ND7, sufre edición en el extremo 5' de la molécula en las diferentes especies del parásito reportadas (11, 22, 36). Al realizar el alineamiento entre la secuencia pre-editada de *L. braziliensis* y la editada de *L. tarentolae* se observó el mismo patrón de edición (Figuras 5A y 5B), observándose un porcentaje de similitud de 89,2% (Figura 5C), Resultado coherente con los porcentajes de identidad obtenidos al comparar las secuencias pre-editadas con las especies analizadas los cuales variaron entre 84,5 – 87,3% (Tabla 3). Al igual que para la secuencia ND7, el porcenta-

Secuencia pre-editada de la proteína CyB: esta secuencia también sufre edición en el extremo 5' en todos los tripanosomátidos analizados.

L.b MVLRLDIFVGVSGVFVFFTLPAICITYLAFCLCSLFCIMFSSFIFIDYCFICFFACLLFCLICLICDLFVDTLRG
 : .:
 L.t MFVRVIFVGVSGVFVFLSLPAICIVYLTFLCLGCLFCIMFGSFIFIDYCFICFFACLLFCLVCLLCDLFVDSLRLG
 10 20 30 40 50 60 70
 80 90 100 110 120 130 140
 L.b LFDICCLIRCIQYCFVWFILSELFSLFLFYVVFSLILFVSVEFAFIFVIPIMFSLICDFGFGVFYWFYFIDVFN
 :
 L.t LFDVCCFIRCIQYCFVWFIISELLFLSLFYVVFSLVLFVSVEFAFVFVIPVMFSLICDFGFGVFYWFYFIDIFN
 80 90 100 110 120 130 140

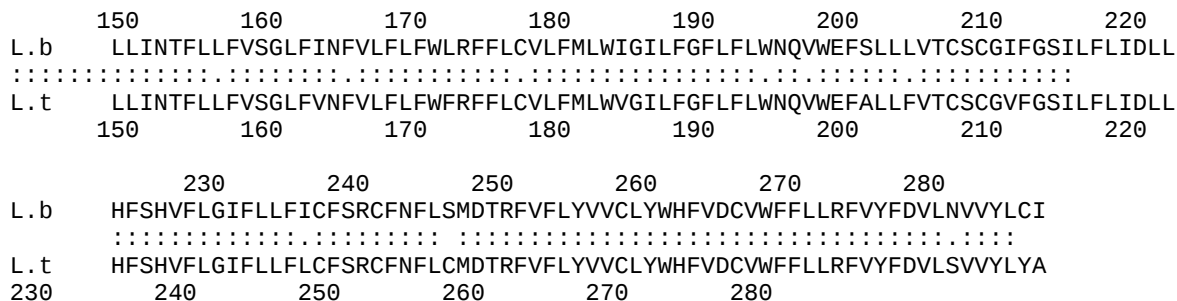


Figura 5. Edición *in silico* de la secuencia COIII de *L. braziliensis*. (A) Alineamiento de secuencias de nucleótidos entre *L. braziliensis* (pre-editada) y *L. tarentolae* (editada). (B) Alineamiento entre las secuencias editadas de *L. braziliensis* y *L. tarentolae*. (C) Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos correspondientes a *L. braziliensis* y *L. tarentolae*. Las líneas dentro de la secuencia indican la continuidad de las mismas.

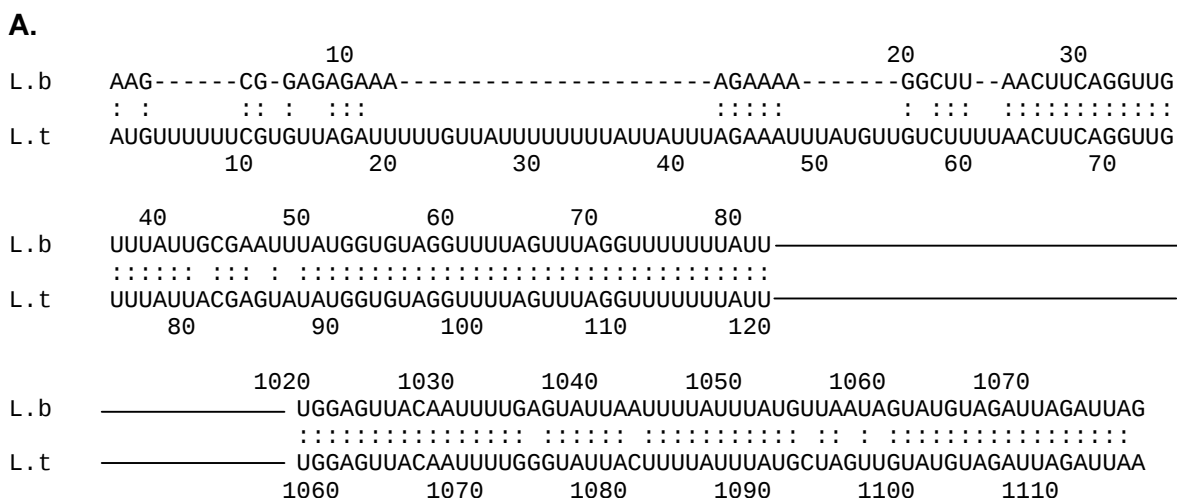
Así, se encontró el mismo patrón de edición en *L. braziliensis* al realizar un alineamiento entre la secuencia pre-editada de esta y la correspondiente en *L. tarentolae* (Figuras 6A y 6B), encontrándose un porcentaje de identidad de 96,5% (Figura 6C). Estos resultados se corroboraron al observarse el porcentaje de identidad obtenido al comparar las secuencias pre-editadas de este gen con las correspondientes en el resto de tripanosomátidos encontrándose valores de 82,4 – 90,5% (Tabla 3), evidenciándose la alta conservación de esta secuencia en los diferentes géneros de la familia Trypanosomatidae.

Secuencia pre-editada de la proteína ND4: en las secuencias reportadas de otros tripanosomátidos, este gen no presenta ningún tipo de edición y posee en la secuencia traducida un codón de inicio canónico conservado (AUG) (11, 22). Al analizar la secuencia de *L. braziliensis* se observó la falta de este codón de inicio y la presencia de algunos codones de parada dentro de la secuencia codificante. Resultados que pueden deberse o bien a un error en la secuencia reportada en las bases de datos, o a

que este gen en esta especie sufra edición a lo largo del mismo. Aún así, se obtuvo un porcentaje de identidad del 84,4 – 84,9 % al comparar con el género *Leishmania* y del 71,6 – 76,9% al comparar con el resto de tripanosomátidos. Indicando estos resultados una fuerte conservación de este gen en las diferentes especies de tripanosomátidos analizados.

Secuencia pre-editada de la proteína ND3: conocida también como región G5, en los diferentes tripanosomátidos estudiados, esta secuencia se caracteriza por sufrir “pan-editing” (11, 22, 34). De acuerdo a lo anterior, al comparar la secuencia pre-editada de *L. braziliensis* con las respectivas de las distintas especies del género, se observó una identidad máxima con *L. amazonensis* de 67,8% y de 30-55% con otros tripanosomátidos (Tabla 3).

Secuencia pre-editada de la proteína RPS12: anteriormente conocida como región G6, esta secuencia también presenta edición a lo largo de la misma (11, 22) y utiliza como codón de inicio la tripleta no canónica AUU, creada



durante el proceso de edición. Para *L. braziliensis*, se observaron porcentajes de identidad para la secuencia preditada de 70,2 - 71,8% con las otras especies de este parásito, mientras que para las otras especies de tripanosomátidos se obtuvieron porcentajes de identidad que variaron entre 40,2 y 42,1%. (**Tabla 3**).

Secuencia pre-editada de la proteína ND5: diferentes reportes indican que esta secuencia génica no sufre ningún proceso de edición (17, 22). Al comparar con la secuencia obtenida de *L. braziliensis*, se observó un alto grado de identidad con las secuencias reportadas para los otros tripanosomátidos estudiados variando de 74,1 a 83,7% (**Tabla 3**). Resultados que indican un alto grado de conservación de esta secuencia en este grupo de parásitos. Por otra parte, en la secuencia de *L. braziliensis* se observó la falta del codón de inicio. Sin embargo, al eliminar dos timinas ubicadas en las posiciones 2 y 3 del marco de lectura abierto, se obtuvo una secuencia de 590 aa., con un 79,8% de identidad con la secuencia de aa de la proteína de *L. tarentolae* (datos no mostrados), por tanto es posible que en *L. braziliensis* estas posiciones sean editadas, aunque no se puede descartar que se deban a algún artefacto de secuenciación.

ARN guías

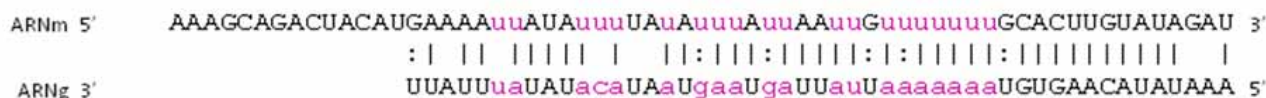
Se encontraron cinco ARNg, el primero corresponde a un ARNg homólogo al gM150 descrito en *L. tarentolae* el cual fue descubierto como parte de una edición errónea y su papel en la edición es aún desconocido (38). El segundo y tercero son los denominados gND7-II y gND7-I respectivamente, que como sus nombres lo indican, en *L. tarentolae* son los dos ARNg que participan en la edición del ARNm codificante para la subunidad ND7 (31). La modelación *in silico* del apareamiento de las bases entre el ARNg ND7-II y

la respectiva región a guiar en el proceso de edición del ARNm de *ND7*, apoya la existencia del patrón de edición anteriormente sugerido (**Figura 7A**). Se encontró también el ARNg CyB-II que en *L. tarentolae* se ha visto es el segundo ARNg que participa en la edición del ARNm que codifica para la proteína CyB (31). Similar a lo encontrado para gND7, al modelar *in silico* la unión de este ARN con su respectivo ARNm, se evidenció claramente la región a guiar (**Figura 7B**). Llamativamente, para este ARNg en *L. braziliensis*, la región codificante inicia en el extremo 3' del gen que codifica para el 9S (**Figura 2**), al igual que para *L. tarentolae*. Sin embargo, en *L. major* estas regiones codificantes no se sobrelapan pero tampoco existe una región intergénica que las separe (21). Con relación al ARNg respectivo de *L. donovani*, este gen se ubica en la hebra sentido a diferencia de las otras especies. Por último, se encontró el gMURF2-II, que como su nombre lo indica participa en la edición del marco de lectura abierto MURF2. Como se puede observar en la **Tabla 4** las secuencias de todos los ARNg se conservan entre 52,7 – 83,7% en relación a otras especies del parásito y entre 45,3 - 65,4% al comparar con otros tripanosomátidos. Resultados que apoyan un patrón de edición compartido por distintas especies del género *Leishmania* y más disímil al compararse entre miembros de la familia *Trypanosomatidae*.

ARN ribosomales

Dentro de la secuencia del maxicírculo se encontraron los ARNr 12S y 9S, de los cuales se conoce que en otras especies del parásito participan en la síntesis proteica que tiene lugar en la única mitocondria de estos kinetopláستidos (4, 19). Estos ARN son muy similares en cuanto a tamaño y ubicación en las distintas especies analizadas (**Tabla 2**); presentando incluso identidades en su secuencia entre 88,7

A.



B.

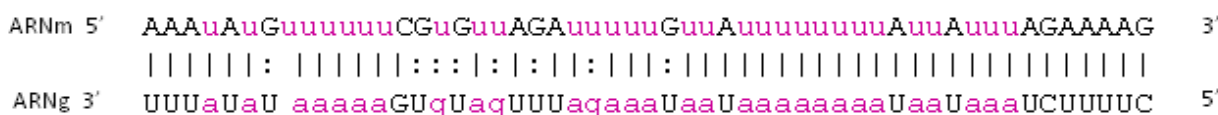


Figura 7. Representación del apareamiento de los ARNg presentes en el maxicírculo de *L. braziliensis* con las regiones a editar en el ARNm. **A.** gND7-II. **B.** gCyb-II. La adición de uridinas se representan con u, los nucleótidos de adenosina y guanosina que guían las ediciones se representan con a y g. Los apareamientos de pares de bases estándar se representan con líneas sólidas, el apareamiento G-U se representa con dos puntos.

Tabla 4. Porcentaje de identidad de los ARN del maxicírculo de *L. braziliensis*, comparados con otras especies de tripanosomátidos.

ESPECIE	ARN						
	12S ARNr	9S ARNr	ARNg	gND7-II	gCyB-II	gMURF2-II	gND7-I
<i>L. tarentolae</i>	88,7	92,5	83,7	73,9	79,2	78,2	62,1
<i>L. donovani</i>	—	92	—	—	67,9	53,6	51,7
<i>L. amazonensis</i>	—	92,7	—	—	52,7	—	—
<i>L. major</i>	—	91,4	—	—	83%	—	—
<i>T. cruzi</i> CL Brener	78,5	81,3	64,7	60	63	40,9	62,5
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	77,9	81,7	62	60,8	59	35,3	45,2
<i>T. brucei</i>	77,7	82,2	65,4	53,1	64,2	66,7	48,5
<i>C. fasciculata</i>	80,7	81,9	—	—	—	—	—
<i>P. serpens</i>	77,8	77,7	55,1	62,2	45,3	77,8	—

y 92,5% (Tabla 4). Al comparar con otros tripanosomátidos, si bien el ARNr 9S prácticamente conserva su tamaño, los porcentajes de identidad disminuyen a 77,7 – 82,2% (Tablas 2 y 4). Por su parte, el ARNr 12S presenta variabilidad tanto en su tamaño, con un rango del 1141 – 1173 nucleótidos (Tabla 2), como en su secuencia, con un porcentaje de identidad de 77,7 a 80,7% (Tabla 4).

Regiones intergénicas

Como se observa en la tabla 5 se identificaron 5 regiones intergénicas que separan las secuencias codificantes de 12S y 9S, 9S y ND8, ND7 y COIII, COIII y CyB y RPS12 y ND5 para todas las especies de tripanosomátidos analizadas,

observándose que en general son regiones cortas con un promedio de 34 – 94 nt con variaciones en tamaño entre las distintas especies del género de 19 – 130 nt. Tamaños que pueden obedecer a la necesidad de tener un genoma compacto; a diferencia de los genes nucleares en donde se observan regiones intergénicas extensas dada la necesidad de codificar en las mismas los elementos implicados en la regulación de la expresión espacio – temporal (39). Finalmente, a diferencia de la elevada conservación de las secuencias pre-editadas tanto en secuencia como en longitud, estas regiones presentan una mayor variabilidad, resultado de esperarse teniendo en cuenta que en líneas generales, la presión evolutiva actúa preferencialmente en las regiones codificantes y secuencias regulatorias de los genomas.

Tabla 5. Características de las regiones intergénicas presentes en el maxicírculo de *L. braziliensis* comparadas con las encontradas en otros tripanosomátidos.

Regiones Intergénicas		ESPECIES									
		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i>	<i>T. cruzi</i> CL Brener	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	<i>T. brucei</i>	<i>P. serpens</i>	<i>C. fasciculata</i>
12S ARNr-9S ARNr	Posición	1660-1707	1611-1638	830-848	1113-1140	329-354	5868-5905	5904-5946	2513-2541	1369-1387	1154-1201
	Tamaño(nt)	48	28	19	28	26	38	43	29	19	48
9S ARNr-ND8	Posición	2320-2412	2250-2379	1459-1514	1751-1842	966-1089	6513-6560	6555-6606	3153-3161	1997-2055	—
	Tamaño(nt)	94	130	56	92	124	44	52	9	59	—
ND7-COIII	Posición	4514-4566	4459-4510	3647-3673	3947-3990	3121-3147	8318-8383	8368-8434	—	—	1869-2330
	Tamaño(nt)	53	52	27	44	27	66	67	—	—	462
COIII-CyB	Posición	5424-5457	5363-5402	4550-4567	4844-4882	4009-4043	8807-8880	8860-8916	5207-5274	—	3195-3242
	Tamaño(nt)	34	40	18	39	35	74	57	68	—	48
RPS12-ND5	Posición	2238-2248	—	14918-14945	—	••	18254-18273	18066-18084	14482-14489	10247-10258	—
	Tamaño(nt)	11	—	28	—	••	20	19	8	12	—

Conclusiones

A pesar de ser *L. braziliensis* la especie más divergente del género *Leishmania* en cuanto a su genoma nuclear, el maxicírculo presenta una elevada conservación de su secuencia, la cual incluso aumenta a nivel de aminoácidos, luego del proceso de edición del ARNm. Resultado que indica la conservación en la función de sus genes. Adicionalmente, los resultados de este trabajo señalan que el patrón de edición presente en las diferentes especies del parásito hasta ahora estudiadas se extiende al subgénero *Viannia*, sugiriendo un patrón común de edición a nivel de género.

Financiación

Este trabajo fue financiado con recursos del Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación-Colciencias, Proyecto 146-2007. Paola Andrea Nocua Martínez fue financiada por el Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores y la Pontifica Universidad Javeriana, convocatoria 2009.

Conflicto de intereses

Los autores afirman no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S. Leishmaniasis cutánea en Colombia y género. *Cadernos de Saúde Pública* 2001; **17**, 171-180.
- WHO. Leishmaniasis home. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Consultado el 16 de octubre de 2010.
- Shalomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Current Molecular Medicine* 2004; **4** (6): 623-647.
- Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. *International Review of Cytology* 1986; **99**, 119-179.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annual Review of Microbiology* 1987; **41**, 363-382.
- Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an probable structure. *Eukaryotic Cell* 2002; **1** (44): 495-502.
- Muhich ML, Neckelmann N, Simpson L. The divergent region of the *Leishmania tarentolae* kinetoplast maxicircle DNA contains a diverse set of repetitive sequences. *Nucleic Acids Research* 1985; **13** (9): 3241-3260.
- Flegontov PN, Guo Q, Ren L, Strelkova VM. Conserved repeats in the kinetoplast maxicircle divergent region of *Leishmania* sp. and *Leptomonas seymouri*. *Molecular Genetics & Genomics* 2006; **276**, 322-333.
- Bhat GJ, Koslowsky DJ, Feagin JE, Smiley BL, Stuart K. An extensively edited mitochondrial transcript in kinetoplastids encodes a protein homologous to ATPase subunit 6. *Cell* 1990; **61** (5): 885-894.
- De la Cruz FV, Neckelmann N, Simpson L. Sequence of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *The Journal of Biological Chemistry* 1984; **259** (24): 15136-15147.
- Neboháňová M, Kim CE, Simpson L, Maslov D. RNA editing and mitochondrial activity in promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani*. *International Journal for Parasitology* 2009; **39**, 635-644.
- Shaw JM, Feagin JE, Stuart K, Simpson L. Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell* 1998; **6** (53): 401-411.
- Estévez AM, Simpson L. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria - a review. *Gene* 1999; **240**, 247-260.
- Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trend in Biochemical Sciences* 2005; **30** (2): 97-105.
- Cruz-Reyes J, Sollner-Webb B. Trypanosome U-deletional RNA editing involves guide RNA-directed endonuclease cleavage, terminal U exonuclease, and RNA ligase activities. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*. 1996; **93** (17): 8901-8906.
- Lukeš J, Hashimi H, Zíková A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current Genetics* 2005; **48** (5): 277-299.
- Eperon IC, Janssen JW, Hoeijmakers JH, Borst P. The major transcripts of the kinetoplast DNA of *Trypanosoma brucei* are very small ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research* 1983; **1** (1):105-125.
- Benne R, De Vries BF, Van den Burg J, Klaver B. The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxi-circle DNA that contains the gene for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames. *Nucleic Acids Research* 1983; **11** (20): 6925-6941.
- Sloof P, Van den Burg J, Voogd A, Benne R, Agostinelli M, Borst P, Gutell R, Noller H. Further characteriza-

- tion of the extremely small mitochondrial ribosomal RNAs from trypanosomes: a detailed comparison of the 9S and 12S RNAs from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* with rRNAs from other organisms. *Nucleic Acids Research* 1985; **13** (11): 4171-4190.
20. Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BioMed Central Genomics* 2006; **7** (60): 1-18.
21. Yatawara L, Le TH, Wickramasinghe S, Agatsuma T. Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. *Gene* 2008; **424** (1-2): 80-86.
22. Maslov DA. Complete set of mitochondrial pan-edited mRNAs in *Leishmania mexicana amazonensis* LV78. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2010; **173** (2): 107-114.
23. Sloof P, van den Burg J, Voogd A, Benne R. The nucleotide sequence of a 3.2 kb segment of mitochondrial maxicircle DNA from *Crithidia fasciculata* containing(mal separada en galeradas) the gene for cytochrome oxidase subunit III, the N-terminal part of the apocytochrome b gene and a possible frameshift gene; further evidence for the use of unusual initiator triplets in trypanosome mitochondria. *Nucleic Acids Research* 1987; **15** (1): 51-65.
24. van der Spek H, Arts GJ, Zwaal RR, van den Burg J, Sloof P, Benne R. Conserved genes encode guide RNAs in mitochondria of *Crithidia fasciculata*. *The EMBO Journal* 1991; **10** (5):1217-1224.
25. Maslov DA, Hollar L, Haghighat P, Nawathean P. Demonstration of mRNA editing and localization of guide RNA genes in kinetoplast-mitochondria of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998; **93** (2): 225-236.
26. Maslov DA, Nawathean P, Scheel J. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999; **99** (2): 207-21.
27. Requena JM, López MC, Jimenez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C. A head-to-tail tandem organization of *hsp70* genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research* 1988; **16** (4): 1393-1406.
28. Sambrook J, Rusell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. Cold spring Harbor Laboratory press. New York, USA. 2001, Tomo 3, 6.41 p.
29. Ramírez C, Puerta C, Requena JM. Evidence of RNA editing in *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Parasitology Research* 2010; **108**: 731-739.
30. Simpson L, Wang S, Thiemann OH, Alfonzo JD, Maslov DA, Avila HA. U-insertion/deletion edited sequence database. *Nucleic Acids Research* 1998; **26** (1): 170-176
31. Blum B, Bakalara N, Simpson L. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 1990; **60** (2): 189-198.
32. Gao GG, Kapushoc ST, Simpson AM, Thiemann OH, Simpson L. Guide RNAs of the recently isolated LEM125 strain of *Leishmania tarentolae*: an unexpected complexity. *RNA* 2001; **7**, 1335-1347.
33. Okimoto R, Macfarlane JL, Wolstenholme DR. Evidence for the frequent use of TTG as the translation initiation codon of mitochondrial protein genes in the nematodes, *Ascaris suum* and *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research* 1990; **18** (20): 6113-6118.
34. Corell RA, Myler P, Stuart K. *Trypanosoma brucei* mitochondrial CR4 gene encodes an extensively edited mRNA with completely edited sequence only in bloodstream forms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1994; **64** (1): 65-74.
35. Read LK, Wilson KD, Myler PJ, Stuart K. Editing of *Trypanosoma brucei* maxicircle CR5 mRNA generates variable carboxy terminal predicted protein sequences. *Nucleic Acids Research* 1994; **22** (8):1489-1495.
36. Shaw JM, Feagin JE, Stuart K, Simpson L. Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell* 1988; **53** (3): 401-411.
37. Feagin JE, Shaw JM, Simpson L, Stuart K. Creation of AUG initiation codons by addition of uridines within cytochrome b transcripts of kinetoplastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1988; **85** (2): 539-543.
38. Sturm NR, Maslov DA, Blum B, Simpson L. Generation of unexpected editing patterns in *Leishmania tarentolae* mitochondrial mRNAs: misediting produced by misguiding. *Cell* 1992; **70** (3): 469-476.
39. Holzer TR, Mishra KK, LeBowitz JH, Forney JD. Coordinate regulation of a family of promastigote enriched mRNAs by the 3' UTR PRE element in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; **157** (1): 54-64.

Material Suplementario 1

5'GATCATGACCAAGATGTACCAGAGAGGTTTCGGG
 AATCAGCGATTTTGATTGGGGGAACGGAGCCGTCGA
 GGAAATGCCCTAGAGCTTTAGAGCGGGAGAAGAGT
 TTTGGATCGACTGAAGAAAAGATCGTTTTCGGAAGG
 GGAGCAGGTCCAACCTTTTGATTCTTTGCTAATCA
 CATCATGTTTTGTTTTATTTTGTGTTTTGGTTGCCA
 TGTATTTATGTGCACCATATATTTGTTTTATTTGGTT
 GTTGTTTTATGTTATTTGATTTTTATTTGTGTTTTGTT
 TAATTATTATACGAGTATTTTTTTATATTTTTTATGT
 AGTTTGCTTTAACAATAAAAAAGAAATTTAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAGAATTCGG 3'

Material suplementario 1. Localización en el inserto del clon pLb70-3U-600D (ADNc parcialmente editado del gen ND8 de *L. braziliensis*, número de acceso FR686353 del EMBL-EBI/GenBank) del fragmento del gen ND8 utilizado como sonda en los ensayos de Southern blot. El fragmento fue amplificado utilizando los iniciadores Lb1824 y LbND8-R, los cuales se indican en negrita y subrayado, respectivamente. En gris se señala la región de 155 nts correspondiente al extremo 5' no editado del gen.

Material Suplementario 2**2A.**

Tamaño: 6535 pb. ADN circular

DEFINICIÓN: ADN mitocondrial del maxicírculo pre-editado de *Leishmania braziliensis*.

FUENTE: Mitocondria *Leishmania braziliensis* cepa MHOM-BR-75-M2904

CARACTERÍSTICAS: Localización

ARNg Cadena complementaria (114..162)
 Homólogo al ARN guía gM150 de función desconocida, descrito en *L. tarentolae*

ARNg	Cadena complementaria (398..446) ARN guía II para el ARNm de la sub-unidad 7 de la NADH deshidrogenasa; gND7-II
ARNr	488..1659 12S ARN ribosomal; 12S ARNr
ARNr	1708..2319 9S ARN ribosomal; 9S ARNr
ARNg	2309..2361 ARN guía II para el ARNm del Citocromo b; gCyb-II
ND8	2414..2683 Gen de la sub-unidad 8 de la NADH deshidrogenasa; pre-editado
ND9	Cadena complementaria (2726..3072) Gen de la sub-unidad 9 de la NADH deshidrogenasa; pre-editado
MURF5	Cadena complementaria (3034..3331) Región pre-editada de MURF5
ND7	3370..4513 Gen de la sub-unidad 7 de la NADH deshidrogenasa; pre-editado
COIII	4573..5423 Gen de la sub-unidad 3 de la Citocromo oxidasa;pre-editado
CyB	5458..6535 Gen del Citocromo b; pre-editado

ORIGEN

1 TGTTTTTTAA ATTAATTATG TATTTACTAC TAAATTTTAA TTAGTGTTTT TAATTATTTA TAAAATAATC AAAAACCACA AAAATTTATA
 91 TAGAATAAAT TTATGTAATA TAAAAAATTT TGTATTGTAT ATAATTTAAA TTTTATTGTT TGGTTGTTTT ATATAATTAT TTTATATTGT
 181 AAAGTTTATT TTTAAATTGT ATTTATGTAA TATAATTTTA ATACAAATTT TATTTAAAGG ATATTAAGAA TAAATGTAT TTTAACTAT
 271 GATCAATAAA ATATAAAAAA ATTTGTTTAT AATATATTAA TTTTGTACTT TTAAATAGA GAGTTTTAAA AAGTAATAAA ATATATTTTG
 361 AATATTATTT AATTAAAAAT AATAAAAAAG AAGTAAAAAT AATATATGTT ATTACTTACT AATAATTTTT TTACACTTGT ATATTTTGT
 451 ATTATTATTA TTATTTTATA TAAAGTAATA AATAGTAAAT AAATCAAAAT ATTTAAATAA ATAATATTGA TTTAAATTTT GTTTTATTAT
 541 TTAATTACAT TTTTGAATTA AAATTTTATT ATTAATATTT AATAATTAAT AATATTATAT ATTTTAAATT TAAATTTGTT GTTTTATATT
 631 TAGTTTTTAA TTTAAATAGT AATTAAATTA ATAATTTTAA TTTAAATTTT TACGAAGTGT AATTTATAGT TTATTATTTA TAGTTTAAAG
 721 TTTAAATATT TAACTAGTGA AGGCACAGTT GTTCTATATG TATCAGTAAA AAATAGTAAA ATTATTTTAA TTTAAATTAAT AAATAATTAT
 811 TAACAAAAAT TATAATTAAT ATTATGACAA ATTTAAAAAT TAAATATTTT TTCTAATATT ATTTAATAAT TAAGGAATTA TTTAAATTGA
 901 ATATTAAAAA TACGAATTTA ATTTGTAATT AATAGTTTTT ATTGAAATAA AAGTATAGAT TTATAATATT ATTTAAATTTA ATTATTTTAA
 991 TATTTAATAT TTGTTTATTA AAAAGTAACT TTATTGAAAT ATAAAGAATT ATTATTATTA TTATTATTTT AAAAATATAA AAATATTGTT

1081 AATAAAATTA TCAAGTTTCA AAAGCGTTTA TTAAATGCGT TAGTCTAAGT ATTATATTTA AGATTATCT TGTATATAGA TTTTATTTT
 1171 AATAATCCTA TATAATTAA AATTATCCTT AATTATATT CATTAGTAGC ATAGTAATTT GTTAACTAAT TATTAAAGCG TTCCATAGAA
 1261 AATTTTAAAA TTAACAAT CTAAATAATT AATAAATTAA AATAAAATTT TTAACAAAAA TTAACAAAT AAAATAGGGC AAGTCTACT
 1351 CTCCTTTACA AAGAGAACAT TTATATGTAT TTGTATGTTT GATTGGGGCA ATACTATATC TATTTATATA GAAAAAGAAC TATAATTATT
 1441 GAAATAATAA AAGGTTCGAG CAGGTTAACA AGCATTAAATA ATAAATGTGT TTCATCGTCT ACTTATTGCT AATTAAATTT GATTGTTTAT
 1531 CAAAAATGCA ATTCGTTAGT TGGGTAAAA TCGTTGTAAA GCAGATTTGT TTATATATTT AATTTTATA TATCATTAATA AATTAATATC
 1621 AGTACGCAAG GATCTATTAT TTGTTATTTT ATTTTATTTT ATTTTATTTT ATTTTATTTT ATTTTATTTT ATTTTAAAAA ATATTAAAG
 1711 TCAATTGTTA TTATTCATAT TAATTTTTTT AAAAGTTTTT TAATTTTATA TTAGTTTATT TGATTTAAAA AGATAAATGT ATTTTCAAAT
 1801 TTTAGGAATA GTTAATAATA ATTTATAATT CTGATTAGAT TTTTTTGTTA ATGCTATTAA AGGGGTGTGG AAAAGTAAT AAATTTTATA
 1891 TAAATAAATA TAATAAATTA AATTAAATTA TTAGTCAGAA ATGGATGCCA GCCGTTGCGG TAATTTCTAT GCTTTTAAAT ATTATACATT
 1981 TATTTTATAA ATTTGTTACT GAATTAATTT TAGTCAATAA AAAAATATAT TTTTTTTATT TGTTTTTATA CACCATATGG TATATGCAAA
 2071 TAAATAATGC TATTAATTAT TAATTATATT ATATTATATT TATTCATTTA AGTCGACAAT ATCTATTAT TGTTTTGTAC AACATGATAA
 2161 GGATTATAAA TGAAATTGTA AATTTTATAA TCAAAATTA TTTATTATAT TAAATTAGCA TGTTTAGATA AAACAATAAA TTTAGAAGGT
 2251 ATTGTTGCCC ACCATTCTTT GTAATAAAGA CAACGTGCAG TAATTAATAT ATTTATAAAA ATATATTTT CCACATCAAA TCTTTATTAT
 2341 TTTTTTTATT ATTTAGAACT TAATTAGTTT ATAATTTTAT TGTTTTTAAAT AATTATATGT AAAAGAGAGT TTTTTCGGAA GGAGGGATT
 2431 TTCGACCAG GAGAACCAGA GAGGTTTCGG GAATCAGCGA TTTTGATTGG GGAACGGAG CCGTCGAGGA AATGCCCTAG AGCTTTAGAG
 2521 CGGGAGAAGA GTTTTGGATC GACTGAAGAA AAGATCGTTT TCGGAAGGGG AGCAGGTCCA ACCTTTTGAT TTCTTTGCTA ATCACACAGG
 2611 AGGGGGCCAG AAGTTTGCAT TTCCAAAGTA GTTTTTTGGG AGATTTTTTT TGAAGGAAA AATTTTCGAG AAATTTTTAT GAGTTTGCTT
 2701 TAACAATAAA AAAGAAATTT TAATTATCGA AAACTTTTA AAAATAAAT AAAAAATAAT TTTTTTGCAA ATTGAAATTT CCCAAAAAT
 2791 GCGGCTCCCT TCTCCCCCTC TAAATTTATT CCCAAATGGT TTTCTCCCT CAAAAATCCT CGGTGCTCT TCCCTCCCAA AATCCTAATC
 2881 CGTTCAATCT CGCTCTCTCT CCCCTCTTTC CTTACTCGCT TTCTAAAACT AAATAATCTC GCCCCAAAAA CTCTCTCTCT TCTCTAGTCT
 2971 TTTCTCAAAA CTCCCTTCAA AAAACTCTCC CTCAATCTC TCCTCTCTT TCAAAACCGA AAACCTTACA TCTTTTTTAT ATAGATTATA
 3061 ATAAATTTAA ATGTTTGATA TAATTAAATA TTCTAAATTA TTTAATAATA TTAACAAATGA ATATTTTATT AAAATGATAT TAATATGTAT
 3151 TATATTTAAT CATAATAAAA TTCCATTAA ATTAAGTAT ATTGTATTGT AAATATCAAT ACAGTGTAGA GTGTTAAAAA ATTTATTTAT
 3241 TTTATTTAAA AAATAAAAT TCTTTTATG TAATTTATAT GTAAACATTT TTAATTTTA ATATAATTA CAAATTTAA GTTTAAAAAT
 3331 ATTAAGAAAT ATTAACTTAT CAAAGCAGAC TACATGAAA ATATAAAAAG GCATTGTAT AGATTACAT TTGGTCCACA ACATCCTGCA
 3421 GCTCATGGTG TATTATGTTG TTTATTGTAT CTTTCAGGTG AGTTTATAAT GTATATAGAT GTTATTATAG GATATTACA CCGTGGCACA
 3511 GAAAGTTAT GTGAATATAA AACAGTTGAA CAGTGTTTAC CGATGAAGAT TGGATTATGT TAGTGTGTT TGTATGAAC ATTTGTTGTC
 3601 ATTATGTTTT GAATATATGT TACGATGCTG TTTAGCAATA CGTTGTGCAT TTATGCGTTT ATTGATGTGT GAATTTACAC GATGCTTTAA
 3691 TGGCTTATTA TGTGTTCTT GCATGGTTAT GGATATAGGA TCATTATCAC CTATGTTATG ATCATTGAA GAGCGTGATA AATTAATGAC
 3781 ATTTTTTGAT TTGTGTTGTG GTGTAGAAT GCATTTAGCA TTTATGTGTT TATTAGGTTT ATTAGATGAT TTTGTATTG GATTGTTGA
 3871 TTTTTTATTA ATGTTATGTA TTTCATGTTT ATTTGTATTA GATTGTATG ATTTGCTTTT TATTGGAAT AGATTTTTAT ATTTACGTTT
 3961 GCGTGGACTT GCTTTTTTTG ATGTTTTTGA TTTATGCTTT AATAGTATTA GTGGTTGTTT ATCAAGATCA TTGGGTATGG TTTGAGATGT
 4051 GAGATTATAT AGTAGTTATG AATTATATTT TATATTAGTG TTTGATTATT GTTTTTGTTA TTTAGGTGAT GCTTTTGACA GATTTTTTTT
 4141 AAGACTTTTT GATATGCGTA TGAGTATACT TTTATGTAAA CAATGTTTTT TTATAGGTTT TTTGTATTTT GGATTTGTTT GTTTGTTTGA
 4231 TTATATGTAT GTTGATATAA CAATAGAGAC AATTATAAGT TTATTTTATA GTTTATGATG TTGTATTTTA CCAGTTGTTT CATTTGCTAA
 4321 TGTGAACAT CCAAAGGAG AGTATAGTAT ATTTTATGT TTTTATATG GATTTATATC AAGACTACGT ATTAGATGTG CAGACTTTAT
 4411 ACATATTTGT TTATTAGATG TGATGATGCG AGGATTCATG ATTCATGATT TAGTTGCTGT TATTGGTAAT GTTGATGTTG TTTTGGATC
 4501 AGTTGATCGA TAGGAATTA GTTTTTCAA CTTTAAAAA TAATTTTAAA TTAAATTTA TTAACAAAGG TTTTCCGGAA GGGGTGATT
 4591 TGTTTGTGTT TGTGTTGCT ACTTTACCTG CTATCTGTAT TACATATTTA GCATTTGTG TATGTAGTTT ATTTGTATT ATGTTTAGTA
 4681 GTTTTATATT TATTGATTAT TGTTTTATTT GTTTTTTGC ATGTTTATTA TTTTGTTTAA TTTGTTTAA ATGCGATTTA TTTGTTGATA
 4771 CATTAAGAGG TTTATTGAT ATATGTTGTT TAATTAGATG TATTCATAT TGTTTTGTAT GATTTATATT AAGTGAATTA TTTCTTTTTT
 4861 TATCGTTATT TTATGTTGTA TTTAGTTTAA TTTTATTTGT TAGTGTGAA TTTGCTTTTA TATTTGTTAT TCCAATAATG TTTAGTTGTT
 4951 TAATTTGTGA TTTTGGTTTT GTATTTTATT GATATTTTAT AGATGTTTTT AATTTATTA TTAATACTTT TTTATTTT GTAGCGGAT
 5041 TATTTATAAA TTTTGTTTTA TTTTATTTT GATTACGTT TTTTTTGTGT GTTTTATTTA TGTATGAAT AGGAATTTTA TTTGTTTTT
 5131 TATTTTATG AAATCAAGTT TGAGAGTTT CTTTATTATT AGTAACATGT AGTTGTGTA TATTGGGTC AATACTTTTT TTAATTGATC

5221 TTTTACATTT TAGTCACGTG TTTTtaggta TTTTTTgTT ATTTATTTGC TTTAGCCGTT GCTTTAATTT TTTAAGTATG GATACACGTT
5311 TTGTTTTTTT ATATGTGGTA TGTTTATATT GACATTTTGT AGATTGTGTT TGATTTTTTTT TATTACGGTT TGTATATTTT GATGTATTAA
5401 ATGTAGTGTA TTTATGTATA TAAAAAGTA AGTATTTTta CATATATTTA AAATTATAAG CGGAGAGAAA AGAAAAGGCT TAACTTCAGG
5491 TTGTTTATTG CGAATTTATG GTGTAGGTTT TAGTTTAGGT TTTTTATTT GTATGCAAAT AATATGTGGT GTTTGTTTAG CATGATTATT
5581 TTTTAGTTGT TTTATTTGTA CTAATTGATA TTTGTTTTTA TTTTGTGAG ATTTTGATT AGGTTTGTG ATAAGAAGTA CACATATTG
5671 TTTTACATCA TTACTATTTT TTCTTCTTTA TGTCATATA TTTAAAAGTA TAGTATTAAT AATATTATTT GATACTCATA TTTTAGTTTG
5761 AATTATAGGT TTTATTTAT ATATATTTAT AGTAATAATA GGTTTTATTG GTTATGTATT GCCATGTACA ATGATGTCGT ATTGAGGATT
5851 AACAGTTTTT AGTAATATTT TAGCTACTGT GCCAGTTATT GGTGTTTGAT TATGTTATTG AATTTGAGGA AGTGAATATA TAAATGATT
5941 TACTTTACTT AAATTACATG TTTTACATGT TTTACTACCT TTTATTTTAT TAATAATAAT TTTTATGCAT TTATTTGTG TACATTATTT
6031 TATGAGTTCT GATGGTTTTT GTGATAGATT TGCATTTTAT TGTGAGCGGC TATGTTTTTG TATGTGATTT TATTTAAGAG ATATGTTTTT
6121 AGCATTTTTA ATATTATTTT TTGTAGTGTA TTTTATATTT ATAAATTGAT ATTTTGTGTT TCATGAGGAG TCATGAGTAA TAGTAGACAC
6211 ATTAAAACT TCTGATAAAA TTTTACCTGA ATGGTTTTTT TTATTTTTAT TTGGTTTTTT AAAAGCAGTA CCTGATAAAT TTACTGGTTT
6301 ATTATTAATG GTTATATTAT TATTTTCATT GTTTTATTT ATATTAAAT GTATATTATG ATTTGTTTAT TGTCGAAGTT CGTTATTATG
6391 ATTTACTTAT TCATTAATTT TATTTTATAG TATATTTATG AGTGGCTTTT TAGCTTTATA CGTTATATTA GCTTATCTA TTTGAATGGA
6481 GTTACAATTT TGAGTATTAA TTTTATTTAT GTTAATAGTA TGTAGATTAG ATTAG

2B		ND4	506..1823
Tamaño:	4257 pb. ADN circular		Gen de la sub-unidad 4 de la NADH deshidrogenasa; pre-editado
DEFINICIÓN:	ADN mitocondrial del maxicírculo pre-editado de <i>Leishmania braziliensis</i> .	ND3	Cadena complementaria (1858..3072) Gen de la sub-unidad 4 de la NADH deshidrogenasa; pre-editado. También llamado G5
FUENTE:	Mitocondria <i>Leishmania braziliensis</i> cepa MHOM-BR-75-M2904		
		RPS12	Cadena complementaria (2027..2206) Gen de la proteína ribosomal S12
CARACTERÍSTICAS: Localización			
G4	Cadena complementaria (255..405) Región 4 rica en guaninas	ND5	2249..4023 Gen de la sub-unidad 5 de la NADH deshidrogenasa pre-editado
ARNg	Cadena complementaria (451..505) ARN guía II para el ARNm del marco de lectura abierto MURF2	gND7	Cadena complementaria (4168..4196) ARN guía I para el ARNm de la sub-unidad 7 de la NADH deshidrogenasa; gND7-I

ORIGEN

1 CAAAAATCAT TATAAGTCCA TGTGAAGTGA TTAAACATT ATAAAATTGA TAGTCACCAA ATAAAATACC ACAACCAATA AGTGAAAGTT
91 CTAGTCTAAT AAATAAGAA TATACATATC CAACAAACC AGAAAGTATT GCAACTAAAA GATAACATAA ACCAATCATT TTATGAGATA
181 CACTTAAGCA AACGCACTGT AAAAACCACA TTAATATTAT ATTTAATTGT TAGTTATAAG TTTACAGCTT TTTCGCTCCC GTCTTTTCC
271 CCTTCCTTCT GTTTTCTTCC CTCCACCTCT CTCTCTCCC CTTCCTCCTT TCCTCCTTT TCGAATTCCT TCTCTCTTC CCTCAAACCTA
361 TTCTGCTTT TCCAAAAAGT CTCTCTCTTT TCCCCTTCTC TTCTGTTTT ATTTACTTTA AAAAATTAAT ATAAAAATTA TTATTATTAA
451 TAAAAAATC AGTCAAATA TAAAAATAGA GTTAAATTAA AGTAATTAAA TAAATATTTT GTTTAAGTTT ATAATAATTA TATTAAATTT
541 TTTAATATTA TTTTtagTAA TACTTTTTAT ATTTATAAAT TATAGTTTTT GTTTAGTATT TAAATTTAAT TATATTTATA TAAATATATA
631 TTTAAATTAT ATTAATTTAT GATTATATT TTTTATGGGA TTAATAGTGT ATTTCTTGT TTTTCTTTTA TCACGTAAAA TTATTTTATA
721 TAATAAGTAT TTTTATGTTT TATGTTTATA TTTATTTATT TATTTAGATG TTGTATTAAT TATTCTAATT GATGATTTTA TGTGTTTTAT
811 GATATTATTT GAAAGTTTAT TTTTCCAAAT TTGTTTTGTT AGTTTATTTT TTAATTTCAA TAATAGATTT ATTTTGTCTA TATTTTATTT
901 GATAATATTT AGTTCTTTAA GTTCGATAAT GTGTATTATG ATTTGTATAA TTACTTATAT TTCATTTTAA TATATTTAAT TTACAAAGTT
991 TTATAGATAT TTGATTTTTT GATAGTTTAT ATTTAGGTAT GTATATATGA ATTTTATTTT TTATAATGTT TGCAATAAAA TATCCAATTT

1081 GACCATTACA TGTATGACTT CCTGAAATGC ATGTAGAAGT TAATACTGAA ATGAGTGTAT TATTAGCCAG TATAGTTTAA AAAATTGGTT
1171 TTTTGGGAAT ATATAAATTT TTATTTGTAT GTTTTAGCCA ACTTCAATC TGATTTTATG GTTTTATGA TTCATTAATT ATGTTAGGAT
1261 TAACTTTTTT AGCATTAAACA TTATTGTTTT TAAGTGATTA TAAAAAATTT ATTGCAAACT GATCAGTAAT ACATACAGGA ATCGCATTGA
1351 TATTGTTATG ACATAATGAT ATTCTTTTTA TAGGTATACT TATATTATGT AATTTATCTC ATATTATTAG TTCATCTTTT ATGTTTATTT
1441 TAGTAGGCTA TATGTATGAC AATTATGGTG TACGTATATT TTTATTAATG ATTTCTTTTT TTGGTATAAG TGTATGAAGT TCGTTATTTT
1531 TAGGTTTATT TTTATTTAAT ATAGATTTC CATTATGAT ATTATTTTAT GTAGATATAT TTTTGTATA TGGTTTAATT TCATTATCAT
1621 TTATTATAT TTTTGTTTTT TATATAATAG TGTATCAAT TTTTATCT TCAATATATA TATATATATG TTTAAGTTTT TATTCGTTCA
1711 TATGAATAGA TAAATATTTA CGTTTAGATT TATCAATTAA TGATATATAT TTATATTTTA TAACTATTTT AATGGTTACT TTATTTTTTT
1801 ATTTAATTTA TTTATATTTT TAAAGTTTGA ATTGAATATT ATTTTATTTT TCCAAGTACC AGTCTTTTAC AAATCCCTTT TCCCTTTTCT
1891 TTCCCTCCCT CTTCCTTAAA GATTTCCTTC CGCGAAACTT CTTAAGTAAC TCCGTGTTCT TCTCCCTGT CCCACCGCTC TGCCCTTCTT
1981 CCCTTTTTTC CAACTAAATC CTAAATTGAA CCATTATTA AGTTTAAAC GTTTTGAATT TTTGAGGAGT ACTGATTAGG AAAAGCCACG
2071 AACCAAGCTC CGGAACCGAC GGAATTGCA AAGAAGAAA GAGAGATTGT GCTTTTTTGG GGACAACAAT TTGAAGGAAT TTTTGGGGG
2161 GAGATTGCC AGGAGAAAGA TTCACGAAT TTTTGTTC GTAAGCTTGT TTATTAATAA AATTATACAA TAAAGATTG AATATAAAAT
2251 TTGTTTTTAT TTTTATTTAT TTTATTTCT ATATTGGAC TTATATGTGG TATATTTATT TTAGGAAGGC ATATAATAAG TTTCTGATTA
2341 TCAATAGTGT TATCTATATC ATTGGTATTA TCTACAAT TTAGTGTCTT TTGTTTAAAGT GTCGTATAT ATGTTTATTA TTTTATGAT
2431 TTTTGTATTA TAATAATTTT AGATTTTGT TTTATTTGAT TGACATTTTA TTGTAATGGA TTTTATATGT TTATATTGTT TTTAATAGAT
2521 ATAGTTTTTT GTTTTATAAA TTTTATGCA TTTTATTATA TGTATTTTGA TATAATGTTA ACTAGGTTTT TTAATATTTT TGGTGAATT
2611 GTGTTGTGTA TGAATTTTTT TATATTATCA TATGATTTT TAACAGCATA CTGTGGTTGA GAATTATTAG GTTTATTTTC ATTTTTTTTA
2701 ATATCATATT TTTGATATAG ATTTTTTTCA TTGAAATATG CATTTAAAGC ATTTTTTATT AGTAAATAG GGGATATTTT GTTACTTTTA
2791 TCATTGTTT TGATTTTTTC AATAAATGGG TATTGTGTAA TAACATTTTA TTTTATCT TTTTATGTG TTGATTATAG TGAATTATT
2881 TTTGCAATGC TTTTATTAAT GATTGTGCG TTTACTAAGT CCACTCAATT TGGATTACAT ATTTGGTTAC CAGATGCAAT GGAAGACCG
2971 ATTCCTGTTT CGGCATTAAT ACATGCAGCT ACGTTGGTAG TTTGTGGTAT ATTATTGATT AGTTTTGTTT TTTGATGTTT TGACTTTTGA
3061 TTGTGTTATT TTTTACTGT AATAGGATGA ACTAGCTTAA TTTTAGTAAT GATGAGTTTA TGTGTGTTTT ATAATTTTGA TGTAAAAAGA
3151 TTTGTGTCAT TTAGTACTAT ATGTCAAAT AGTTTCTTA TGTGTTGTTG TTTATGTTTA GATTATATG TAGGTTGTTT AATATTTTGT
3241 TATCATATGT TTTATAAAGC AACATTATTT ATAGTTTTTG GAGTTTGAAT TCATTTTTTT TTTGGGTTAC AAGATATAAG ATGTTATTTT
3331 TTTACTTATT TTTGTGGTTG TATTTTAGCA AGAATGTTAT TGGTATTTGC ATTATTAAAT TCATGTTTAT TATGATTTT ATGTGGTTTT
3421 TATTGTAAAG ATCTTTTATT ATGTGATTA ATGTTAGTAT CTTTTTTTTT TATATTAGAA TTTTGTGTG TTTGTATATT TTTTATATT
3511 TTTACTATAG TATATAATTA TTTTCTACT TTTTCTTGT GTTTTGTGTT TAAATGTTT TGTTTAGTAG ATACTTTTAT TTTAATTTTT
3601 GATTTTGAGT GTTGTTAAT TTATTGTATA TGTGTTTAT ATATGTGTTT TATAATGCTA TTTTGTGTT TAGATTTTTT ATATGTATTT
3691 ATATTTACAA GTTATTGTTT ATTTTGATCA TTTTATTAT ATTATTTTTC ATTTTGTGAT ATAGCGATAT TTATTACTTT TATAATGTTA
3781 TTATTGAGTT TTATATATTA TGGTTGATTT ATATTTTATT TTTTAAATGT TGATTGTATT ATGTTTTTTT GAAGAATATT TTTAATTTTT
3871 ATGATGGCTT TAGTATTTAG TTTATTTTCA ATATGATATT TTACGTGTTT TTATTCGGAT AGGTTTTTAT GGGTATGAGA TAGGGTTATA
3961 TATATGAGAT ATAGGAACAA GTATTGTGA TTTTGCAGCG TGTTACTATT GTGATACATG TAAAGAAAAT TTTAAGTTGA ATGTATATAA
4051 TTAATTGGTC CTGCTATTA GAAGTATAAA AAGTAAAGA AGTTTGATAT TATTTGAAAA TTTATATTAT CTAGTAACCT CAGGTGTGAT
4141 TGTCAAATTT ATTTTGAAAT GAATGCGGTT ATATGTAAAA TACATAAGAA TTTATTTAAA ATAAAAATTC CAAATCTAAA ATAACAGAAA
4231 ATGATATGAA AAATAAAATA GATATTA

Material Suplementario 2. Descripción de la secuencia parcial reportada para la región del maxicírculo ensamblado de *L. braziliensis*. **A.** Secuencia correspondiente al fragmento ensamblado de 6535 nts. En color se señalan los fragmentos utilizados para la construcción de la secuencia, se ubican desde la posición 1 de la secuencia hacia abajo: [brazil241b09.p1k](#), [brazil226a12.p1k](#), [brazil66e05.q1k](#), [brazil1521b09.p1k](#), [brazil595d07.p1k](#), [brazil1252c02.q1k](#), [brazil700a03.p1k](#), [brazil802h07.q1k](#), [brazil487c05.p1k](#), [brazil982e01.p1k](#) RevComp, [brazil](#)

[81e11.p1ka](#), [brazil251e11.p1k](#), [brazil1081f06.p1k](#), [brazil653a10.p1k](#), [brazil27a07.q1k](#) RevComp, [brazil423g06.q1k](#) RevComp, [brazil20h04.p1k](#), [brazil1133b07.p1k](#) RevComp, [brazil1348c08.q1k](#) RevComp, [brazil281b06.p1k](#) RevComp, [brazil606f10.p1k](#) RevComp, [brazil466g05.q1k](#) RevComp, [brazil621f05.p1k](#) RevComp, [brazil1598g08.q1k](#) RevComp, [brazil555h03.p1k](#) RevComp, [brazil227d04.p1k](#) RevComp, [brazil81e11.q1ka](#) RevComp, [brazil182d06.q1k](#) RevComp, [brazil1432f10.q1k](#) RevComp, [brazil63b03.p1k](#) RevComp, [brazil](#)

75c12.q1k RevComp y AB095966.1 RevComp. **B.** Secuencia correspondiente al fragmento ensamblado de 4257 nts, En color se señalan los fragmentos utilizados para la construcción de la secuencia, se ubican desde la posición 1 hacia abajo: brazil655c08.q1k, brazil483f03.q1k, brazil622d11.p1k RevComp, brazil655c08.p1k RevComp,

brazil483f03.p1k RevComp, brazil484c11.q1k, brazil827b08.p1k RevComp, brazil1043b09.p1k, brazil1043b09.q1k RevComp, brazil1001a09.p1k RevComp, brazil1501c12.q1k RevComp, brazil1501c09.q1k RevComp.