



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Departamento de Parasitología

Tipificación de especies de *Leishmania* de importancia médica basada en el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática



**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autora: Lic. Ana Margarita Montalvo Alvarez

La Habana, 2011

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Departamento de Parasitología

**Tipificación de especies de *Leishmania* de
importancia médica basada en el gen que
codifica para la proteína HSP70
citoplasmática**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autora: Lic. Ana Margarita Montalvo Álvarez

Asesores: Jean-Claude Dujardin Dr.C.

Gert Van der Auwera Dr.C.

Raúl Díaz Rodríguez Dr.C.

La Habana, 2011

ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
IPK	Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
IMT-A	Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
PECET	Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales
HSPs	proteínas de choque térmico (plural)
HSP70	proteína de choque térmico de 70 kDa
HSC70	proteína de choque térmico de 70kDa constitutiva
mHSP70	proteína de choque térmico de 70kDa de la mitocondria
gp63	glicoproteína de 63 kDa
rK39	proteína recombinante de 39kDa
DNA	ácido desoxirribonucleico
rDNA	ácido desoxirribonucleico ribosomal
kDNA	ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
SNPs	sitios polimórficos individuales en una secuencia nucleotídica
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado mediante PCR
MLEE	análisis múltiple de enzimas mediante electroforesis
DAT	ensayo de aglutinación directa
RAPD	amplificación al azar del ADN polimórfico
MLMT	tipificación mediante análisis múltiple de microsatélites
MSMT	tipificación mediante secuenciación múltiple
ITS	espaciadores internos de la transcripción
18S-rRNA	fragmento 18S de la subunidad ribosomal
gp63	gen que codifica la glicoproteína de 63 kDa
hsp70	gen que codifica la proteína de choque térmico de 70kDa
cpb	gen que codifica la cisteino proteinasa B
cytB	gen que codifica para el citocromo B

GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
Kb	kilo bases
G	base guanina
C	base citosina
T	base timina
A	base adenina
R	referido a una base guanina o adenina
Y	referido a una base citosina o timina
ORF	marco de lectura
UTR	región de secuencia no traducida
3'-UTR	región no traducida en el extremo 3'
5'-UTR	región no traducida en el extremo 5'
3'-UTRII	región 3'UTR del gen situada en el extremo 3' del tándem
3'-UTRI	región 3'UTR del gen situada en el extremo 5' del tándem
ATP	adenosina trifosfato
LPG	lipofosfoglicano
Gal NAc	N-acetil galactosamina
G6PD	glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
Th1	células T auxiliaadoras del tipo 1
Th2	células T auxiliaadoras del tipo 2
LC	leishmaniasis cutánea
LM	leishmaniasis mucocutánea
LV	leishmaniasis visceral
Kala-azar	leishmaniasis visceral (como se denomina en la India)
PKDL	leishmaniasis dérmica post kala azar
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
HAART	terapia anti-retroviral de gran actividad
PM	paramomicina, 6-aminosidina
PBS	tampón fosfato salino
TE	solución de Tris-EDTA
TBE	tampón tris-borato-EDTA
dNTPs	mezcla de desoxinucleótidos
BSA	albúmina de suero bovino
DO	densidad óptica
Neighbour Joining	método de programa bioinformático. Unión al vecino
Neighbour-Net	método de programa bioinformático. Unión al vecino para redes
Bootstrap	término utilizado para referir el soporte de los grupos monofiléticos
<i>lai</i>	<i>L. lainsoni</i>
<i>nai</i>	<i>L. naiffi</i>
<i>per</i>	<i>L. peruviana</i>
<i>bra</i>	<i>L. braziliensis</i>
<i>pan</i>	<i>L. panamensis</i>
<i>guy</i>	<i>L. guyanensis</i>

<i>ama</i>	<i>L. amazonensis</i>
<i>mex</i>	<i>L. mexicana</i>
<i>gar</i>	<i>L. garnhami</i>
<i>maj</i>	<i>L. major</i>
<i>arc</i>	<i>L. archibaldi</i>
<i>don</i>	<i>L. donovani</i>
<i>tro</i>	<i>L. tropica</i>
<i>aet</i>	<i>L. aethiopica</i>
<i>inf</i>	<i>L. infantum</i>
<i>cha</i>	<i>L. (infantum) chagasi</i>

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más profundo al colectivo del IPK y en particular de Parasitología, donde crecí profesionalmente, por las innumerables experiencias compartidas. A la Dra. Lázara Rojas por su comprensión, el apoyo profesional y humano. Al Dr. Finlay, por sus múltiples enseñanzas y su tesón, y a mis cros de la Comisión Científica por las oportunas recomendaciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

A los Doctores Jean-Claude Dujardin, Gert Van der Auwera y Raúl Díaz, por la confianza, la exigencia y el rigor de nuestros intercambios, por compartir sus experiencias y darme la posibilidad de lograr una relación científica y humana excelente. A las Doctoras María Hildelisa Espino y Mayra Muné agradezco muy especialmente la meticulosa revisión del documento y las encomiables sugerencias realizadas.

A mis compañeras del grupo, que durante tantos años me siguieron, aún cuando nada parecía posible. Gracias por su fidelidad a *Leishmania*, su amistad y cariño. Llegue a Ivón, Lisset, Lianet y Marley mi corazón agradecido. A Fraga, que ha sido colaborador y contraparte. Agradezco la transparencia de nuestra amistad y las múltiples reuniones, acuerdos y desacuerdos que tuvimos, sin escatimar tiempo ni descanso. Sin tu paciencia, ayuda e impulso en momentos muy difíciles, no hubiera llegado.

A los Doctores Jorge Alvar Ezquerra (OMS), José M. Requena y Manuel Soto (UA Madrid), Iván Darío Vélez y Carlos Muskus (PECET, U. Antioquia), siempre pendientes de mi desarrollo, por compartir su sabiduría y experiencia con absoluta modestia sin preguntarme nunca qué hacía una cubana investigando sobre *Leishmania*.

A todas las personas, laboratorios e Instituciones de tantas partes del mundo que donaron sus cepas y muestras biológicas sin las cuales hubiera sido imposible realizar esta investigación.

A los compañeros de Docencia, muy especialmente a Maribel, siempre atenta y preocupada, por la ayuda brindada durante este largo proceso y a Mandy, por su ayuda en la localización de tantas referencias.

Agradezco especialmente la presencia y paciencia diarias de Hilda, Maite, Idalia, Aymé y nuevamente Ivón, el apoyo permanente de Alice, su fuerza y determinación, así como poder contar con Belsy y Gail, que con mucha constancia y cariño me apoyaron tanto en el plano personal y familiar. A mis amigas de siempre: Larisa, Angela y Elena, por su fidelidad de tantos años.

A mi familia y en particular a mis hermanos queridos, agradezco el cariño y el ejemplo. Sobre todo, porque siempre los ví trabajar con convicción. Mi más profundo y sentido recuerdo a la memoria del Galle, tan excelente hermano como profesional, quien siempre tendrá un lugar especialísimo en mi vida y mi carrera.

Finalmente, mi agradecimiento más profundo es para mis padres, en especial para mi Mamá que aún nos acompaña, porque un magnífico empleo de sus dotes naturales suplió con creces lo que les fue negado por la época que les tocó vivir, e hicieron de su dedicación al trabajo, honestidad, ética y disciplina, una norma de vida para desarrollar nuestra familia. Ojalá esta satisfacción de ahora pueda compensar en parte todo lo que hicieron y continúan haciendo. Gracias por su inteligente manera de vivir, y sobre todo, por su incomparable amor.

DEDICATORIA

A mis hijos, *Ana Patrícia y César Gabriel*

alegría, fuerza, futuro...

SÍNTESIS

Con el propósito de diseñar una propuesta que permita la identificación de las principales entidades taxonómicas de *Leishmania* en diversas áreas geográficas, se investigó el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70kDa. Se detectaron mediante PCR 16 especies de importancia médica de este parásito, de las cuales 9 se estudian por primera vez con relación a este gen. Se obtuvieron y caracterizaron 44 secuencias nucleotídicas *hsp70*, y se realizó un análisis filogenético que constituyó un marco de referencia para la posterior discriminación. Se identificaron y seleccionaron los sitios polimórficos individuales más apropiados para facilitar la tipificación de la mayoría de las especies o entidades taxonómicas de importancia médica de *Leishmania*, para el Nuevo y el Viejo Mundo, mediante digestiones enzimáticas sucesivas del producto de PCR. Se diseñó un algoritmo teórico de tipificación que se corroboró a través del análisis de cepas de referencia y muestras biológicas de origen diverso, que permitió proponer la PCR-*hsp70*/RFLP, como herramienta para la identificación universal de *Leishmania*, lo cual resulta novedoso y de gran aplicación en países endémicos, centros de referencia o investigación y clínicas del viajero.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	Pág
	1.1 Introducción	1
	1.2 Hipótesis	3
	1.3 Objetivos	4
	1.3.1 Objetivo general	4
	1.3.2 Objetivos específicos	4
	1.4 Novedad científica	4
	1.5 Valor teórico	5
	1.6 Valor práctico	5
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
	2.1 Breve introducción histórica	6
	2.2 Origen evolutivo, clasificación taxonómica, filogenia	6
	2.3 Distribución geográfica y frecuencia de la leishmaniasis	9
	2.4 Transmisión del parásito	9
	2.4.1 Vectores	10
	2.4.1.1 <i>Lutzomyia</i> en el Caribe y su relación con leishmaniasis	11
	2.5 Morfología y ciclo de vida del parásito	13
	2.6 Formas clínicas	15
	2.6.1 Leishmaniasis cutánea	15
	2.6.2 Leishmaniasis mucocutánea	16
	2.6.3 Leishmaniasis visceral	16
	2.6.4 Leishmaniasis dérmica post kala azar	17
	2.6.5 Coinfección <i>Leishmania</i> -VIH	17
	2.7 Diagnóstico de leishmaniasis	18
	2.7.1 Diagnóstico parasitológico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea	18
	2.7.2 Diagnóstico de leishmaniasis visceral	19
	2.8 Diagnóstico molecular de leishmaniasis	20
	2.8.1 Diagnóstico mediante PCR	20
	2.8.2 Diagnóstico mediante PCR en tiempo real	22
	2.9 Tratamiento	23
	2.10 Control	24
	2.11 El Proyecto Genoma de <i>Leishmania</i>	25
	2.11.1 Organización genómica	26
	2.11.2 Kinetoplasto	27
	2.12 Importancia del choque térmico en el ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	27
	2.12.1 La proteína de choque térmico (HSP70) en <i>Leishmania</i>	27

2.13 Identificación o tipificación de especies	29
2.13.1 Identificación mediante patrones de isoenzimas	29
2.13.2 Identificación mediante PCR	30
2.13.3 Identificación mediante PCR-RFLP	30
2.13.4 Identificación mediante RAPD	33
2.13.5 Identificación mediante MLMT	33

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio y contexto de la investigación	35
3.2 Universo de trabajo	35
3.2.1 Cepas de referencia	35
3.2.2 Aislamientos clínicos primarios	36
3.2.3 Muestras clínicas humanas	37
3.2.4 Muestras de otros agentes infecciosos	38
3.3 Obtención de ácido desoxiribonucleico	38
3.3.1 Obtención de ADN genómico	38
3.3.2 Obtención de ADN de muestras clínicas	39
3.3.3 Verificación de la calidad del ADN	39
3.3.4 Determinación de la concentración y pureza del ADN	39
3.4 Reacción en cadena de la polimerasa	40
3.4.1 PCR- <i>hsp70</i>	40
3.4.1.1 Cebadores para la amplificación del gen <i>hsp70</i>	40
3.4.2 Optimización de la PCR- <i>hsp70</i>	41
3.4.3 Protocolo 1 de amplificación de la PCR- <i>hsp70</i>	41
3.4.4 Protocolo 2 de amplificación de la PCR- <i>hsp70</i>	42
3.4.5 PCR-18S	42
3.4.6 Verificación de la amplificación	43
3.4.7 Precipitación de los productos de la PCR- <i>hsp70</i>	43
3.5 Análisis de parámetros analíticos de la PCR- <i>hsp70</i>	43
3.5.1 Sensibilidad analítica de la PCR- <i>hsp70</i>	43
3.5.2 Especificidad analítica de la PCR- <i>hsp70</i>	44
3.5.3 Repetibilidad de la PCR- <i>hsp70</i>	44
3.5.4 Reproducibilidad de la PCR- <i>hsp70</i>	44
3.6 Secuenciación y análisis del gen que codifica la proteína HSP70	45
3.6.1 Diseño de cebadores para la secuenciación de Productos de la PCR- <i>hsp70</i>	45
3.6.2 Secuenciación	46
3.6.3 Alineamiento de secuencias	46
3.6.4 Análisis filogenético	47
3.7 Estudio teórico de las secuencias y del polimorfismo genético	47
3.7.1 Análisis teórico utilizando la enzima <i>HaeIII</i>	47
3.7.2 Identificación de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas útiles para la identificación	48
3.7.3 Propuesta de nuevas restricciones enzimáticas para la identificación	48

3.8 Ensayos de PCR y PCR-RFLP	48
3.8.1 PCR- <i>hsp70</i>	49
3.8.2 Restricciones enzimáticas	49
3.8.3 Análisis del tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado	49
3.8.4 Determinación de los patrones de PCR-RFLP de cada especie	50
3.9 Aplicación de la PCR- <i>hsp70</i> y PCR- <i>hsp70</i> /RFLP a la detección e identificación de <i>Leishmania</i> en muestras biológicas	50
3.9.1 Aplicación de la PCR- <i>hsp70</i> a la detección de <i>Leishmania</i> spp.	50
3.9.2 Determinación del porcentaje de positividad a la PCR- <i>hsp70</i>	50
3.9.3 Aplicación de la PCR- <i>hsp70</i> /RFLP a la identificación de <i>Leishmania</i> spp.	50
IV. RESULTADOS	
4.1 Desempeño analítico de la PCR- <i>hsp70</i> en la detección de <i>Leishmania</i> spp.	52
4.2 Caracterización de las secuencias obtenidas	57
4.3 Utilidad del gen <i>hsp70</i> para el análisis filogenético de <i>Leishmania</i> .	60
Identificación de especies de <i>Leishmania</i> en base al análisis teórico de las secuencias y a su polimorfismo	66
Verificación de la identificación de <i>Leishmania</i> mediante PCR- <i>hsp70</i> /RFLP	74
Aplicación del algoritmo teórico de identificación de especies a muestras biológicas	81
V. DISCUSIÓN	
5.1 Desempeño analítico de la PCR- <i>hsp70</i> en la detección de <i>Leishmania</i> spp.	86
5.2 Caracterización de las secuencias obtenidas	89
5.3 Utilidad del gen <i>hsp70</i> para el análisis filogenético de <i>Leishmania</i>	91
Identificación de especies de <i>Leishmania</i> en base al análisis teórico y verificación mediante PCR- <i>hsp70</i> /RFLP	97
Aplicación del algoritmo propuesto para la tipificación de <i>Leishmania</i> en muestras biológicas y clínicas	100
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
VI.1 CONCLUSIONES	106
VI.2 RECOMENDACIONES	107
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
VIII. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR Y AVALES	132
IX. ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La infección de humanos por parásitos del género *Leishmania* produce un amplio espectro de formas clínicas conocidas como leishmaniasis. Esta parasitosis está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la categoría I de las enfermedades infecciosas (situación emergente e incontrolada) y según esta fuente, es endémica al menos en 88 países de cuatro continentes, en los que 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (World Health Organization, 2004).

La leishmaniasis forma parte del grupo de enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas, que representan pobreza y desventaja social. La falta de atención ocurre también a nivel investigativo y de desarrollo, pues el incentivo para desarrollar nuevas herramientas diagnósticas, drogas o vacunas es muy bajo, debido a que no existe un mercado interesado en los grupos sociales que padecen la enfermedad, según confirma la OMS (http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index5.html).

Las principales presentaciones clínicas incluyen formas cutáneas, mucocutáneas, y la leishmaniasis visceral. En todos los casos, el establecimiento y la evolución de la infección depende de factores genéticos e inmunológicos ligados al hospedero (Blackwell *et al.*, 2009) y de la especie de *Leishmania* que parasita (Grimaldi y Tesh, 1993).

Las hembras hematófagas de insectos dípteros del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, son los vectores responsables de la transmisión del parásito (Killick-Kendrick, 1990). Durante la misma, este se enfrenta al estrés provocado por el aumento de la temperatura y el descenso del pH, por lo cual

para asegurar su supervivencia en el hospedero mamífero, *Leishmania* debe poseer mecanismos de termotolerancia que están mediados, entre otros factores, por las proteínas de choque térmico (Folgueira y Requena, 2007).

En años recientes se ha sustentado la importancia de identificar la especie que parasita como parte del proceso de diagnóstico (Reithinger y Dujardin, 2007), lo cual se basa en evidencias que relacionan a la especie de *Leishmania* infectante con la forma de presentación clínica y la evolución de la enfermedad (Murray *et al.*, 2005); en la susceptibilidad diferente al tratamiento (Alvar *et al.*, 2006; Croft *et al.*, 2006; Arévalo *et al.*, 2007) y en el manejo de situaciones epidemiológicas que involucran vectores y reservorios (Pérez *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008).

A los métodos clásicos para realizar la identificación de especies se suman recientemente nuevos métodos moleculares, más precisos, que son variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés), como el análisis del polimorfismo en la talla de los fragmentos de ADN amplificados (PCR-RFLP), la cual tiene un amplio uso para la tipificación (Marfurt *et al.*, 2003; Rotureau *et al.*, 2006; Alves da Silva *et al.*, 2010).

Las dianas genéticas más utilizadas para desarrollar la PCR-RFLP son: los espaciadores internos de la transcripción del RNA ribosomal (ITS siglas en inglés) (Cupolillo *et al.*, 1995), las secuencias de los miniexones (spliced leader, SL siglas en inglés) (Marfurt *et al.*, 2003), los genes que codifican la glicoproteína de 63 kd (*gp63*) (Victoir *et al.*, 2003) y la proteína de 70 kd (*hsp70*) (García *et al.*, 2004). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los protocolos se diseñaron para enfrentar situaciones específicas de países o áreas geográficas, o se aplican a la discriminación de especies de uno u otro subgénero.

Entre estas dianas, el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática en *Leishmania* está altamente conservado en numerosos organismos y no está sujeto a selección (Folgueira y Requena, 2007). Además, se demuestra que este gen permite discriminar algunas entidades del subgénero *L. (Viannia)* al utilizar diferentes restricciones

enzimáticas del producto de amplificación de la PCR, por lo cual resulta ventajoso su uso (García *et al.*, 2004). Sin embargo, estos autores no abordan el análisis teórico de secuencias, ni notifican el estudio teórico de las enzimas posibles a utilizar, así como tampoco tienen en cuenta las relaciones filogenéticas entre las distintas especies que revela este gen, todo lo cual puede enriquecer el uso potencial de esta metodología en la identificación de nuevas entidades.

Debido a que en la actualidad no está disponible un método con alto poder discriminatorio, que se pueda aplicar de manera universal a la identificación de numerosas entidades de *Leishmania* de importancia médica en distintos contextos del Nuevo y Viejo Mundos, y teniendo en cuenta que no existe consenso en relación con la metodología o la diana genética más apropiada para la identificación, nos propusimos diseñar un algoritmo que facilite la identificación de entidades taxonómicas de *Leishmania* de importancia médica, mediante PCR-RFLP, profundizando en el estudio del gen *hsp70* y sus secuencias nucleotídicas, interpretar el contexto filogenético de este parásito en relación con este gen, así como investigar y demostrar su polimorfismo genético.

Esto permitirá su aplicación en el diagnóstico, la clínica y la epidemiología tanto en las áreas endémicas, los centros de referencia e investigación y las clínicas del viajero, que precisan de herramientas confiables para la detección e identificación de *Leishmania* spp.

1.2 Hipótesis

El análisis de la secuencia del gen *hsp70* que codifica la proteína de choque térmico citoplasmática HSP70 de *Leishmania*, permite estudiar sus relaciones filogenéticas. El carácter polimórfico de dicho gen facilita la identificación de las entidades taxonómicas de importancia médicas mediante PCR-RFLP, que constituye la base de un algoritmo para la tipificación universal del parásito en distintos contextos geográficos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General:

- 1- Identificar las entidades taxonómicas de *Leishmania* de importancia médica del Nuevo y Viejo Mundo.

1.3.2 Objetivos específicos:

- 1- Determinar el gen que codifica la proteína HSP70 de *Leishmania* en 16 especies de importancia médica en el Nuevo y Viejo Mundo.
- 2- Caracterizar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los fragmentos del gen que codifica la proteína HSP70 de *Leishmania* en dichas especies.
- 3- Interpretar las relaciones filogenéticas de las distintas entidades taxonómicas estudiadas.
- 4- Verificar la discriminación teórica de especies o entidades taxonómicas del Nuevo y Viejo Mundo.
- 5- Demostrar la aplicabilidad de la PCR-*hsp70*/RFLP en la identificación de entidades taxonómicas de *Leishmania* en muestras biológicas diversas.

1.4 Novedad científica

Se obtuvieron y caracterizaron 44 secuencias nuevas del gen *hsp70*, entre ellas las primeras secuencias reportadas a la comunidad internacional para 11 especies de *Leishmania*.

Se demostró por primera vez a nivel internacional que la información contenida en dichas secuencias se puede aplicar a la realización de análisis filogenéticos entre las distintas entidades analizadas.

Se demostró por primera vez que el polimorfismo del gen *hsp70* permite, mediante PCR-RFLP, la discriminación individual de la mayoría de las entidades taxonómicas de *Leishmania* de importancia médica tanto en el Nuevo como el Viejo Mundo, sin variaciones importantes entre cepas.

Se diseñó y corroboró la validez de un algoritmo para la tipificación universal del parásito en distintos contextos geográficos, mediante su aplicación a muestras

biológicas diversas, lo que constituye una propuesta de aplicabilidad diagnóstica, clínica y epidemiológica.

1.5 Valor teórico

La metodología utilizada puede constituir una referencia para estudios posteriores basados en el análisis de secuencias nucleotídicas, así como, el algoritmo propuesto puede ser una estrategia de trabajo para la evaluación de muestras clínicas y biológicas de distinta procedencia.

1.6 Valor práctico

El algoritmo propuesto para la detección y diferenciación de especies o entidades taxonómicas tiene múltiples aplicaciones. En países endémicos, y como parte del proceso diagnóstico, facilitaría el pronóstico en aquellos casos en que las lesiones cutáneas puedan evolucionar a formas mucocutáneas, más complicadas, facilitaría la imposición de tratamiento donde se demostró poca respuesta a los antimoniales u otras drogas empleadas en la actualidad, en casos de falla terapéutica, resistencia, así como en individuos con trastornos inmunológicos o inmunocomprometidos. La identificación del parásito en vectores y reservorios conduciría a tomar las medidas de control más adecuadas a cada caso, lo que reviste importancia crucial en posibles casos de transmisión de especies viscerotrópicas. En ensayos clínicos de nuevas opciones terapéuticas permitiría establecer la posible relación entre la respuesta al tratamiento y la especie, y por todo lo anterior es de gran utilidad en centros de referencia y clínicas del viajero donde se tratan casos de leishmaniasis importada.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve introducción histórica

Las primeras referencias a la enfermedad producida por *Leishmania* en el Nuevo Mundo se remontan a textos del periodo Inca y otros del periodo de la colonización española, donde se mencionan los riesgos a que se sometían los agricultores que retornaban de Los Andes con úlceras cutáneas (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/>). Posteriormente, se reportó en Perú y Ecuador el hallazgo de piezas de cerámica precolombina antropomórfica de la cultura Moche (huacos), con representaciones de lesiones similares a lo que hoy conocemos como leishmaniasis mucocutánea, lo que puede constituir una evidencia de que esta enfermedad ya afectaba a las poblaciones americanas preincaicas (World Health Organization, 2004).

Por otro lado, Alexander Russel describe en 1756 una lesión cutánea en forma de úlcera redondeada de bordes bien definidos e hipertróficos que denomina Botón de Aleppo, que parece corresponderse con una leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo, y más tarde en 1901, se describen por William Leishman numerosos cuerpos ovalados intracelulares que observa en frotis del bazo de un soldado irlandés muerto por fiebres en la India, al tiempo que Charles Donovan en Madrás, encuentra resultados similares al analizar frotis de bazos de pacientes indios que supuestamente habían muerto por malaria. Dos años más tarde, Ronald Ross relaciona estos organismos con la enfermedad conocida entonces como “kala-azar” y sugiere denominar el nuevo parásito como *Leishmania donovani* (Herwaldt, 1999).

2.2 Origen evolutivo, clasificación taxonómica, filogenia

Los organismos del género *Leishmania* presentan un origen muy temprano en la evolución de los eucariotas y existen diversas teorías que explican su evolución. Noyes

(1998) propone un origen neotropical del género durante el Palioceno, con la posterior divergencia de los subgéneros *L. (Viannia)* en los comienzos del Mioceno y *L. (Leishmania)* y *L. (Sauroleishmania)* a finales de igual periodo. Esta propuesta es controversial para las relaciones dentro de los subgéneros y complejos de especies y presenta inconsistencias con relación a la filogenia de los flebótomos vectores. Más tarde se contrarresta la propuesta de Noyes y se propone un origen paleártico para *Leishmania*, que sugiere la introducción del género en el neotrópico durante el Plioceno, y que a través de un rápido proceso de especiación, favorecido por factores ecológicos y climáticos, da lugar a *L. (Viannia)* (Kerr *et al.*, 2000). Esto se critica por Momen y Cupolillo (2000), debido a la falta de correspondencia de esa teoría con la actual taxonomía de los vectores, y la necesidad de múltiples adaptaciones de roedores murinos en el Neotrópico, entre otros aspectos. Momen y Cupolillo (2000) proponen la tercera teoría: el origen africano para todas las especies del Viejo Mundo, con un probable ancestro común en el este de África y posibles rutas de migración para los grupos *L. (Leishmania)*; *L. (Viannia)* y *Paraleishmania*; *L. infantum (L. chagasi)* y *Sauroleishmania*, en el mesozoico, más acorde a postulados anteriores de Safjanova (1982) y Thomaz-Soccol *et al.*, (1993).

La clasificación taxonómica de este parásito es un problema importante en la actualidad. Inicialmente, se basó en criterios ecobiológicos tales como: el vector implicado en la transmisión, distribución geográfica, tropismo, propiedades antigénicas y manifestaciones clínicas de la enfermedad que produce (Mc Mahon-Pratt y David, 1981; Lainson y Shaw, 1987). Con posterioridad, la aplicación de la taxonomía numérica y las técnicas cladísticas a los datos electroforéticos obtenidos del análisis de patrones de isoenzimas (MLEE siglas en inglés) condujo a un sistema de clasificación de especies que se mantiene vigente (Rioux *et al.*, 1990).

El advenimiento de la biología molecular favorece en los últimos años el acceso a secuencias nucleotídicas y aminoacídicas que aportan una gran cantidad de datos útiles para el análisis filogenético. En este sentido, se utilizan varios marcadores moleculares, entre ellos: ITS (Cupolillo *et al.*, 1995; Villinski *et al.*, 2008), una secuencia repetitiva

de ADN (Piarroux *et al.*, 1995); los genes que codifican la citocromo oxidasa II (Ibrahim y Barker, 2001), el gen *gp63* (Mauricio *et al.*, 2007), el gen que codifica la cisteino proteinasa B (*cpb*) (Hide *et al.*, 2007), para el citocromo B (*cytB*) (Asato *et al.*, 2009) y los mini exones (Sukmee *et al.*, 2008).

Por otra parte, también se propone que los genes que codifican proteínas como el factor de elongación 1 (EF-1); la proteína HSP70; y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) son candidatos útiles para realizar estudios de sistemática molecular en kinetoplástidos (Momen y Cupolillo, 2000).

Mayr (1969) define el concepto biológico de especie como el conjunto de poblaciones que real y potencialmente pueden reproducirse entre sí, pero que están aisladas de otros grupos similares. Esta definición es difícil de aplicar a *Leishmania*, cuyo modo de reproducción es esencialmente asexual. En cambio, el concepto evolutivo es más apropiado, por cuanto reconoce un linaje descendiente de una población con un ancestro, que mantiene su identidad sobre otros linajes, que también tienen su propia tendencia evolutiva (Wiley, 1978). Sin embargo, la filogenia de un organismo es más que la suma de sus genes (Doolittle, 1999) y para una clasificación exitosa se deben analizar un conjunto de factores, en lugar de caracteres aislados. En general, de acuerdo a la última clasificación propuesta (Moreira *et al.*, 2004), este parásito se clasifica como:

Phylum: *Euglenozoa*

Clase: *Kinetoplastea*

Subclase: *Metakinetoplastina*

Orden: *Trypanosomatida*

Género: *Leishmania*

Subgénero: *Leishmania*

Subgénero: *Viannia*

2.3 Distribución geográfica y frecuencia de la leishmaniasis

La infección en humanos por parásitos del género *Leishmania* es endémica al menos en 88 países de cuatro continentes y se reportan alrededor de dos millones de casos nuevos cada año (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/).

Datos recientes indican que el número global de casos se incrementó, particularmente en Brasil (Brandão-Filho *et al.*, 1999) Bolivia y Perú (Davies *et al.*, 2000), Colombia (King *et al.*, 2004), y Afganistán (Reithinger *et al.*, 2003). Tal incremento puede ser resultado del inadecuado control de vectores y reservorios en las zonas endémicas, de la mayor detección de leishmaniasis cutánea asociada a infecciones oportunistas (VIH/SIDA) (Molina *et al.*, 2003), de la emergencia en la resistencia al tratamiento (Croft *et al.*, 2006a) y del impacto reciente de los cambios climáticos, que inciden en la distribución y comportamiento de los vectores implicados en la transmisión de distintas enfermedades, entre ellas, la leishmaniasis (Cárdenas *et al.*, 2006).

Es muy probable que como consecuencia del calentamiento global la leishmaniasis se disperse hacia zonas actualmente templadas, donde los incrementos de la temperatura pudieran favorecer la extensión de las estaciones en que se alimentan los vectores que transmiten el parásito, o que la baja temperatura provoque una extensión de su período larval (Schönian *et al.*, 2008). A esto, se agrega que el 90% de los casos de infección cutánea ocurren en Afganistán, Pakistán, Argelia, Irán, Brasil y Perú, mientras que el 90% de la enfermedad visceral ocurre en la India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil (Murray *et al.*, 2005), lo cual confirma que esta enfermedad tiene fuertes vínculos con la pobreza (Alvar *et al.*, 2006a).

2.4 Transmisión del parásito

La forma infectiva del parásito es el promastigote metacíclico (Sacks, 1989), que se inocula en el mamífero mediante la picadura del insecto, y cuya transmisión constituye un ejemplo típico de antroponosis. Por otra parte, aspectos relacionados con la conducta humana, como la urbanización y destrucción de los bosques (Desjeux, 2001), la ocurrencia de conflictos armados (Weina *et al.*, 2004), y el incremento del turismo,

provocan la migración de población susceptible hacia áreas endémicas y favorecen la dispersión de *Leishmania* hacia áreas donde previamente no ocurría transmisión (Blum y Hatz, 2009).

2.4.1 Vectores

Los vectores de todas las especies de *Leishmania* descritas son hembras hematófagas de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y de las 500 especies conocidas, solo 31 se identifican como vectores de especies patógenas y 43 como vectores probables, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Killick-Kendrick, 1990; 1999) (figura 1).



Figura 1: Vectores de *Leishmania* spp.

Leyenda: A: *Lutzomyia longipalpis*. Foto cortesía del Laboratorio de Entomología del PECET. Universidad de Antioquia, Colombia. B: *Phlebotomus papatasi*. (www.vectorbase.org/Image/organism_papatasi).

Estos flebotomíneos presentan una gran variedad de hábitats. Prefieren las zonas húmedas y oscuras entre las que predominan las selvas tropicales y los huecos de los árboles, aunque se les puede encontrar en desiertos, en las madrigueras de los roedores o dentro del domicilio (Fuentes, 2001). Mientras se alimentan, su saliva deposita en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado, junto a los parásitos inoculados, sustancias vasodilatadoras, anti-hemostáticas, anti-inflamatorias o con actividad inmunosupresora, que incrementan el riesgo sanguíneo en el sitio de la picada (Charlab *et al.*, 1999) e inhiben los mecanismos microbicidas de los macrófagos receptores, todo lo cual favorece el establecimiento de la infección (Guerin *et al.*, 2002).

2.4.1.1 *Lutzomyia* en el Caribe y su relación con *Leishmania*

En América Latina existen unas 300 especies de *Lutzomyia*, reportándose alrededor de 45 como vectores probados o probables de *Leishmania* (Killick Kendrick, 1999). Entre los países caribeños (figura 2), República Dominicana constituye el único donde se reporta la leishmaniasis de manera endémica y autóctona, (Bogaert-Díaz *et al.*, 1975). Aquí se relaciona *Lu. cristophei* como vector potencial (Zeledón *et al.*, 1985) y se especula que la especie de *Leishmania* responsable podría pertenecer al Complejo *L. mexicana*, pero con características diferentes a las especies previamente descritas, (Schnur *et al.*, 1983). También en Martinica y Guadalupe se informan algunas evidencias de la enfermedad (Fouche y Montestruc, 1951; Courmes *et al.*, 1966). En Trinidad, otros autores relacionan *Leishmania amazonensis* o una especie quizás relacionada, con ciclos enzoóticos entre roedores y marsupiales, donde *Lu. flaviscutellata* podría ser el elemento transmisor (Tikasingh, 1975).

Se discute para Puerto Rico la posibilidad del establecimiento de la enfermedad en base a la existencia de continuos casos importados provenientes de inmigrantes o personas procedentes de América Central, y se concluye que las condiciones en el territorio no son propicias, al no existir vectores antropofílicos (Murillo-Solís y Maldonado, 1991).

El caso de Cuba presenta algunas diferencias, al reportarse en 1920 junto a Islas Caimán, la presencia de dos especies de este género: *Lu. cubensis* y *Lu. orestes* (Fairchild y Trapido, 1950). En la década de los 80 se notifican dos especies y una nueva subespecie del género *Lutzomyia* para Cuba: (*Lu. novoae* y *Lu. diazi*) y (*Lu. cayennensis cruz*) siendo solamente *Lu. orestes*, entre todas, la que manifiesta hábitos antropofílicos y hematófagos. Al mismo tiempo, se realiza la caracterización biológica y ecológica de estos vectores, reportándose su distribución en todas las regiones de la geografía cubana (González y García, 1981).

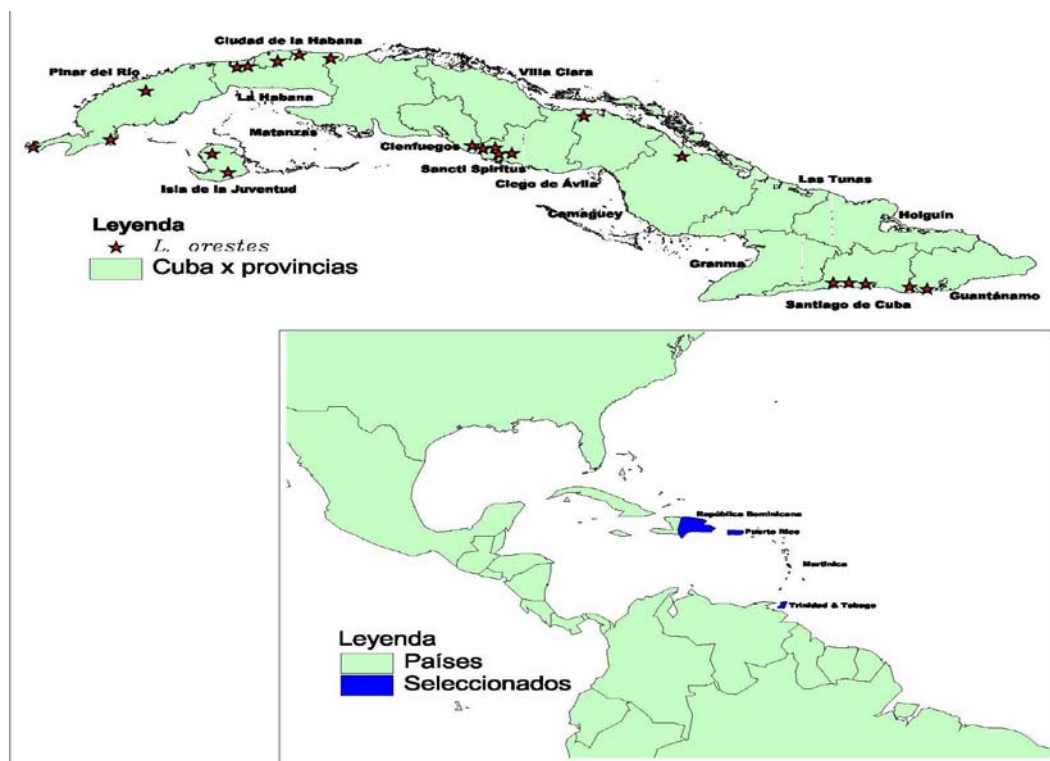


Figura 2. Mapa de la región del Caribe donde se han reportan posibles casos de leishmaniasis o vectores del agente causal.

Leyenda: Se indican los países implicados, y dentro de Cuba, las regiones donde se encuentra *Lutzomyia orestes*, según González y García (1981). Mapa realizado por K. Pérez Soler. Subdirección de Epidemiología, IPK.

Contrario a lo que sucede en América Latina, donde la mayor actividad de los flebótomos es nocturna, *Lu orestes* tiene hábitos diurnos con picos de actividad hematofágica que se relacionan con cambios en la temperatura, humedad y luminosidad, y tal como ocurre en otros casos, el ataque de las hembras se produce en oleadas (Lugo *et al.*, 1983) todo lo cual amplifica, teóricamente, su potencialidad vectorial. En años posteriores, se desarrollan estudios encaminados a demostrar las posibilidades de transmisión experimental de *Leishmania* mediante este vector, utilizando como modelo experimental el hámster dorado (Lugo *et al.*, 1988).

Actualmente, sería imprescindible demostrar que *Lu. orestes* cumple los requisitos indispensables propuestos por Killick-Kendrick (1990), para poder considerarse como vector de *Leishmania*, y plantear, de manera fehaciente, que existen en Cuba posibilidades de transmisión de este parásito. No existen investigaciones recientes que

aporten claridad sobre aspectos relativos a la posible transmisión en Cuba. Sin embargo, es necesario conocer los datos antes mencionados, ya que no se puede descartar completamente la posibilidad de que bajo condiciones epidemiológicas específicas, en las que se presenten todos los elementos que componen la cadena epidemiológica de transmisión, se pueda producir este fenómeno, que debería demostrarse rigurosamente.

2.5 Morfología y ciclo de vida del parásito

Los parásitos presentan dos formas morfológicamente distinguibles: amastigote y promastigote (figura 3). El primero se localiza en el interior de las células del sistema fagocítico mononuclear incluyendo macrófagos, monocitos y células de Langerhans. Su forma es ovalada o redondeada, con dimensiones que oscilan entre 3-5 μm de longitud y 1,5-2,5 μm de ancho. Posee un núcleo voluminoso generalmente excéntrico, y un blefaroplasto, de donde se forma el flagelo, que está próximo a una mitocondria modificada llamada kinetoplasto. El citoplasma es granular y vacuolado (Markel *et al.*, 1990).

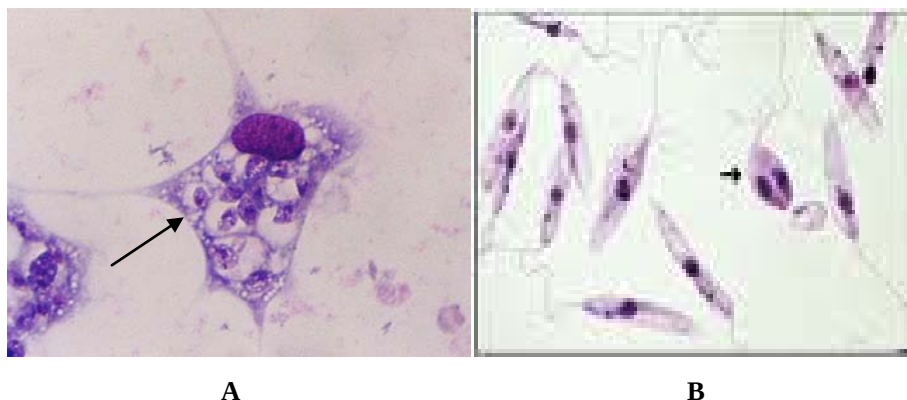


Figura 3. Estadios morfológicos de *Leishmania*.

Leyenda: A: Amastigote. Foto tomada por Lianet Monzote, Dpto de Parasitología, IPK; B: Promastigote. <http://www.dfarmacia.com/.../4v21n09-13038008tab05.gif>

La forma promastigote, en cambio, es fusiforme, extracelular, móvil y presenta un tamaño mayor. Su talla varía entre 10-30 μm de largo y 1.5-3 μm de ancho. Tiene un núcleo oval central y un kinetoplasto terminal o subterminal en la parte anterior del parásito, de la cual se origina el flagelo (Alvar, 2003).

El ciclo de vida alterna entre un hospedero mamífero y un insecto vector (figura 4). Entre los primeros se encuentran el hombre, cánidos, roedores salvajes, pequeños

marsupiales y simios, (Lainson y Shaw, 1987) y puntualmente se reportan equinos (Solano-Gallego *et al.*, 2003) y felinos (Rüfenacht *et al.*, 2009).

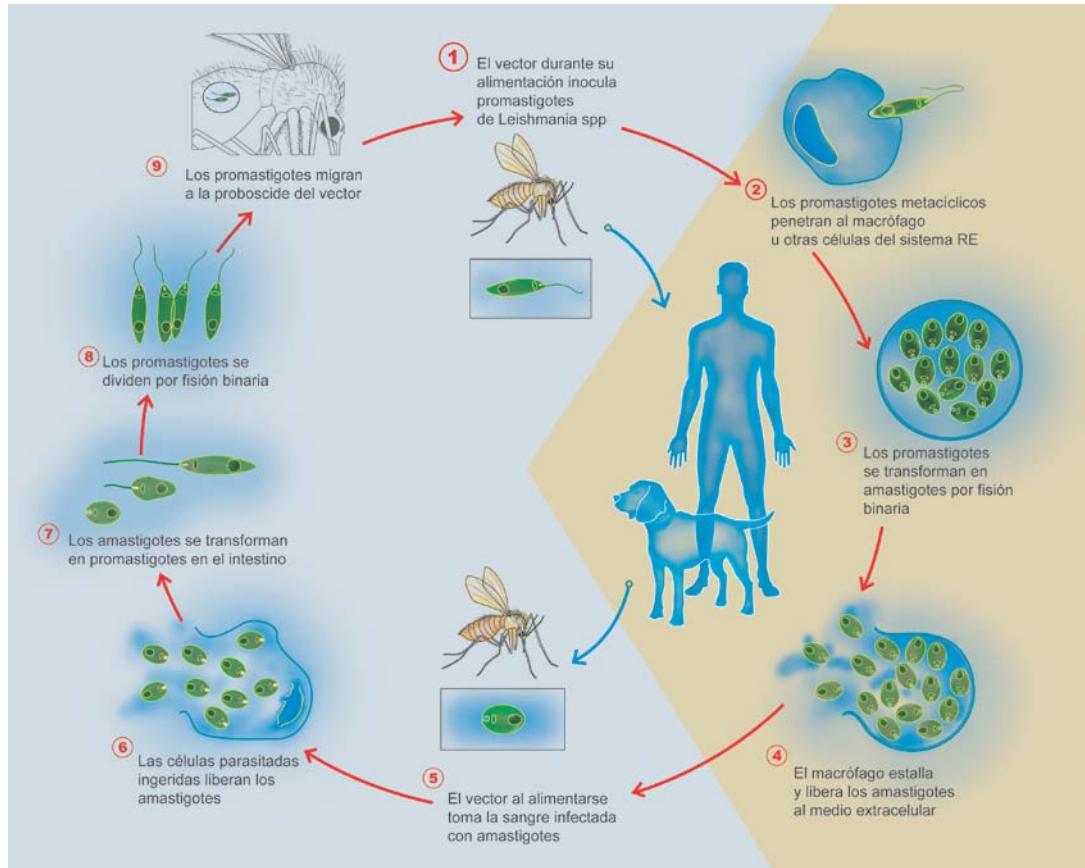


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Dibujo de Lic. Maylén Borrero, graduada del Instituto Superior de Diseño Industrial, basado en una idea de la autora

Los promastigotes inoculados mediante la picadura del vector son captados por las células del sistema fagocítico mononuclear. Esta interacción está mediada por distintas moléculas de la superficie del parásito, que actúan como ligandos para su unión con el macrófago, destacándose la proteína de membrana de 63 kDa (gp63) y los lipofosfoglicanos (LPG) (Alexander *et al.*, 1999). Como resultado se forma una vacuola parasitófora, en cuyo interior se transforman en amastigotes, que se multiplican activamente mediante sucesivas divisiones por fisión binaria. La proliferación no controlada del parásito propicia el estallido del macrófago, quedando libres los parásitos para invadir otras células, o ser refagocitados, propagándose de esta forma, a través de la circulación, hacia los tejidos (Alvar, 2003).

Seguidamente, las hembras de los vectores pican al hospedero vertebrado en busca de sangre para poder alimentarse y desarrollar sus huevos, tomando parásitos en forma de amastigotes que se transforman en promastigotes en el tubo digestivo y pasan de procíclicos, no infectivos y que se multiplican activamente, a metacíclicos, forma no replicativa con elevada infectividad (Sacks, 1989). La metaciclogénesis, proceso mediante el cual la estructura molecular de la superficie del parásito se transforma, favorece su separación de las paredes del intestino del vector y la migración hacia la faringe y la zona bucal, desde donde pasan al hospedero vertebrado durante la picada (Pimenta *et al.*, 1992) completando así el ciclo de vida.

2.6 Formas clínicas

Diversos estudios genéticos muestran que en el hombre y en ratones, existen múltiples *loci* que influyen en la susceptibilidad al parásito y están implicados en la respuesta inmunológica, innata y adquirida (Blackwell *et al.*, 2009). Las principales variantes clínicas, sus características y las correspondientes especies del parásito implicadas pueden consultarse en el anexo 1.

De manera general, se reconocen como básicas las formas de presentación que se describen a continuación.

2.6.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

Esta forma se presenta con un amplio rango de manifestaciones, tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo (Herwaldt *et al.*, 1999) (figura 5).

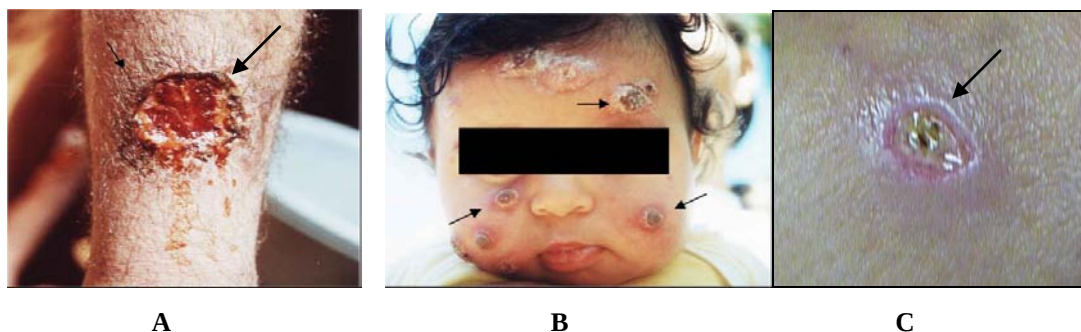


Figura 5. Lesiones cutáneas causadas por *Leishmania* spp.

Leyenda: A, B en: (http://www.ufpe.br/biomol/leishmanioses_Apostila_on_line) C: Foto tomada por Jorge Fraga, Dpto Parasitología, IPK.

La infección puede permanecer subclínica o ser clínicamente aparente, luego de un

período de incubación de varias semanas. De manera general, las lesiones varían de pápulas a nódulos, a lesiones ulcerativas, con una depresión central y bordes indurados, y pueden llegar a formar con el paso del tiempo (entre meses y años) escaras atrofiadas (Herwaldt *et al.*, 1999).

2.6.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC, espundia)

La leishmaniasis mucocutánea (figura 6), también se nombra como espundia por el peruano Escomel de Arequipa en 1911. La padece del 1-10% de los pacientes con leishmaniasis cutáneas (Marsden, 1986).



Fig 6. Leishmaniasis mucocutánea.

Leyenda: A: Foto tomada de Chappuis *et al.*, 2007; B: Foto tomada de Calvopina *et al.*, 2006.

Ocurre por diseminación hematógica o linfática de los parásitos desde la piel hasta la mucosa oronasofaríngea (Barral *et al.*, 1995) y se hace evidente por los síntomas nasales crónicos, que pueden continuar con la destrucción progresiva de la cavidad bucal y nasofaríngea, en el contexto de una respuesta inmune hiperactiva (Weigle *et al.*, 1987). Los reportes son escasos fuera de América Latina, y en ellos el agente etiológico típico es *L. aethiopica* (Murray *et al.*, 2005).

2.6.3 Leishmaniasis visceral (LV, kala-azar)

Es la forma más grave de la enfermedad (figura 7) que cuando el tratamiento es inadecuado, por lo general conlleva a la muerte del paciente. Es importante en América Latina, África, subcontinente indio y sur de Europa. Como agentes etiológicos se identifican los parásitos del Complejo Donovan (Guerin *et al.*, 2002). La LV se

comporta como antroponosis en la India, Nepal y Bangladesh cuando es causada por *L. donovani*, y como antroponosis/zoonosis en Etiopía, Sudán y Kenya (Alvar, 2003).

La LV causada por *L. infantum*, o su variante en las Américas: *L. infantum chagasi*, es zoonótica, donde el perro doméstico es el reservorio principal. En muchos casos la infección puede permanecer asintomática o subclínica. Puede seguir un curso agudo, subagudo o crónico (Seaman *et al.*, 1996).

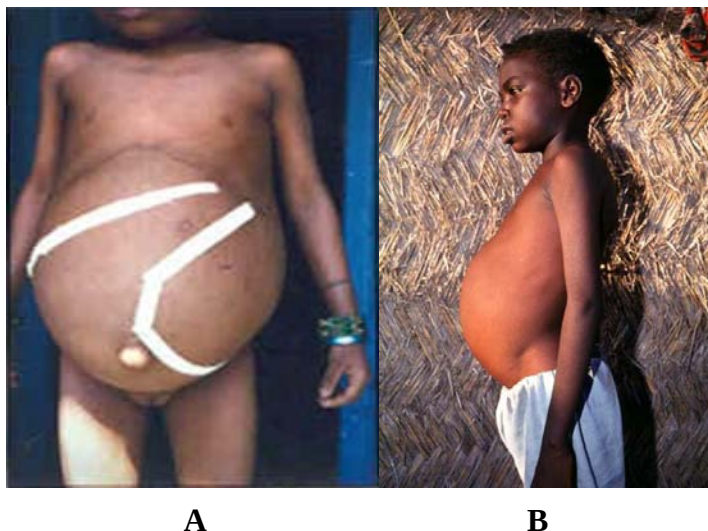


Figura 7. Hepato-esplenomegalia durante la leishmaniasis visceral.

Leyenda; A: En [http://www.icp.ucl.ac.be/.../parasites/images/WHO1](http://www.icp.ucl.ac.be/.../parasites/images/WHO1;);

B: En: <http://www.york.ac.uk/res/cii/imageGallery/KayeRes1>.

2.6.4 Leishmaniasis dérmica post kala-azar (PKDL siglas en inglés)

Se presenta tras la resolución aparente de la enfermedad visceral y se manifiesta como lesiones dérmicas en forma de placas hipopigmentadas o nódulos indurados dispersos por la piel (Alvar, 2003). Las personas que desarrollan esta manifestación crónica constituyen verdaderos reservorios, por la presencia de nódulos cargados de parásitos en algunas zonas del cuerpo (Alvar, 2003).

2.6.5 Coinfección *Leishmania*/VIH

La leishmaniasis visceral emerge como una importante infección oportunista entre las personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) en la década de los 90. La coinfección se notifica en 31 países, la mayoría del sur de Europa (WHO, 2000) debido a que solamente en esta área se monitoreó. Aunque la mayoría de los casos se presentan en forma de LV, también se reporta la presencia de LC, LMC, LCD y PKDL,

así como localizaciones inusuales del parásito, e incluso, casos asintomáticos (Alvar *et al.*, 1997).

Más recientemente, se estima que en el sur de Europa, el 94% de los pacientes co-infectados con *Leishmania*-HIV sufren LV y un 4% de LC (WHO, 2000). En el este de África y el sub-continente indio, se conoce que la LV es la forma clínica más común, pero se carece de datos exactos (Alvar *et al.*, 2008). En Brasil, en cambio, la coinfección provoca las formas clínicas fundamentales, reportándose 43%, 37% y 20% a LMC, LV y LC, respectivamente (Rabello *et al.*, 2003).

La terapia antiretroviral combinada de gran actividad (HAART siglas en inglés) reduce la incidencia de los primeros episodios sintomáticos de LV en Europa (Fernández-Cotarelo *et al.*, 2003) pero en regiones afectadas del sur de Asia o África, donde el acceso a esta terapia es extremadamente limitado, su grado de influencia no se ha podido determinar (Alvar *et al.*, 2008).

2.7 Diagnóstico de leishmaniasis

2.7.1 Diagnóstico parasitológico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea

El diagnóstico diferencial en las formas cutáneas es imprescindible ya que otras enfermedades como lepra, cáncer de piel, tuberculosis, micosis cutáneas, así como picaduras de insectos infectadas, impétigo, sarcoidosis y neoplasmas pueden producir lesiones similares (Herwaldt, 1999).

Los métodos parasitológicos son muy específicos pero poco sensibles (Herwaldt, 1999). Estos incluyen el examen microscópico de extendidos, improntas, biopsias o aspirados, tomados por lo general del borde de las lesiones y teñidos con Giemsa, o el examen histopatológico para realizar la búsqueda de amastigotes (Bailey y Lockwood, 2007).

El cultivo de esas muestras biológicas, por lo general en medio bifásico, resulta más informativo y puede facilitar la identificación y caracterización de especies por métodos isoenzimáticos o moleculares, pero requiere de mayores condiciones técnicas en el

laboratorio y se necesita tiempo para ofrecer el resultado (Reithinger *et al.*, 2007). Una reciente modificación: el cultivo microcapilar en medio monofásico, parece más promisorio (Boggild *et al.*, 2007).

Estos métodos son los más utilizados en los distintos niveles de salud en las áreas endémicas, que generalmente disponen de bajos recursos. Sin embargo, la sensibilidad varía en dependencia de numerosos factores: el número y la dispersión de los parásitos en la muestra, fundamentalmente en los casos del Nuevo Mundo (Navin *et al.*, 1990; Ramírez *et al.*, 2000), la contaminación frecuente del cultivo por la presencia de elementos bacterianos o fúngicos en la muestra biológica, y el hecho de que distintas especies del parásito pueden tener diferentes requerimientos para su cultivo (Piscopo y Azzopardi, 2007).

La respuesta de hipersensibilidad tardía, como manifestación de la respuesta inmune mediada por células, también se utiliza como método diagnóstico (Prueba Cutánea de Montenegro), aunque su aplicación mayor se centra en estudios epidemiológicos, y ensayos de vacunas, debido a que no diferencia infecciones pasadas o recientes (Reithinger y Dujardin, 2007).

2.7.2 Diagnóstico de leishmaniasis visceral

El diagnóstico diferencial incluye malaria, síndrome de esplenomegalia tropical, esquistosomiasis, cirrosis, trypanosomiasis africana, tuberculosis, brucelosis, fiebre tifoidea, endocarditis bacteriana, histoplasmosis, malnutrición, linfoma y leucemia (Bailey y Lockwood, 2007). En estos casos la muestra para el examen parasitológico directo se toma del aspirado de bazo, nódulos linfáticos o médula ósea (Herwaldt, 1999). En este último pueden ocurrir complicaciones derivadas de hemorragias por lo que se requiere alta pericia técnica y otras facilidades (Kager y Rees, 1983).

El diagnóstico indirecto se basa en la presencia de anticuerpos específicos, como los ensayos serológicos de ELISA, IFI y Western Blot que muestran una alta seguridad diagnóstica, pero son poco adaptables a condiciones de campo (Iqbal *et al.*, 2002). La

prueba de aglutinación directa (DAT siglas en inglés) es un ensayo semi-cuantitativo donde ocurre aglutinación visible si existen anticuerpos (Harith *et al.*, 1986) y se ha evaluado en condiciones de campo en diversos países (Böelaert *et al.*, 2008).

El polipéptido recombinante de 39 kilodalton: rK39 se utiliza en países endémicos en un sistema ELISA de detección de anticuerpos con excelentes valores de sensibilidad (93-100%) y especificidad (97-98%) (Braz *et al.*, 2002). Sin embargo, su validez en el este africano es variable, puesto que los pacientes sudaneses, por razones no esclarecidas aún, presentan títulos de anticuerpos más bajos contra esa proteína (Ritmeijer *et al.*, 2006).

La detección de un antígeno termo-estable y de bajo peso molecular en la orina de pacientes muestra resultados iniciales alentadores (Attar *et al.*, 2001), y se reporta buena especificidad, pero una sensibilidad baja a moderada (El-Safi *et al.*, 2003). Finalmente, el ADN del parásito se puede detectar también en aspirados y sangre periférica mediante la PCR.

2.8 Diagnóstico molecular de leishmaniasis

2.8.1 Diagnóstico mediante PCR

La PCR permite la amplificación selectiva de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante síntesis enzimática (Mullis, 1992) y se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la leishmaniasis, pues permite detectar el ADN presente en una biopsia aún en cantidades mínimas (fentogramos) o lo que es igual, hasta un solo parásito (Bensoussan *et al.*, 2006; Saiki *et al.*, 1989). Aunque esta técnica ha demostrado ser la más sensible y específica, su uso está restringido al tercer nivel de cuidados hospitalarios y laboratorios de investigación, lo que constituye una desventaja para la mayoría de las áreas endémicas (Singh *et al.*, 2005).

La información disponible de secuencias de ADN constituye un aporte fundamental para desarrollar ensayos basados en la PCR, con diferentes aplicaciones dirigidas a la comprensión y el conocimiento tanto del parásito, como de la enfermedad que causa. En

consecuencia, en el caso de la leishmaniasis, la PCR se aplica al monitoreo del tratamiento y a estudios epidemiológicos (Silva *et al.*, 2005), y se utilizan varios genes, de preferencia secuencias multicopias, para desarrollar una máxima sensibilidad en la detección (Lachaud *et al.*, 2002).

La superioridad de la PCR se caracteriza también por el hecho de admitir aplicaciones en un amplio rango de especímenes clínicos (Tavares *et al.*, 2003), lo que reviste gran importancia debido a la gran variedad de presentaciones de la leishmaniasis. Entre estas muestras se cuentan: biopsia y raspado de piel, aspirados de médula ósea y nódulos, muestras de sangre (García *et al.*, 2007; Akkafa *et al.*, 2008; Jamjooon y Sultan, 2009) e incluso conjuntiva (Strauss-Ayali, 2004). Se notifica que es posible obtener ADN a partir de preparaciones de aspirados de médula ósea, teñidas previamente con Giemsa (Alam *et al.*, 2009).

En las formas cutáneas, la PCR es la herramienta diagnóstica de más valor y la sensibilidad puede alcanzar hasta el 100% (García *et al.*, 2007). Para la toma de muestra se informa el empleo exitoso de aplicadores con algodón o palillos de dientes estériles, lo que constituye una alternativa no invasiva al empleo de ponches o escalpelos. (Mimori *et al.*, 2002; García *et al.*, 2007). En la enfermedad mucocutánea la utilización de kDNA como diana genética resulta muy sensible para detectar los parásitos, mientras que los genes que codifican ITS son más útiles para discriminar entre las especies que producen esta forma clínica en Brasil (Ovale-Bracho *et al.*, 2007).

En la leishmaniasis visceral, la detección de parásitos por PCR es más sensible que el examen microscópico en los aspirados y se recomienda realizar la evaluación de pacientes sospechosos en sangre periférica, antes de proceder al examen sobre aspirado o biopsia (Osman *et al.*, 1997). En un estudio comparativo reciente se reporta que en sangre periférica y en muestras de médula ósea es altamente sensible y específica para el diagnóstico de la LV en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Antinori *et al.*, 2007). También puede ser útil para detectar los parásitos cuando hay peligro potencial para la transmisión de kala-azar mediante transfusión, en cuyo caso la

serología tiene un papel muy limitado (Otero *et al.*, 2000).

En el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea post-visceral o post kala-azar se describe un protocolo que utiliza cebadores que amplifican kDNA, que por su alta especificidad, resulta muy útil para el diagnóstico de pacientes inmunocomprometidos, donde el diagnóstico serológico falla a menudo (Salotra *et al.*, 2003) .

2.8.2 Diagnóstico mediante PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real, (*Real Time PCR* siglas en inglés) es un método de alta tecnología que utiliza sondas fluorogénicas combinadas con la automatización del ensayo. Es una variante cualitativa y cuantitativa, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción de amplificación es proporcional a la cantidad de ADN formado, debido al acoplamiento de los marcadores fluorogénicos a los extremos 5'-3' de las sondas, lo que permite contabilizar el número de amplicones, o lo que es igual, determinar la carga parasitaria (Wortmann *et al.*, 2005). Esto facilita dar seguimiento a la cinética de la reacción.

El hecho de detectar la fluorescencia directamente en un tubo cerrado evita el riesgo de contaminación (Reithinger y Dujardin, 2007) y facilita aplicaciones de manera rápida y simultánea (Schulz *et al.*, 2003). Sin embargo, el equipo necesario, compuesto por un termociclador y un lector diseñados para poder efectuar la lectura de la fluorescencia emitida individualmente, y en cualquier momento de la reacción, encarece su obtención, lo que constituye la principal desventaja de esta técnica (Schulz *et al.*, 2003).

Recientemente, se sugiere que a pesar de que la PCR en tiempo real es capaz de realizar una cuantificación de parásitos más segura, no ofrece información relevante para tomar decisiones sobre el manejo de los casos, si se compara con los resultados de una PCR semi-cuantitativa, que es además, menos costosa (Antinori *et al.*, 2009).

2.9 Tratamiento

Desde los años 40 los compuestos de antimonio pentavalente: estibogluconato de sodio (Pentostam, Glaxo Wellcome, Reino Unido) y antimoniato de meglumina (Glucantime, Rhone-Poulenc Rorer, Francia), son los tratamientos de primera línea contra esta enfermedad (Berman, 1997; Croft y Coombs, 2003). De manera general, la dosis recomendada es de 15-20mg del principio activo/Kg de 21-28 días (Berman, 1997).

Los regímenes de dosificación varían de acuerdo a la forma de la enfermedad y la vía de administración (Croft y Coombs, 2003), y existe una correlación entre la especie que parasita y la respuesta al tratamiento con estos compuestos, lo que apunta a la necesidad de identificar el parásito (Grogil *et al.*, 1992; Arévalo *et al.*, 2007; Llanos-Cuentas *et al.*, 2008).

Los genéricos de Pentostam se producen con el objetivo de disminuir su alto costo, pero se reporta cardiotoxicidad fatal por el empleo de lotes de baja calidad, lo cual motivó una alerta sobre su uso (Sundar *et al.*, 1998). Se recomienda realizar un control de calidad antes del empleo de estos genéricos, debido a la aparición de nuevos brotes fatales por el uso de algunas producciones para el tratamiento de casos de LV en Nepal (Rijal *et al.*, 2003).

Otra droga sistémica de probada eficacia es la Anfotericina B (Fungizone®) cuya alta toxicidad es un factor limitante para su uso, pero constituye una opción en pacientes que muestran resistencia al tratamiento con antimoniales (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Se desarrollan nuevas reformulaciones para minimizar estos efectos, como la forma liposomal AmBisome®, (Meyerhoff, 2004), Abelcet®, y Amphocil™ (Murray, 2004). También se ha utilizado la miltefosina, inicialmente desarrollada como droga anticáncer, como único tratamiento oral efectivo contra la forma visceral de la enfermedad (Croft y Coombs, 2003).

La paramomicina (PM) (6-aminosidina), cuya actividad antileishmanial se demostró en 1960 y es efectiva contra varias especies (Neal *et al.*, 1995), se ha utilizado en ensayos

clínicos contra la LC y LV (Croft *et al.*, 2006). Su formulación parenteral se encuentra actualmente en evaluación en la India, (<http://www.iowh.org>) y en el este africano (<http://www.dndi.org>), promovida por organismos no gubernamentales.

2.10 Control

La lucha contra la leishmaniasis supone una visión integral de la enfermedad en todas sus formas, que agrupa factores como el control de vectores y reservorios, la educación sanitaria, la vigilancia pasiva y activa y el desarrollo de métodos diagnósticos que permitan el registro de casos, así como el tratamiento precoz (Desjeux, 1992).

La vacunación pudiera constituir un método efectivo de control. Para proteger contra las formas cutáneas se necesita activar la respuesta celular Th1, caracterizada por la producción de citocinas que posteriormente activarán los macrófagos, la producción de óxido nítrico y la muerte del parásito, sucesivamente (Alexander y Bryson, 2005; Coler y Reed, 2005). En cambio, contra la enfermedad visceral es preciso generar una respuesta inmune celular y humoral (Ravindran y Ali, 2004). A pesar de los avances que se notifican y de las múltiples aproximaciones que se han ensayado para lograr protección contra distintas formas de la enfermedad, no existen aún propuestas totalmente efectivas (Launois *et al.*, 2008).

En el caso de la LV las estrategias más recientes consisten en el control de reservorios y vectores, el uso de materiales impregnados de insecticidas, la detección activa de casos y el tratamiento (Böelaert *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2003). Es relevante que en el subcontinente indio, donde la LV es antroponótica y existe un único vector reconocido, se adoptan medidas para favorecer la eliminación de la enfermedad lo que se considera una propuesta científicamente factible (Bhattacharya *et al.*, 2006). En tal sentido, se demuestra que el diagnóstico precoz y tratamiento, control integrado de vectores, vigilancia efectiva de casos, movilización social y fomento de la colaboración a distintos niveles, pueden ofrecer resultados positivos si se ejecutan coordinadamente en los distintos países (Chappuis *et al.*, 2007).

Un análisis reciente plantea que en América Latina la diversidad y complejidad de la transmisión en las distintas locaciones, las lagunas en el conocimiento científico de la enfermedad en los distintos países, y la carencia de estudios de validación diseñados adecuadamente, hacen poco factible las posibilidades de eliminar esta forma de la enfermedad en esta área geográfica. En cambio, se considera que es posible mejorar el control a través de una voluntad política que desarrolle programas coherentes, e invierta en un mejor manejo de los casos y sistemas de vigilancia adecuados (Romero y Böelaert, 2010).

De manera general, se aboga por trasladar el extenso conocimiento actual sobre la biología del parásito a métodos diagnósticos efectivos, tratamientos y medidas, cuya validación rigurosa es imprescindible para eliminar a la LV de la lista de enfermedades más desatendidas, para lo cual se necesita con urgencia de esfuerzos sostenidos para la implementación y la estimulación de financiación, que permita que estas herramientas estén disponibles para todos (Chappuis *et al.*, 2007), así como se consideran urgentes programas de investigación encaminados a implementar estas propuestas (Romero y Böelaert, 2010).

2.11 El Proyecto Genoma de *Leishmania*.

En el año 1994 se comienza a desarrollar el proyecto de secuenciación del genoma de *Leishmania*, eligiéndose la cepa MHOM/IL/81/Friedlin de *L. major*. Se reporta que *Leishmania* es un organismo diploide cuyo genoma tiene un tamaño aproximado de 35Mb (Ivens *et al.*, 1998) organizado en 34-36 cromosomas.

En el año 2005 se publica toda la información genómica (Ivens *et al.*, 2005), y algo más tarde se completan proyectos encaminados a determinar la secuencia del genoma de otras especies, como: *L. infantum* y *L. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007) y *L. mexicana* (<http://www.genedb.org>). En la tabla 1 se muestran las características generales de la organización genómica de las cepas determinadas. En este momento, está a punto de completarse el análisis para *L. donovani* (<http://www.leishrisk.net.kaladrug>).

Tabla 1. Características generales de los genomas de *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*.

Característica	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>
Código de la cepa	<i>Friedlin</i>	MCAN/ES/98/ LLM-877	MHOM/BR/75/ M2904	MHOM/GT/ 2001.U1103
Número de cromosomas	36	36	35	34
Tamaño (Kpb)	32,8	32,1	32	
Contenido G + C (%)	59.7	59.3	57.76	59
Genes codificantes	8,298	8,154	8,153	*
Contenido G + C (%)	62.5	62.45	60.38	*
en genes codificantes				
Referencia	Ivens <i>et al.</i> , 2005	Peacock <i>et al.</i> , 2007	Peacock <i>et al.</i> , 2007	www.genedb.org

*La caracterización del genoma de *L. mexicana* aún no está publicada, por lo cual no aparece completa la información ofrecida para esta especie.

2.11.1 Organización genómica

Leishmania posee un genoma con un contenido en G-C del 57-59%, lo que se considera relativamente elevado cuando se compara con el de otros trypanosomátidos. Las regiones que codifican para proteínas (ORF, del inglés *open reading frame*) presentan un porcentaje de G-C más elevado que aquellas regiones no codificantes (Peacock *et al.*, 2007; Ivens *et al.*, 2005). Asimismo, entre las regiones no traducidas (UTR, del inglés *un-translated regions*) las 3'UTR son más ricas en G-C que las 5'UTR (Ivens *et al.*, 2005).

En *Leishmania*, al igual que ocurre en otros trypanosomátidos, los genes que codifican proteínas carecen de intrones y se disponen en largas agrupaciones ordenados en tándem. Los distintos genes están separados entre sí por regiones cortas de ADN que constituyen las regiones intergénicas. Algunos genes poseen una única copia por genoma (Ivens *et al.*, 1998). Sin embargo, con frecuencia los genes presentan varias copias, siendo habitual que exista una elevada conservación en la secuencia de las regiones codificantes, encontrándose mayor divergencia en las regiones no traducidas 5'UTR y 3'UTR, como ocurre con los genes que codifican la histona H2A (Soto *et al.*,

2003) de *L. infantum*. En otros casos, como el gen que codifica la gp63, se reportan numerosas regiones variables producto de recombinaciones intragénicas, que alternan con regiones conservadas, lo cual se relaciona con la heterogeneidad de las presiones selectivas y se pudiera relacionar con la evolución adaptativa del parásito (Victoir y Dujardin, 2002).

2.11.2 Kinetoplasto

Es una estructura celular inusual en la naturaleza que contiene 10^7 pares de bases de ADN mitocondrial o kDNA que representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito, está formado por una red de moléculas circulares, maxicírculos homogéneos y minicírculos heterogéneos, concatenadas de forma covalente (Simpson *et al.*, 1989). Los maxicírculos contienen una región conservada de 16-17Kb y una región no codificante, que es altamente variable entre cepas y especies (Flegontov *et al.*, 2006).

2.12 Importancia del choque térmico en el ciclo de vida de *Leishmania*

Durante la transmisión de *Leishmania*, el parásito se enfrenta a dos situaciones de estrés: el aumento de temperatura y el descenso de pH. Mientras que en el insecto poiquilotermo los promastigotes de *Leishmania* se encuentran a temperaturas de 22-28°C, tras su transmisión al hospedero mamífero homeotermo quedan expuestos a temperaturas de 31-35°C en el caso de las especies dermatrópicas, o a temperaturas de 37°C en el caso de las especies viscerotrópicas (Folgueira *et al.*, 2006). Por tanto, para asegurar su supervivencia en el mamífero, *Leishmania* posee mecanismos de termotolerancia, para lo cual resulta fundamental la respuesta al choque térmico desencadenada durante la transmisión (Zilberstein y Shapira, 1994).

2.12.1 La proteína de choque térmico (HSP70) en *Leishmania*

Las proteínas de choque térmico son las que garantizan la termotolerancia de estos parásitos (Zilberstein y Shapira, 1994). Dentro de ellas, la familia de proteínas HSP70 están entre las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución y se presentan en todo tipo de organismos. Comprenden formas inducidas por la temperatura (HSP70) y proteínas que se expresan de forma constitutiva (HSC70) (Folgueira y Requena, 2007).

Las proteínas pertenecientes a esta familia se localizan en una amplia variedad de compartimentos celulares, como: citoplasma (DNAk, HSP70, HSC70), retículo endoplasmático, mitocondrias (mHSP70) y cloroplastos. Su estructura se caracteriza por la presencia de un dominio de unión al ATP en la mitad amino terminal, y una parte carboxilo terminal responsable de la unión a polipéptidos. Su actividad se basa en la unión, controlada por la hidrólisis de moléculas de ATP, a segmentos peptídicos hidrófobicos (Folgueira y Requena, 2007). Un tipo en particular, las proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70), están altamente conservadas tanto en los procariotas como en eucariotas, en lo referente a secuencia y función y tienen gran importancia como chaperonas, el ensamblaje de proteínas y el transporte (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).

Leishmania major es la primera especie en la que se reporta la organización y expresión de los genes *hsp70* (Lee *et al.*, 1988). En esta especie se describe la presencia de cinco genes *hsp70*, cuatro de ellos organizados en tándem, mientras que el quinto gen se localiza en un locus diferente, dentro del mismo cromosoma. Estudios preliminares realizados en la especie *L. donovani* indican la existencia de 12 a 15 copias de los genes *hsp70*, localizadas en el mismo cromosoma y con la misma disposición (MacFarlane *et al.*, 1990).

Más tarde, se postula la existencia de siete genes *hsp70* en *L. amazonensis* y un octavo localizado en el mismo cromosoma que los anteriores, pero en una posición más alejada (Bock y Langer, 1993). En *L. infantum*, hay seis copias del gen *hsp70*. Todos los genes presentan una elevada homología de secuencia tanto en su región 5'UTR, como en la región codificante, salvo la región 3'UTR del gen situado en el extremo 3' del tándem (denominada 3'UTR-II) que es altamente divergente en secuencia con respecto a la misma región de las copias restantes (3'UTR-I). Por ello, a los genes *hsp70* 1-5 se les denomina *hsp70-I*, mientras que el gen *hsp70-6* se denomina como *hsp70-II* (Quijada *et al.*, 1997).

Basados en esta descripción, Folgueira y Requena (2007) reportan la organización genómica del loci HSP70 para otras especies, y concluyen que *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum* tienen una organización muy similar: varios genes organizados en tándem en

su mayoría de tipo *hsp70-I*, y una sola copia del tipo *hsp70-II*. En el caso de *L. mexicana* y *L. amazonensis*, tienen una organización idéntica entre ellos, con seis y siete genes *hsp70-I* y una copia *hsp70-II*, respectivamente, aunque difieren ligeramente de los anteriores al no compartir los mismos sitios polimórficos. *L. braziliensis* presenta la organización genómica más divergente entre las estudiadas, al presentar varias copias, aún no determinadas, del gen *hsp70-I* y ninguna del tipo *hsp70-II*. (Folgueira y Requena, 2007).

Los genes que codifican las proteínas HSP70 también se utilizan ampliamente en estudios filogenéticos de diferentes parásitos, como *Cryptosporidium* spp. (Sulaiman *et al.*, 2000; Langkjaer *et al.*, 2007), *Babesia* spp. (Yamasaki *et al.*, 2002; 2007), *Giardia* spp. (Arisue *et al.*, 2002a), *Entamoeba* spp. (Arisue *et al.*, 2002a), *Microsporidium* spp. (Arisue *et al.*, 2002a) y *Blastocystis hominis* (Arisue *et al.*, 2002).

2.13 Identificación o tipificación de especies

La relación existente entre la entidad que parasita y la presentación clínica de la enfermedad, la conveniencia de realizar el seguimiento clínico, fundamentalmente en los casos donde exista posibilidad de evolución hacia una manifestación mucocutánea, la realización de estudios epidemiológicos que involucran vectores y reservorios (Ferroglia *et al.*, 2006; Sobrino *et al.*, 2008) y la diferente respuesta al tratamiento que presentan algunas especies (Arévalo *et al.*, 2007; Llanos-Cuentas *et al.*; 2008) son razones que justifican la necesidad de identificar la especie de *Leishmania* que parasita.

2.13.1 Identificación mediante patrones electroforéticos de isoenzimas (MLEE siglas en inglés)

Es una herramienta muy efectiva que constituye el método de referencia, y se basa en el análisis de la movilidad electroforética de grupos de enzimas que conforman zimodemas. De acuerdo a la similitud entre los distintos zimodemas, se pueden establecer agrupaciones para las distintas especies (Rioux *et al.*, 1990). Su ventaja fundamental es la posibilidad de caracterizar diferentes regiones del genoma, lo cual es importante para estudiar la genética de poblaciones, pero también posee varios

inconvenientes: como la técnica detecta diferencias en la movilidad proteica, las aloenzimas que posean una movilidad electroforética indistinguible no se pueden detectar (Schönian *et al.*, 2003). Por otra parte, su ejecución requiere una masa abundante de parásitos y por tanto de condiciones para el cultivo masivo, consume mucho tiempo, es laboriosa, costosa y posee un poder discriminatorio relativamente bajo (Bañuls *et al.*, 2007).

2.13.2 Identificación mediante PCR

Para identificar o tipificar especies mediante PCR se pueden usar cebadores especie-específicos en áreas endémicas donde se presentan varias especies, o para estudios de vectores y reservorios. La mayoría de los trabajos reportan protocolos para distinguir especies del Viejo Mundo, en lo fundamental *L. donovani* y *L. infantum*, basados en el gen que codifica la *cpb* (Hide y Bañuls, 2006), otras regiones del mismo gen para identificar las cinco especies fundamentales de esa región (Laurent *et al.*, 2009), así como un fragmento del gen que codifica la HSP70 para identificar *L. donovani* (Arora *et al.*, 2008).

Por su parte, en el Nuevo Mundo se proponen protocolos para identificar especies de ambos subgéneros por amplificación de la región no traducida de la G6PD (Castilho *et al.*, 2003) y la diferenciación de *L. braziliensis* y *L. amazonensis* con cebadores especie-específicos de kDNA (Volpini *et al.*, 2004). Cuando se emplean cebadores específicos del género, la identificación se logra mediante el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (Schönian *et al.*, 2003).

2.13.3 Identificación mediante el polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado (PCR-RFLP)

El polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP siglas en inglés) del producto de la PCR permite detectar variaciones menores en un gen, donde una sola sustitución de base crea o elimina un sitio capaz de ser digerido por una endonucleasa de restricción específica (Bañuls *et al.*, 2007). Se notifican múltiples dianas genéticas para desarrollar la técnica, que se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características y aplicación de las dianas genéticas más utilizadas para la identificación de especies del género *Leishmania* mediante PCR-RFLP.

Nombre	Secuencia correspondiente	Nivel de diferenciación	Referencias
(IRT) ITS-SSU-LSUrRNA	Espaciadores internos de la transcripción entre las unidades codificantes del ARN ribosomal (ITS (SSU-LSU) rRNA	Especies del Nuevo Mundo	Cupolillo <i>et al.</i> , 1995.
(gp63)	Gen que codifica la glicoproteína de 63 kd.	Especies del subgénero <i>L. (Viannia)</i> Especies de los subgéneros <i>L. (Leishmania)</i> y <i>L. (Viannia)</i> del Nuevo Mundo. SD: 85%	Victoir <i>et al.</i> , 2003.
kDNA	ADN del kinetoplasto	Identificación de distintas especies de <i>Leishmania</i> spp. SD: 75,7-100%	Volpini <i>et al.</i> , 2004 Bensoussan <i>et al.</i> , 2006
ITS-1	Espaciadores internos de la transcripción	Especies del Nuevo y Viejo Mundos, <i>L. tropica</i> y <i>L. aethiopica</i> , indistintamente.	Schönian <i>et al.</i> , 2003 Gadisa <i>et al.</i> , 2007
(cpb)	Gen que codifica la cisteino proteinasa B	Especies del Complejo Donovan	Quispe-Tintaya <i>et al.</i> , 2004
(PRSI)	Final de la subunidad ribosomal pequeña y los espaciadores internos de la transcripción de genes ribosomales ITS-(SSU-LSU) rRNA	Especies de los subgéneros <i>L. (Leishmania)</i> y <i>L. (Viannia)</i> del Nuevo Mundo SD: 85,7%	Rotureau <i>et al.</i> , 2006
mini-exon	Genes que codifican los minielexones o "spliced leader" (SL)	Diferenciación de especies del Viejo Mundo y Nuevo Mundo SD: 89,7%	Marfurt <i>et al.</i> , 2003; 2003a
hsp70	Genes que codifican la proteína de 70kDa	Diferenciación de especies del Nuevo Mundo, fundamentalmente del subgénero <i>L. (Viannia)</i> SD: 100%	García <i>et al.</i> , 2004 ; 2007.

Leyenda: SD: Indica la sensibilidad diagnóstica de la PCR que sirve de base a la identificación, en aquellos casos en que se reportó.

La PCR-RFLP facilita la identificación a diferentes niveles taxonómicos (género, complejo y especies) (Eresh *et al.*, 1994; Tojal da Silva *et al.*, 2006). Se aplica como parte del diagnóstico de la leishmaniasis tanto en áreas endémicas donde existen varias

especies del parásito, como en casos importados, lo cual es relevante para la medicina del viajero y centros de referencia o investigación (Schönian *et al.*, 2003). La técnica permite analizar diversas muestras clínicas, como aspirados de médula ósea y nódulos, biopsia y raspado de piel, muestras de sangre (Akkafa *et al.*, 2008; Jamjooon y Sultan 2009) y conjuntiva (Strauss-Ayali *et al.*, 2004).

Los fragmentos generados por la restricción específica de los productos de amplificación se analizan mediante visualización de la electroforesis en gel de agarosa, que es el método más comúnmente empleado (Rotureau *et al.*, 2006; Alves da Silva *et al.*, 2010) o a través de la tinción de plata, que resulta más sensible pero económicamente más desventajosa (Llanos-Cuentas *et al.*, 2008).

García y colaboradores (2004) notifican la tipificación de 34 muestras clínicas en las que se identificó *L. braziliensis* y *L. lainsoni* mediante la PCR-RFLP basada en la amplificación del gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática. Adicionalmente, estos autores demuestran la existencia de patrones de bandas compartidos para las especies *L. braziliensis*/*L. peruviana* y *L. guyanensis*/*L. panamensis* al utilizar *HaeIII*, que resultó la endonucleasa de mayor utilidad. En este trabajo, se evidencia la superioridad de la resolución electroforética capilar (2100 Bioanalyzer capillary electrophoresis system; Agilent Technologies, Mountain View, California, EUA), que tiene mayor poder discriminatorio que la electroforesis en gel de agarosa, pero es prácticamente desconocida y de poca aplicación en los países endémicos de esta enfermedad, debido a su alto costo (Reithinger y Dujardin, 2007). Poco después, en el 2007, se aplica esta metodología al análisis de muestras clínicas de pacientes con leishmaniasis cutánea obtenidas de forma no invasiva en Bolivia (García *et al.*, 2007), lo cual resulta de gran importancia para su aplicación diagnóstica. Desde entonces, no se han abordado nuevos acercamientos para detectar o identificar individualmente otras especies utilizando esta diana genética, ni se ha profundizado en el análisis de otras entidades de importancia médica.

La PCR-RFLP también se aplica a la identificación de parásitos en vectores y reservorios, lo que ofrece una ventaja adicional para el empleo de esta metodología a pesar del desarrollo posterior de otros métodos de mayor sofisticación tecnológica y en consecuencia, costo elevado (Kato *et al.*, 2008; Terayama *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2007; Sobrino *et al.*, 2008).

2.13.4 Identificación mediante la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD siglas en inglés)

Este método relativamente simple se basa en el empleo de pequeños cebadores arbitrarios para desarrollar la PCR bajo condiciones que favorecen la detección de varios sitios polimórficos en el ADN (Ishikawa *et al.*, 2002).

En cambio, la técnica requiere del cultivo de parásitos puesto que los cebadores, que se sintetizan al azar, pueden provocar la amplificación de bandas inespecíficas a partir de cualquier ADN presente en la muestra, lo cual restringe su uso e impide la identificación en muestras clínicas (Bañuls *et al.*, 2007).

2.13.5 Identificación múltiple mediante microsatélites (MLMT siglas en inglés)

Detecta las variaciones en la extensión de secuencias de nucleótidos de 10-20 bases repetidos, denominados microsatélites. El genoma de *Leishmania* es rico en microsatélites, y el dinucleótido CA es el más abundante (Rossi *et al.*, 1994). En lo fundamental, los microsatélites son especie-específicos y para realizar los análisis se deben desarrollar diversos juegos de marcadores, tomando en cuenta la información disponible de los genomas secuenciados (Ivens *et al.*, 2005). Los microsatélites se han convertido en uno de los principales marcadores genéticos en estudios de filogenia de poblaciones y epidemiología molecular (Al-Jawabreh *et al.*, 2008).

Su aplicabilidad a muestras clínicas, reproducibilidad y la posibilidad de almacenar los resultados en bases de datos fácilmente intercambiables constituyen las principales ventajas. Recientemente, se reportó la discriminación de cepas de *Leishmania* del subgénero *L. (Viannia)* según su origen geográfico e incluso dentro de un área común de

endemicidad utilizando esta metodología (Oddone *et al.*, 2009). Su desventaja consiste en la necesidad de utilizar cebadores conjugados con fluorógenos, que permitan detectar las variaciones de los marcadores amplificados mediante análisis automatizados de los fragmentos, lo que se traduce en un alto costo del equipamiento.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio y contexto de la investigación

Se realizó un estudio experimental y descriptivo en el periodo de tiempo comprendido entre los años 2006 al 2010, fundamentalmente en los laboratorios del IPK. La investigación se enmarcó en un proyecto para fortalecer la capacidad para el diagnóstico molecular de leishmaniasis, financiado por la Cooperación belga con Cuba y con la colaboración de países endémicos de esta enfermedad.

3.2 Universo de trabajo

El universo de trabajo estuvo integrado por cepas y aislamientos de *Leishmania* caracterizados como referencia, aislamientos clínicos primarios de parásitos, muestras clínicas, y muestras de ADN de otros microorganismos infecciosos, todos los cuales se detallan a continuación.

3.2.1 Cepas de referencia

Se utilizaron como referencia 147 cepas y aislamientos caracterizados que fueron donados por distintas instituciones e investigadores (tabla 3). Estos parásitos son representativos de 16 especies del Nuevo y Viejo Mundo. La clasificación de especie en los aislamientos se realizó de acuerdo a los patrones de isoenzimas (método de referencia) así como a las características de los genes que codifican para *cpb*, ITS y *gp63*, determinadas en los laboratorios de los países de origen. Los códigos y la procedencia individual de cada cepa se pueden consultar en el anexo 2.

Para mantener los parásitos *in vitro* se utilizó el medio de Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor a 56°C, y una mezcla de estreptomicina y ampicilina a 250 µg/mL y 100 UI, respectivamente. Se

incubaron a 26 °C de temperatura y se realizaron pases sucesivos cada siete días, alternando a partir del quinto pase con la inoculación y reaislamiento en ratones BALB/c.

El mantenimiento *in vivo* de las cepas en el laboratorio de *Leishmania* del IPK se realizó utilizando líneas isogénicas de ratones hembras BALB/c, de seis a ocho semanas de edad y 18 a 22 g de peso, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Las mismas se mantuvieron según los requerimientos internacionales establecidos en el Bioterio del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK).

Tabla 3. Cepas de referencia y aislamientos caracterizados utilizados en el estudio

Especie/Subespecie	Número	Países de procedencia
<i>L. donovani</i>	n= 16	Kenya, Sudán, India, Etiopía
<i>L. donovani (archibaldi)</i>	n= 3	Etiopía, Sudán
<i>L. infantum</i>	n= 20	España, China, Francia, Portugal, Malta, Italia
<i>L. infantum (chagasi)</i>	n= 7	Brasil
<i>L. aethiopica</i>	n= 18	Kenya, Etiopía
<i>L. tropica</i>	n= 12	Sudán, India, Kenya, Namibia, Irak
<i>L. major</i>	n= 15	Kenya, Sudán, Israel, Arabia Saudita, Túnez, B. Faso
<i>L. amazonensis</i>	n= 4	Brasil, Bolivia
<i>L. garnhami</i>	n= 1	Venezuela
<i>L. mexicana</i>	n= 2	Belice, Perú
<i>L. peruviana</i>	n= 12	Perú
<i>L. braziliensis</i>	n= 15	Brasil, Bolivia, Perú
<i>L. naiffi</i>	n= 1	Brasil
<i>L. panamensis</i>	n= 2	Panamá
<i>L. guyanensis</i>	n= 9	Brasil, Guyana Francesa
<i>L. lainsoni</i>	n= 10	Bolivia, Perú

3.2.2 Aislamientos clínicos primarios

Se utilizaron parásitos aislados y axenizados mediante cultivo sucesivo, obtenidos con anterioridad a partir de muestras de biopsias y raspados de pacientes con leishmaniasis cutánea. Estos parásitos en cultivo se consideraron para este trabajo como aislamientos primarios no caracterizados (n=84) y provenían de pacientes atendidos en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Al momento de ser donados para este estudio, se desconocía su clasificación de especie.

3.2.3 Muestras clínicas humanas

Se utilizaron 73 muestras clínicas humanas, provenientes de pacientes con antecedentes clínicos y epidemiológicos de infección con *Leishmania* y diagnosticados en los países de origen. De ellas, 48 provenían de países del Nuevo Mundo y 25 del Viejo Mundo (tabla 4). En algunos casos se trabajó directamente a partir de la muestra, y en otros se utilizó el ADN obtenido previamente en los laboratorios donantes. Las muestras de lesiones cutáneas se tomaron del borde indurado de la lesión, con auxilio de jeringuilla, bisturí o un ponche desechable de 4 o 2 mm, según el tipo de muestra a coleccionar. En cada lugar de procedencia se aplicó el protocolo establecido, según las indicaciones éticas necesarias para estos casos, expresadas en la Declaración de Helsinki.

Tabla 4. Muestras clínicas utilizadas en el estudio

Área geográfica	País de procedencia	Número analizado	Tipo de muestra		Criterios de positividad
Nuevo Mundo n= 48	Colombia	28	24 lesión	biopsias de	Directo/Cultivo/PCR kDNA *
			4 lesión	raspados de	Directo/Cultivo/ PCR kDNA *
	Cuba (casos importados)	2	2 lesión	biopsias de	Directo/Cultivo/ PCR kDNA *
	Perú	18	6 lesión	biopsias de	Directo/Cultivo/ PCR kDNA *
Viejo Mundo n= 25			11 lesión	raspados de	Directo/Cultivo/ PCR kDNA *
	Sudán	18	1 aspirado de lesión		Directo/Cultivo/ PCR kDNA *
			2 aspirados de médula ósea		Parasitológico, Serológico **
	Turquía	7	4 material de lesión		Parasitológico, Serológico**
			2 sangre periférica		

Leyenda:

* muestras positivas por al menos dos de los tres métodos citados

** muestras positivas por uno o dos métodos: examen microscópico directo del material obtenido teñido con Giemsa y ensayo de aglutinación directa.

El total de muestras clínicas se utilizó para verificar la detección de ADN de *Leishmania* mediante la reacción en cadena de la polimerasa que amplifica el gen que codifica la HSP70 del parásito: PCR-*hsp70*. Posteriormente, se realizó la identificación de especies en una parte de las muestras que resultaron positivas, mediante PCR-*hsp70*/RFLP, según el protocolo correspondiente.

3.2.4 Muestras de ADN de otros agentes infecciosos

Se utilizaron muestras de ADN de distintos agentes infecciosos. Provenientes del Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología, IPK: *Toxoplasma gondii*; del Laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amheres (IMT-A): *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, del Departamento de Bacteriología del IPK: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida parasilopsis*, *Cryptococcus neoformans*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium habana*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* y del Departamento de Virología del IPK: *Herpes zoster*, *Cytomegalovirus* y *Herpes simplex*.

3.3 Obtención de ácido desoxiribonucleico (ADN)

3.3.1 Obtención de ADN genómico:

Se siguió el método reportado por Sambrook *et al.*, (1989) con algunas modificaciones. El ADN genómico se obtuvo a partir de parásitos mantenidos en cultivo, tras centrifugación y lavado con PBS (tampón fosfato 0,1 mol/L, NaCl 0,15 mol/L) pH= 7,2. El sedimento se resuspendió en 500µL tampón de lisis NaCl (0,15 mol/L) EDTA (0,1 mol/L) y SDS (0,5%), al que se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 0,1 mg/mL. Tras 60 min a 50°C, se realizó una extracción con 500 µL de fenol y cloroformo, en relación 25/24, y posteriormente, se centrifugó a 8 000g por 10 min. A la fase superior se añadió 500 µL de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico en relación 25/24/1 repitiendo la centrifugación. Al sobrenadante obtenido se añadió 0,1 volúmenes de NaAc (3mol/L) pH=5,3 y dos volúmenes de etanol absoluto, dejando reposar en hielo 30 minutos o más. Tras centrifugación a 10 000g por 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó con 500 µL de etanol al 80% centrifugando en iguales condiciones. El sedimento se secó a temperatura ambiente y el ADN se resuspendió entre 10 y 20µl de agua bidestilada estéril según el número de parásitos de partida. En otros casos, se utilizó el ADN obtenido por los distintos laboratorios que aportaron las muestras.

3.3.2 Obtención de ADN de muestras clínicas

El ADN proveniente de las biopsias de lesión, raspados de lesión y aislamientos primarios de pacientes con sospecha de leishmaniasis, se obtuvo utilizando el estuche de extracción QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, se resuspendió en volúmenes entre 10-50µl de agua, en dependencia del tamaño de la muestra inicial. Para el resto de las muestras el ADN se obtuvo según los protocolos establecidos en los laboratorios donantes.

3.3.3 Verificación de la calidad del ADN

La calidad del ADN obtenido a partir de las cepas se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón de corrida tris-borato-EDTA, tris-borato (0,045 mol/L), EDTA (0,001 mol/L), que contenía bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La corrida electroforética se realizó con la fuente (Eurogentec Mupid exU, Seraing, Bélgica), aplicando las muestras disueltas en azul de bromofenol (0.25% en solución de sacarosa 40%), a 120V por 30 min. Los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo-CLP, Bruselas, Bélgica).

3.3.4 Determinación de la concentración y pureza del ADN

La concentración de ADN genómico se determinó mediante lectura de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Spectrophotometer JASCO V-630, Tokio, Japón) y teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a 260 nm, corresponde con 50 µg de ADN de doble cadena, según la fórmula:

$$\text{concentración de ADN (}\mu\text{g/}\mu\text{l)} = \frac{50 \times \text{dilución} \times \text{D.O}_{260 \text{ nm}}}{1000}$$

La lectura también se realizó a 280 nm, longitud de onda a la cual absorben las proteínas. Para determinar la pureza del material se utilizó la siguiente relación:

D.O 260 nm / 280 nm debe estar en un rango entre 1.8- 2.0

Este procedimiento se realizó para determinar la concentración de ácidos nucleicos durante la optimización de la PCR-*hsp70* y en los estudios de sensibilidad analítica.

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los genes de interés a lo largo del estudio. En primer lugar el gen que codifica la HSP70, que constituye el blanco principal de nuestro análisis (García *et al.*, 2004). Este gen se amplificó para la obtención de las secuencias nucleotídicas correspondientes a las cepas representativas de las 16 especies del parásito, lo que posibilitaría un estudio de las relaciones filogenéticas, un análisis teórico de secuencias y del polimorfismo genético. Adicionalmente, se amplificó a partir del ADN obtenido del resto de las cepas de referencia para estudiar las diferencias inter e intra específicas, así como a partir de los aislamientos primarios y muestras clínicas, para conocer las posibilidades de detección en los distintos tipos de muestras y con el fin de determinar, posteriormente, la especie infectante en algunos casos, mediante PCR-RFLP.

Además, como método confirmatorio para verificar la presencia de ADN del parásito, en las diluciones donde se estudió la sensibilidad analítica de la PCR-*hsp70*, se amplificó el gen que codifica la región 18S del ADN ribosomal específico de *Leishmania*, cuyo producto de amplificación es un fragmento pequeño (115 pb) (Deborggraeve *et al.*, 2008).

3.4.1 PCR-*hsp70*

3.4.1.1 Cebadores para la amplificación del gen *hsp70*

Se utilizaron los cebadores propuestos por García *et al.*, 2004 y sintetizados por SIGMA Genosys (Bornem, Bélgica). La figura 8 muestra un esquema del gen y el fragmento amplificado con la ayuda de los cebadores, cuyas secuencias (5'-3') en cada caso son:

hsp70 positivo: GACGGTGCCTGCCTACTTCAA

hsp 70 negativo: CCGCCCATGCTCTGGTACATC

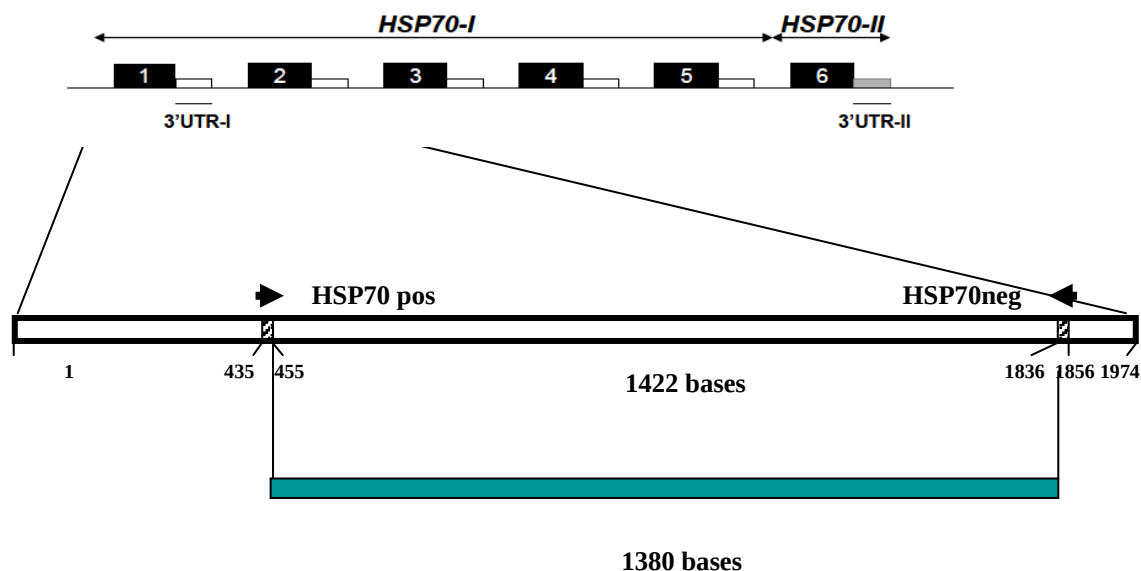


Figura 9. Representación gráfica de la estructura del gen *hsp70*.

Leyenda: En la parte superior se representan varios genes organizados en tándem (1-5) con sus extremos 3'UTR-I y las regiones intergénicas. Al final se muestra un gen HSP70-II, cuyo extremo 3'UTR-II lo diferencia del resto. Los cebadores HSP70 pos (435-455) y HSP70 neg (1836-1856) indican el fragmento amplificado en este trabajo, de 1422 pb, y en la parte inferior, el fragmento secuenciado, de 1380 pares

3.4.2 Optimización de la PCR-*hsp70*

Para optimizar la PCR *hsp70* se utilizó la cepa de *L. braziliensis* MHOM/BO/94/CUM29. La mezcla de reacción (50µl), contenía 200µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP); 1X del tampón (Tris-HCl 670 mmol/L pH=8,8; (NH₄)₂SO₄ 160 mmol/L; Tween 20 0,1%) y cantidades variables de MgCl₂ (1,5; 2,0; 2,5 y 3 mmol/L); enzima SilverStar Taq DNA polimerasa (1; 1,5; 2; 2,5 U) y cebador (0,2; 0,4; 0,6; y 0,8 µmol/L). Además, 0,25 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 10 ng de ADN genómico. Se incluyó en todos los experimentos agua destilada como control negativo. Las reacciones de amplificación se realizaron en los termocicladores PTC-0150 Mini-Cycler (MJ Research, Waltham, MA, EUA ó MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad, Foster City, CA, EUA).

3.4.3 Protocolo 1 de amplificación de la PCR-*hsp70*

Este protocolo se utilizó en todos los experimentos descritos en este trabajo, excepto para la obtención de los productos de amplificación de la *hsp70* que se secuenciaron. La

mezcla contuvo las cantidades y concentraciones de los reactivos determinadas en 3.4.1.2. El protocolo consistió: desnaturalización inicial (94°C, 5 min) seguido de 33 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 seg), hibridación (61°C, 1min) y extensión (72°C, 3 min), con una extensión final a 72°C, 8 min, para obtener un amplicón de 1422pb.

3.4.4 Protocolo 2 de amplificación de la PCR-*hsp70*

Este protocolo se aplicó para realizar la amplificación de los productos de la *hsp70* que se secuenciaron, debido a que se empleó una enzima polimerisadora diferente. La longitud del amplicón esperado es la misma que en 3.4.3. La mezcla de reacción (50µl) contuvo: tampón de la enzima Qiagen HotStar Taq Plus (1X) (Tris-HCl 670 mmol/L pH=8,8; (NH₄)₂SO₄ 160 mmol/L; Tween 20 0,1%); MgCl₂ (1,5mM); solución Q (1X), dNTP (200 µmol/L de cada uno), enzima Hot StarTaq Plus DNA polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania) (0,5 U), cebador (0,4 µM de cada uno), y 10 ng de ADN genómico. En correspondencia, el protocolo desarrollado consistió: desnaturalización inicial 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos cada uno consistente en (94°C, 40 seg), (61°C, 1 min) y (72°C, 2 min) con una extensión final a 72°C, 8 min.

3.4.5 PCR-18S

Los cebadores utilizados para esta reacción se reportaron previamente por Deborggraeve y colaboradores (2008) y se sintetizaron por Sigma Genosys. Las secuencias (5'-3') en cada caso son:

18S-L-positivo CGTAGTTGAACTGTGGGCTGTGC

18S-L-negativo ACTCCCGTGTTCCTTGTTTCTTTGAA

La mezcla de reacción (25µl) contuvo: tampón de la enzima Qiagen HotStar Taq Plus (1X) (Tris-HCl 670 mmol/L pH=8,8; (NH₄)₂SO₄ 160 mmol/L; Tween 20 0,1%); enzima Qiagen HotStar Taq Plus (0,5U); dNTPs (200 µmol/L de cada uno); MgCl₂ 25 mmol/L; cebadores 0,8µmol/L, BSA (Promega, EUA), (0,1 mg/mL) y un µL de las distintas diluciones de ADN ensayadas en el experimento de sensibilidad, o del ADN obtenido de las muestras clínicas a confirmar en el estudio de la sensibilidad diagnóstica, indistintamente. Se incluyó un control negativo con agua en todos los casos. El programa utilizado para la amplificación fue: desnaturalización inicial: (95°C, 5 min), seguido de 40

ciclos: desnaturalización (94°C, 30 seg), hibridación (60°C, 30seg), y extensión (72°C 30 seg). Finalmente, una extensión a (72°C, 5 min).

3.4.6 Verificación de la amplificación

Los resultados de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % en tampón de corrida tris-borato-EDTA: tris-borato (0,045 mol/L), EDTA (0,001 mol/L) con la fuente (Eurogentec Mupid exU, aplicando las muestras disueltas en azul de bromofenol al 0.25%, a 8,5 V/cm durante 30 min. La electroforesis se visualizó en un transiluminador de luz UV (Apollo-CLP).

3.4.7 Precipitación de los productos de la PCR-*hsp70*

A los productos obtenidos en las reacciones de PCR-*hsp70* se les añadió en cada caso dos volúmenes de agua, 1/10 volumen de NaAc 3mol/L pH=5,4 y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcló y dejó reposar a -20°C por un mínimo de 30 min. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 300g durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó con etanol 80% (v/v), en iguales condiciones. El precipitado de ADN se dejó secar completamente y se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril. La calidad de la precipitación se chequeó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, en las condiciones de corrida ya descritas en 3.4.6 y el producto se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.5 Análisis de parámetros analíticos de la PCR-*hsp70*

3.5.1 Sensibilidad analítica de la PCR-*hsp70*

Este experimento permitió conocer, tanto la concentración de ADN molde que resulta útil en la reacción de amplificación, como el nivel de detección de la misma. Se realizaron diluciones seriadas (1/10) en tampón TE desde 10 ng hasta 10 fg, utilizando ADN de cepas representativas de distintas especies: *L. braziliensis*: CUM29; *L. peruviana* LH2161; *L. naiffi* M5210; *L. guyanensis* 029- ZAV; *L. panamensis* M4039; *L. lainsoni* CUM 71; *L. mexicana* LH2312; *L. donovani* GILANI; *L. aethiopica* 161B; *L. infantum* LEM 2298; *L. chagasi* WC; *L. tropica* DD7; *L. major* L 137. Posteriormente, se realizó la PCR siguiendo las condiciones previamente normalizadas, en el mismo volumen final, y

los productos de amplificación de todas las diluciones realizadas se observaron en una corrida electroforética en las condiciones descritas en el acápite 3.4.6. Algunas de las diluciones de ADN (las cuatro últimas) se utilizaron para realizar la PCR-18S, con el fin de verificar la presencia de ADN en las muestras más diluidas.

3.5.2 Especificidad analítica de la PCR-*hsp70*

Para estudiar la especificidad analítica de la PCR, se utilizó como molde 10ng de ADN de los distintos microorganismos previamente mencionados en el acápite 3.2.4 Se realizó la reacción de amplificación de la *hsp70* en las condiciones de la PCR previamente normalizadas. Se preparó un tubo control positivo con igual cantidad de ADN de la cepa de *L. braziliensis* MHOM/BO/94/CUM29 y un control negativo con agua bidestilada estéril. El resultado se visualizó en una corrida electroforética en gel de agarosa (acápites 3.4.6).

3.5.3 Repetibilidad de la PCR-*hsp70*

Se comprobó la variabilidad intrínseca de la reacción o repetibilidad, realizando la PCR en tres días diferentes, utilizando los mismos reactivos, equipos, procedimientos y condiciones generales y ADN de cuatro especies: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. lainsoni*. Los resultados se comprobaron mediante electroforesis según se describió en el acápite 3.4.6.

3.5.4 Reproducibilidad de la PCR-*hsp70*

Se prepararon mezclas de reacción con las cantidades previamente normalizadas, utilizando como molde ADN genómico, o proveniente de muestras clínicas, para la amplificación del gen de la *hsp70* en distintas condiciones, tanto en el IPK, en el laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica, así como en el PECET, Universidad de Antioquia, Colombia. Las mezclas se amplificaron en los correspondientes termocicladores de cada laboratorio y se verificaron los resultados en corridas electroforéticas realizadas según las condiciones preestablecidas en cada uno.

3.6 Secuenciación y análisis del gen que codifica la proteína HSP70

3.6.1 Diseño de cebadores para la secuenciación de los productos de la PCR-*hsp70*

Se diseñaron seis cebadores internos complementarios a la región amplificada, con la ayuda del programa Web primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) (tabla 5). Se tuvieron en cuenta los criterios establecidos para este tipo de diseño, con el fin de poder secuenciar en ambos sentidos los productos de PCR de la *hsp70* de cada una de las especies de referencia de *Leishmania*. Para esto, se utilizaron las secuencias previamente reportadas en la base de datos de genes del Banco de Genes (GenBank) correspondiente a las siguientes especies: *L. braziliensis* (AF291716 y M87878), *L. amazonensis* (L14604 y L14605), *L. donovani* (X52314 y AY913843), *L. infantum* (X58798 y Y08020) y *L. major* (M36675). También se utilizaron las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del gen, reportados previamente por García *et al.*, (2004).

Tabla 5. Cebadores utilizados para realizar la secuenciación del fragmento amplificado mediante PCR del gen que codifica la HSP70 de *Leishmania* spp.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Posición de nucleótidos ¹
HSP70-F335	CACGCTGTCGTCCGCGACG	406-424
HSP70-R429	AACAGGTCGCCGCACAGCTCC	519-499
HSP70-2F	CTGAACAAGAGCATCAACCC	665-684
HSP70-2R	CTTGATCAGCGCCGTCATCAC	835- 815
HSP70-F893	GTTTCGACCTGTCCGGCATCC	964-983
HSP70-R1005	GTGATCTGTTGCGCTTGCC	1095-1076

Leyenda: 1 La posición de hibridación de los cebadores es relativa a la secuencia *hsp70* para *L. braziliensis* con número de acceso en el Banco de genes M87878.

A los cebadores propuestos se les determinó la temperatura de fusión, el porcentaje de guanina-citosina (GC), y se analizó la probabilidad de complementariedad en el extremo 3', la potencialidad de formar lazos y de auto hibridación.

Para ello, se utilizó el Programa Informático Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basis.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Teniendo en cuenta estas características y cumpliéndose además que los mismos se correspondieran con regiones conservadas en las secuencias de las distintas especies reportadas, se re-diseñaron manualmente y finalmente se propusieron los cebadores para la secuenciación. Todos los oligonucleótidos

utilizados fueron sintetizados por Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/product-lines/standard-synthesis.html>).

3.6.2 Secuenciación

Se realizó la secuenciación de los productos de amplificación de la PCR-*hsp70* en las especies de referencia de *Leishmania* que aparecen señaladas en el anexo 2 (n=44) con el objetivo de conocer la secuencia nucleotídica de los genes que codifican la proteína HSP70. Se secuenciaron ambas cadenas de los amplicones generados utilizando los cebadores diseñados para cada una de las cepas estudiadas, representativas de las especies de *Leishmania*, excepto los 40 nucleótidos contenidos en los extremos correspondientes a la región complementaria a los cebadores de los que se secuenció una cadena solamente. Para obtener las secuencias se utilizó el juego “Big Dye terminator cycle-sequencing-ready-reaction kit” (Applied Biosystems, Foster, California, EUA), y el secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). Se obtuvo la secuencia consenso de cada cepa estudiada (de ambas cadenas) utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) con ajuste manual.

3.6.3 Alineamiento de secuencias

Se alinearon todas las secuencias correspondientes a los productos *hsp70* amplificados para cada cepa (n=44), representativas de las 16 especies de *Leishmania* estudiadas, procedentes del Nuevo y Viejo Mundo, así como otras secuencias previamente publicadas en el Banco de genes (n=7), para un total de 51. A este alineamiento se sumó también una secuencia reportada para *L. tarantolae*, cepa TarII, de origen desconocido. No se tomaron en cuenta algunas secuencias reportadas con anterioridad que se correspondían con fragmentos más cortos, aquellas que no contenían en su totalidad el fragmento de gen en análisis, y otras con marcada diferencia con relación al resto de las reportadas u obtenidas.

El alineamiento se realizó utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 4, Tamura *et al.*, 2007, (<http://www.megasoftware.net>). El mismo permitió caracterizar algunos elementos de las secuencias nucleotídicas del gen que codifica la *hsp70* en las distintas especies, y sirvió de marco de referencia para los

estudios filogenéticos y al análisis del polimorfismo genético realizados con posterioridad.

3.6.4 Análisis filogenético

Para realizar un análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas se tomó como base el alineamiento descrito en 3.6.3. El programa MEGA se utilizó para construir los árboles filogenéticos basados en los métodos de distancia y carácter. Las distancias de las secuencias nucleotídicas se estimaron según el modelo Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980) y los árboles se construyeron por los métodos de Unión al vecino (*Neighbor-Joining* en inglés) (Saitou y Nei, 1987), Evolución Mínima (*Minimum Evolution* en inglés) (Rzhetsky y Nei, 1992), y Máxima Parsimonia (*Maximum Parsimony* en inglés) (Eck y Dayhoff, 1966; Fitch, 1971). Las distancias de las secuencias aminoacídicas predeterminadas se determinaron utilizando el modelo de *p-distance* (Nei y Kumar, 2000). En el análisis se consideraron como grupo externo dos especies de *Trypanosoma* que estaban más cercanamente relacionadas con el género *Leishmania*: *T. cruzi*: cepa TINF/BR/63 CL Brener, de Brasil, código de acceso: XM_812645 y *T. rangeli* MHOM/HOND/--/H14, de Honduras, código de acceso: EF108422.

El soporte de los grupos monofiléticos se determinó por el método de *Bootstrap* (en inglés) (Felsenstein, 1985), utilizando 2000 réplicas. Se utilizó el 95% como valor de significación estadística para definir los grupos monofiléticos (Efron *et al.*, 1996) De manera adicional, se detectaron agrupaciones de secuencias por análisis de redes filogenéticas inferidas de las distancias *p*-no corregidas, por el método de red con el vecino utilizando el Programa SplitsTree4 (Huson, 1998; Huson y Bryant, 2006).

3.7 Estudio teórico de las secuencias y del polimorfismo genético

3.7.1 Análisis teórico utilizando la enzima *HaeIII*

Para analizar la posible variabilidad entre las distintas especies en este fragmento de gen, con relación a la digestión teórica con la enzima *HaeIII*, se utilizó el alineamiento descrito en 3.6.3. De esta forma, se identificaron las tallas de los fragmentos teóricos de la digestión para especies que no se habían estudiado previamente, y por consiguiente, los

patrones teóricos correspondientes a cada especie analizada, auxiliándonos del Programa DistinctiEnz (<http://www.bioinformatics.org/~docreza/cgi-bin/restriction/DistinctiEnz.pl>).

Se analizó también la existencia de posibles diferencias dentro de la misma especie, cuando el número de secuencias correspondientes así lo permitió.

3.7.2 Identificación de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas útiles para la identificación

Debido a la imposibilidad de discriminar individualmente todas las especies estudiadas por medio de la digestión del producto amplificado de la *hsp70* con *HaeIII*, se procedió a identificar los sitios polimórficos individuales (SNPs siglas en inglés) en las 51 secuencias, que permitieran tipificar de forma individual, el mayor número posible de especies. Para ello, se empleó el paquete informático MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Estos sitios polimórficos se correlacionaron posteriormente con posibles sitios de reconocimiento de distintas endonucleasas de restricción, utilizando el programa NEBcutter (<http://www.tools.neb.com/NEBcutter2>).

3.7.3 Propuestas de nuevas restricciones enzimáticas para la identificación

Se identificaron nuevas endonucleasas con probabilidades de lograr la identificación de especies necesaria, y se realizó un nuevo análisis teórico (como se explicó en 3.7.1) que ofreciera la talla teórica de los fragmentos de restricción generados por las nuevas enzimas propuestas y por consiguiente, los patrones teóricos de digestión enzimática.

También se analizó la probable presencia de diferencias intra-especie *in silico* en relación a las diferentes digestiones, tomando en cuenta las posibles variaciones en los sitios de reconocimiento de las enzimas para cada cepa analizada.

3.8 Ensayos de PCR y PCR-RFLP

Tras el análisis teórico, se realizó la PCR y sucesivamente, la PCR-RFLP, utilizando como molde el ADN del total de cepas de distinto origen geográfico (tabla 2, anexo 3) representativas de todas las especies en estudio.

3.8.1 PCR-*hsp70*

Se realizó la PCR-*hsp70*, siguiendo las condiciones previamente normalizadas y el protocolo descrito en 3.4.3, utilizando como molde para cada reacción el ADN proveniente de las 147 cepas de *Leishmania*. Los resultados de la amplificación se corroboraron según lo descrito en 3.4.6.

3.8.2 Restricciones Enzimáticas

Los productos amplificados se precipitaron (según se describió en 3.4.7) y se utilizaron para realizar las correspondientes restricciones enzimáticas. Para la restricción de los productos amplificados obtenidos mediante PCR *hsp70*, realizada en un volumen total de 10µl, se utilizó 5µl del ADN precipitado, tampón de la enzima (1X) (Tris-HCl 10 mol/L pH=8,5; MgCl₂ 10mol/L; KCl 100mol/L; BSA 0,1 mg/ml), y la enzima *Hae*III (1U) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se centrifugó brevemente previa incubación. Los tubos se colocaron en baño termostático a 37°C, y se incubó toda la noche. Posteriormente, los productos de la digestión se mezclaron con azul de bromofenol al 0.25% y finalmente, se realizó una corrida electroforética de todo el producto digerido (10 µl).

De acuerdo a los resultados, se realizaron segundas digestiones enzimáticas utilizando las enzimas que se identificaron en 3.7.3, siguiendo en todos los casos las instrucciones de los fabricantes para lograr una digestión completa, y utilizando la misma metodología general descrita previamente.

3.8.3 Análisis del tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado (PCR-RFLP)

El análisis del tamaño de los fragmentos producidos por la restricción enzimática de los productos amplificados (PCR-RFLP) se determinó por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3% (Gentaur, Bruselas, Bélgica), a 3.5 V/cm durante 2,5 horas. El marcador de peso molecular utilizado fue Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). A los fragmentos de restricción generados se les calculó la movilidad electroforética.

3.8.4 Determinación de los patrones de PCR- RFLP de cada especie

Se determinaron los patrones de bandas obtenidos mediante PCR-RFLP, para las cepas representativas de cada especie, y de acuerdo a la enzima utilizada en las restricciones enzimáticas. Posteriormente, se compararon con los patrones determinados en el análisis teórico descrito en 3.7.3.

3.9 Aplicación de la PCR-*hsp70* y PCR- *hsp70*/RFLP a la detección e identificación de *Leishmania* spp. en muestras biológicas

3.9.1 Aplicación de la PCR-*hsp70* a la detección de *Leishmania* spp.

Se realizó la PCR-*hsp70*, según fue descrito en 3.4.3, utilizando como molde el ADN obtenido de las distintas muestras clínicas a analizar, de diferente origen geográfico, para un total de 73 muestras clínicas analizadas. De igual forma, se analizó el ADN obtenido a partir de 84 aislamientos primarios del parásito. Los productos de amplificación obtenidos se precipitaron, según lo descrito en 3.4.7.

3.9.2 Determinación del porcentaje de positividad a la PCR-*hsp70*

Se calculó el porcentaje de muestras clínicas positivas a la PCR-*hsp70* del total de muestras consideradas como positivas en cada región, de manera independiente. Los criterios tomados en cuenta en cada caso fueron: para las muestras del Nuevo Mundo, se consideró la positividad por al menos dos de tres métodos parasitológicos: examen microscópico directo de frotis teñido con Giemsa, el cultivo en medio NNN del material obtenido de la lesión, el método de diagnóstico molecular de PCR-kDNA. Para el Viejo Mundo, se consideró el examen microscópico directo del material obtenido (lesión, aspirado) teñido con Giemsa y adicionalmente, el ensayo de aglutinación directa, para los casos de leishmaniasis visceral.

3.9.3 Aplicación de la PCR- *hsp70*/RFLP a la identificación de *Leishmania* spp.

El producto de amplificación precipitado (3.4.7), se digirió con la enzima *HaeIII* en las condiciones ya descritas (3.8.2). Se determinaron los patrones para esta enzima, correspondientes a cada muestra, y se comparó con los patrones determinados previamente para las cepas de referencia de cada especie, según se describió en 3.7.1.

De acuerdo a los resultados, se realizó una segunda digestión enzimática del producto de PCR-*hsp70*, acorde a lo descrito en 3.7.3, en las muestras cuyos patrones de restricción con *HaeIII* fueran compatibles con grupos de especies y no con entidades individuales, con el fin de determinar la especie infectante en cada caso.

IV. RESULTADOS

4.1 Desempeño analítico de la PCR- *hsp70* en la detección de *Leishmania* spp.

Se establecieron las condiciones y optimizaron los parámetros analíticos necesarios para lograr una amplificación adecuada del gen *hsp70* mediante PCR. Las condiciones óptimas de la mezcla de reacción fueron: concentración de cebadores (0,4 μmol/L de cada uno), MgCl₂ (1,5 mmol/L) y cantidad de la enzima polimerisadora empleada (1 U). Para otros parámetros se utilizaron las condiciones recomendadas por la literatura (García et al., 2004). Los resultados obtenidos en la evaluación de cada uno de estos componentes pueden observarse en la figura 10. Bajo estas condiciones, se obtuvo amplificación mediante PCR *hsp70* en las 16 especies de *Leishmania* analizadas.

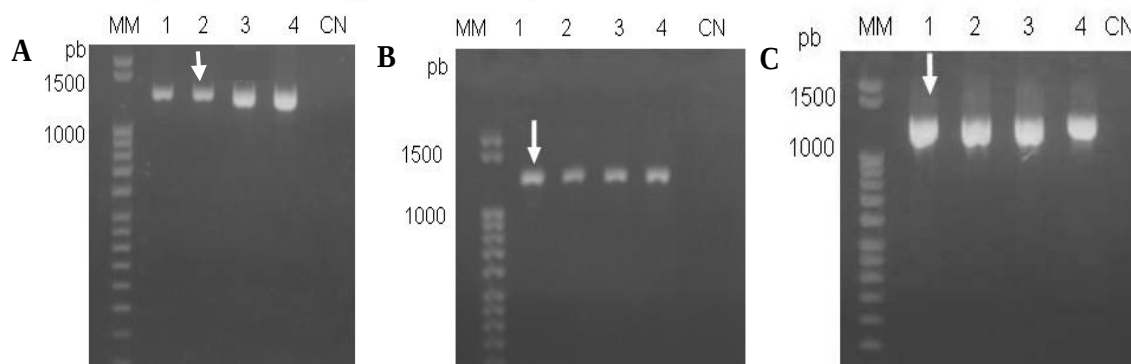


Figura 10. Optimización de la PCR-*hsp70*.

Leyenda: A: Concentraciones de cebadores evaluadas: carriles 1,2,3,4 corresponden con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μmoles/L de cebadores; B: Concentraciones de MgCl₂: carriles 1,2 3,4 corresponden con 1.5, 2, 2.5, 3 mmol/L. C: Cantidades de enzima *Taq* Pol evaluadas: carriles 1, 2, 3, 4: 1, 1.5, 2, 2.5 U. MM: Marcador de Peso molecular IV (Boehringer Mannheim, Alemania (el mismo para todos los casos), CN: control negativo.

Se obtuvieron amplicones de la talla esperada (1 422pb) cuando se utilizó ADN de las siete especies estudiadas con anterioridad, y de otras tres procedentes del Nuevo Mundo: *L. garnhami*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, así como de las seis especies del Viejo Mundo: *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum* y *L. archibaldi*, para un total de nueve especies estudiadas por primera vez.

La eficiencia de la amplificación no se comportó de la misma forma para todas las especies como se puede deducir de las bandas que se muestran en la figura 11, ya que se obtuvieron bandas de mayor intensidad para: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. panamensis* y *L. peruviana*, pertenecientes al subgénero *L. (Viannia)*, que en *L. lainsoni*, también miembro de *L. (Viannia)* y el resto de las analizadas, pertenecientes al subgénero *L. (Leishmania)*.

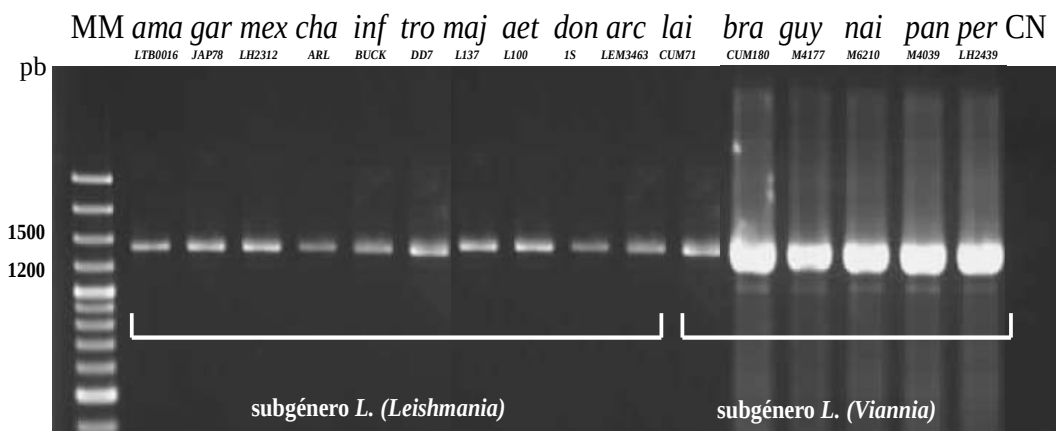


Figura 11. Resultados de la PCR-*hsp70* utilizando ADN de 16 especies de *Leishmania* spp. Leyenda: MM: Marcador de peso molecular: Gene Ruler 100bp Plus Ladder (MBI, Fermentas); productos de la amplificación en las distintas cepas señaladas, correspondientes a las especies: *ama*: *L. amazonensis*; *gar*: *L. garnhami*; *mex*: *L. mexicana*; *cha*: *L. infantum* (*chagasi*); *inf*: *L. infantum*; *tro*: *L. tropica*; *maj*: *L. major*; *aet*: *L. aethiopica*; *don*: *L. donovani*; *arc*: *L. archibaldi*; *lai*: *L. lainsoni*; *bra*: *L. braziliensis*; *guy*: *L. guyanensis*; *nai*: *L. naiffi*; *pan*: *L. panamensis*; *per*: *L. peruviana*; CN: control negativo. Aparecen señaladas las especies correspondientes a los distintos subgéneros.

El estudio de la sensibilidad analítica de la PCR-*hsp70* se realizó utilizando ADN de 13 especies representativas de ambos subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)* y como referencia, se comparó con la sensibilidad de la PCR-18S. La mayor sensibilidad de la PCR-*hsp70* se obtuvo para *L. braziliensis*, pues se detectó hasta 10 fg (10^{-5} ng) de ADN genómico del parásito (fig 12), última concentración en la cual se observó una banda de amplificación nítida. Igual nivel de detección se obtuvo para la PCR-18S, lo que puede corroborarse en la misma figura. El nivel de sensibilidad alcanzado se corresponde con la posibilidad de detección de aproximadamente un parásito de *L. braziliensis* (100-200 fg de ADN genómico de *Leishmania* spp. equivalen a un parásito).

Para el resto de las especies analizadas, la sensibilidad de la PCR-*hsp70* fue variable, con niveles de detección que oscilaron entre 0,1pg (100 fg) y 1ng de ADN (figura 12)

en rangos diferentes para cada subgénero: *L. (Viannia)* (10 fg-100 fg) y *L. (Leishmania)* (0,1 ng-1 ng). Por el contrario, y en correspondencia con lo observado en *L. braziliensis*, la detección de la PCR-18S en todos estos casos fue también de 10 fg.

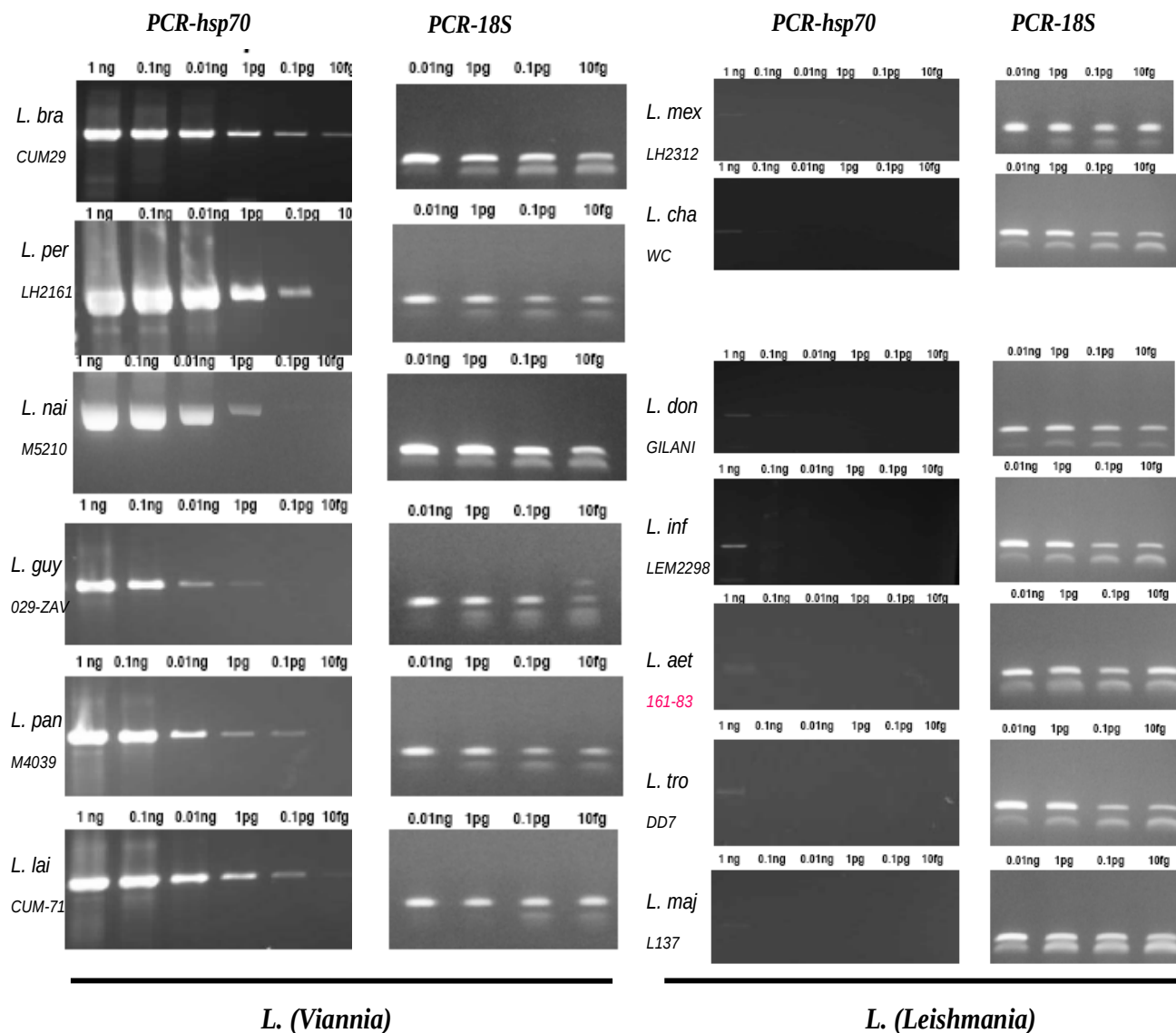


Figura 12. Resultados del ensayo de sensibilidad analítica de la PCR *hsp70* y PCR-18S.
Leyenda: Amplicones obtenidos al utilizar distintas diluciones del ADN a las concentraciones indicada. MM: Marcador molecular (Gene Ruler 100bp Plus Ladder (MBI, Fermentas). Bajo la abreviatura de cada especie, se indica la cepa de referencia utilizada en el análisis. *L.bra*: *L. braziliensis*, *L.per*: *L. peruviana*, *L.nai*: *L. naiffi*, *L.guy*: *L. guyanensis*, *L.pan*: *L. panamensis*, *L.lai*: *L. lainsoni*, *L.mex*: *L. mexicana*, *L.cha*: *L. chagasi*, *L.don*: *L. donovani*, *L.inf*: *L. infantum*, *L.aet*: *L. aethiopica*, *L.tro*: *L. tropica*, *L.maj*: *L. major*. Se agrupan las especies de acuerdo al subgénero a que pertenecen: *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*.

Se realizó una alineación de los cebadores utilizados, con un grupo de secuencias publicadas con anterioridad en el Banco de genes, que se muestra en la figura 13, lo que pudiera resultar de utilidad en la comprensión de la sensibilidad analítica determinada, lo que será discutido en el capítulo correspondiente.

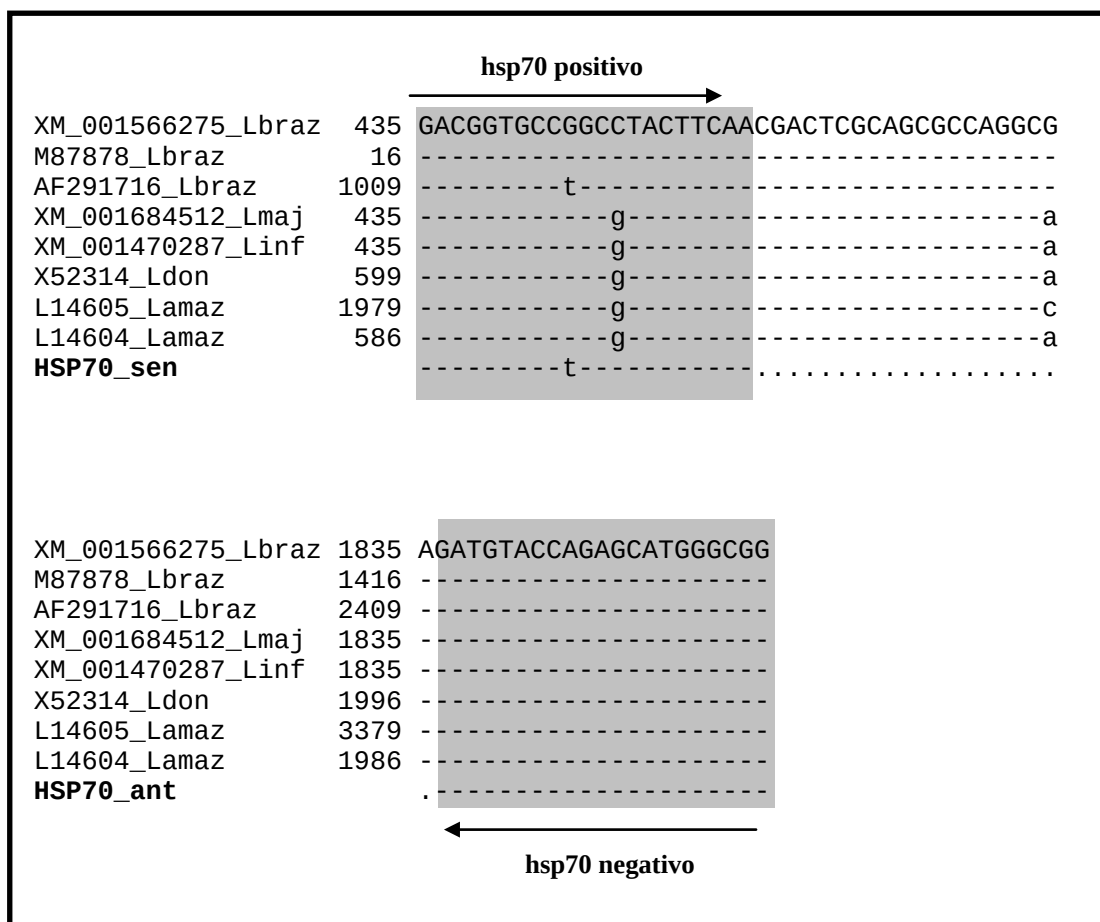


Figura 13. Alineamiento de los cebadores que amplifican la HSP70 de *Leishmania* con los fragmentos correspondientes de secuencias reportadas en el Banco de genes.

Leyenda: Los cebadores se diseñaron en base a las secuencias de las cepas M87878 y AF291716 de *L. braziliensis*. Las flechas indican el sentido de polimerización de cada cebador y la zona sombreada el fragmento correspondiente al segmento molde para cada especie. Las letras indican la ocurrencia de cambios de base en las secuencias respectivas. g: guanina; t: timina.

En relación con la especificidad analítica, se obtuvo producto de amplificación para *Leishmania* spp. así como para *T. cruzi* y no cuando se utilizó ADN del resto de los microorganismos evaluados, ya fueran parásitos no trypanosomátidos, bacterias, hongos o virus.

La variabilidad intrínseca de la PCR se determinó mediante el análisis de la repetibilidad, y se comprobó que los resultados fueron repetibles al realizar la PCR-*hsp70* en días diferentes, bajo las mismas condiciones. La figura 14 muestra las bandas obtenidas al realizar la reacción utilizando como molde ADN de cepas pertenecientes a siete especies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. major*, en dos días diferentes, sin que se afectara la amplificación en el intervalo de tiempo estudiado.

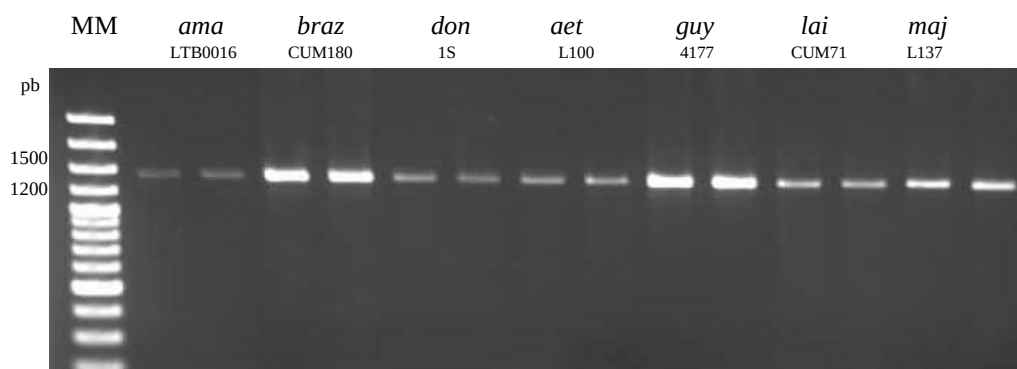


Figura 14. Resultados del análisis de la repetibilidad de la PCR-*hsp70*.

Leyenda: Productos de amplificación obtenidos al analizar la PCR-*hsp70* en momentos diferentes. Dos carriles continuos indican resultados obtenidos para la cepa que se indica, en dos días diferentes. MM: marcador molecular Gene Ruler 100bp Plus Ladder (MBI Fermentas, Alemania); *ama*: *L. amazonensis*, *bra*: *L. braziliensis*, *don*: *L. donovani*, *aet*: *L. aethiopica*, *guy*: *L. guyanensis*, *lai*: *L. lainsoni*, *maj*: *L. major*.

Por otra parte, también se comprobó la reproducibilidad de los resultados en la amplificación del gen de la *hsp70* en condiciones diferentes cuando se ejecutó el protocolo propuesto, siguiendo las condiciones establecidas, en tres laboratorios: (IPK: Cuba; PECET: Colombia; IMT-A: Bélgica). Para ello, se utilizó como molde ADN de *Leishmania* obtenido a partir de cepas, muestras clínicas o aislamientos primarios, indistintamente, en los tres sitios, manteniendo los controles a la misma concentración.

Como se puede observar en la figura 15, las diferencias en la manipulación y la utilización de equipos, materiales y soluciones diferentes no afectaron los resultados, así como tampoco las condiciones particulares de cada laboratorio. Se obtuvieron en todos los casos, amplicones de la talla esperada cuando se utilizaron las mismas concentraciones de ADN molde.

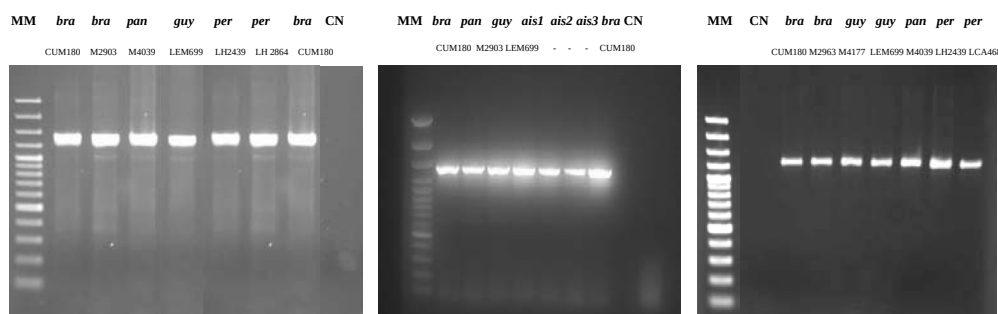


Figura 15. Resultados del análisis de la reproducibilidad de los resultados de la PCR-*hsp70*.
 Leyenda: Productos de amplificación de la PCR-*hsp70* obtenidos en distintos laboratorios: A: Lab. Leishmania, IPK; B: PECET, Universidad de Antioquia, Colombia; C: Lab. de Parasitología Molecular del IMT-Amberes, Bélgica. En todos los casos MM: marcador molecular; la cepa de *L. braziliensis* (bra) CUM180 se utilizó como control positivo de los ensayos y CN: control negativo. Los códigos de las cepas utilizadas aparecen bajo las respectivas especies: bra: *L. braziliensis*; pan: *L. panamensis*; guy: *L. guyanensis*; per: *L. peruviana*. Las siglas ais1, 2 y 3 (B) corresponden a aislamientos de *Leishmania* no clasificados cuyo ADN se utilizó en el ensayo.

4.2 Caracterización de las secuencias obtenidas

Se obtuvieron los amplicones para realizar la secuenciación, y luego las secuencias de fragmentos de 1 380 pb de genes que codifican para la proteína HSP70 citoplasmática, correspondientes a 44 cepas de *Leishmania* de diferentes orígenes geográficos, que pertenecen a 16 especies citadas. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se reportaron al Banco de genes, los números de acceso aparecen en el anexo 3. Se encontró un alto porcentaje de homología de las secuencias determinadas en este trabajo, con respecto a las secuencias de los genes de la *hsp70* citoplasmática presentes en el cromosoma 28 de los tres genomas ya publicados (*L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*), y no a las de los genes *hsp70* mitocondriales o de retículo endoplasmático, lo que se pudo comprobar accediendo al sitio correspondiente (<http://www.genedb.org>).

Se determinó por primera vez la secuencia parcial (69,9 %) del gen *hsp70*, comprendida entre las posiciones 455 y 1836 del gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática, para 11 especies del parásito: *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. mexicana*, *L. garhnam*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. chagasi* y *L. archibaldi* y para el resto de las especies, se reportan secuencias adicionales.

La secuenciación demostró que este fragmento del gen *hsp70* es rico en guanina-citosina (GC) (63,6–65,4%), con una alta similitud entre las secuencias analizadas, entre 94,1 y

99,8%. La alta similitud entre las secuencias de las distintas especies de *Leishmania*, se refleja en una matriz que se muestra en la figura 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1- <i>L.(L.) donovani</i> (99.91%)		19.00	18.50	16.75	34.83	55.00	64.00	65.33	65.00	64.25	178.77
2- <i>L. (L.) major</i> (100 %)	98.61		13.50	11.75	35.83	54.00	62.00	64.33	64.00	62.25	177.50
3- <i>L. (L.) tropica</i> (99.78%)	98.64	99.02		3.25	37.33	57.00	60.50	62.83	62.50	60.75	179.50
4- <i>L.(L.) aethiopica</i> (99.89%)	98.77	99.14	99.76		35.58	56.75	59.75	62.08	61.75	60.00	179.50
5- <i>L.(L.) mexicana</i> (99.60%)	97.46	97.39	97.28	97.40		63.83	74.33	74.67	76.33	74.58	179.58
6- <i>L. tarantolae</i> (n/d)	95.99	96.06	95.84	95.86	95.34		75.00	80.33	80.00	81.25	188.00
7- <i>L.(V.) lainsoni</i> (100 %)	95.33	95.48	95.58	95.64	94.58	94.52		14.00	19.00	13.75	187.50
8 - <i>L.(V.) guyanensis</i> (99.87%)	95.23	95.30	95.41	95.47	94.55	94.14	98.98		14.33	8.25	186.33
9- <i>L. (V.) naiffi</i> (n/d)	95.26	95.33	95.44	95.49	94.43	94.16	98.61	98.95		10.25	185;50
10- <i>L. (V.) braziliensis</i> (99.97%)	95.31	95.44	95.57	95.62	94.56	94.07	99.00	99.40	99.25		184.25
11- <i>Trypanosoma</i> spp.	86.95	91.42	86.90	86.90	86.89	86.28	86.314	86.40	86.46	86.55	

Figura 16. Matriz de similitud de secuencias nucleotídicas del fragmento de gen *hsp70* en los diferentes Complejos de *Leishmania* spp, en comparación con *Trypanosoma* spp. Leyenda: La mitad inferior izquierda representa los porcentajes de similitud entre las secuencias nucleotídicas y la mitad superior derecha representa la media de nucleótidos que son diferentes del total de ellos. Entre paréntesis aparecen los porcentajes de similitud de secuencias nucleotídicas dentro de cada complejo. n/d: no se determinó debido a que solamente estaba disponible una secuencia.

La variación identificada se apoya en la existencia de 148 posiciones nucleotídicas polimórficas (11%), y 111 posiciones “parsimoniosamente” informativas (8%).

Las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas (459 aminoácidos), revelaron sustituciones en 43 posiciones, para un 9%. De ellas, 39 sitios (8%) son “parsimoniosamente” informativos. El número de sustituciones sinónimas por sitio potencialmente sinónimo fue de 6,3%, el número de sustituciones no sinónimas por sitio potencialmente no sinónimo fue de 1,9%. Las 15 posiciones donde se producen

cambios de aminoácidos con modificaciones en la polaridad y pH se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Cambios de aminoácidos potencialmente importantes entre las secuencias aminoacídicas deducidas del gen *hsp70* secuenciado en las especies de *Leishmania*.

	P*	aa	aaI	Especies I	aa II	Especies II	Cambio que produce
1	166	Ala	Ser	<i>ama, mex, gar</i>			Apolar x Polar sin carga
2	255	Asn	Asp	<i>bra, per, nai, guy, pan, lai</i>			Polar sin carga x Polar con carga ácido
3	257	Ala	Ser	<i>bra, per, nai, guy, pan, lai</i>			Apolar x Polar sin carga
4	262	Ala	Ser	<i>ama, mex, gar</i>			Apolar x Polar sin carga
5	503	Gln	His	<i>bra, per, nai, guy, pan, lai</i>			Polar sin carga x Polar con carga básico
6	526	Met	Ser	<i>bra, per, nai, guy, pan, lai</i>			Apolar x Polar sin carga
7	530	Glu	Ala	<i>don, inf, arc, cha, ama, mex, gar</i>	Gln	<i>L. (Viannia) (bra, per, nai, guy, pan, lai)</i>	Polar con carga ácido x Apolar Polar con carga ácido x Polar sin carga
8	531	Asp	Ala	<i>Viannia (bra, per, nai, guy, pan, lai)</i>			Polar con carga ácido x Apolar
9	537	Asn	Glu	<i>Viannia (bra, per, nai, guy, pan, lai)</i>			Polar sin carga x Polar con carga ácido
10	557	Ser	Gly	<i>don, arc, inf, cha.</i>			Polar sin carga x Apolar
11	571	Ala	Ser	<i>ama, mex, gar, bra, per</i>	Thr	<i>L. (Viannia) (guy, pan, nai)</i>	Apolar x Polar sin carga
12	572	Thr	Ala	<i>bra, per, guy, pan, lai</i>			Polar sin carga x Apolar
13	575	Lys	Ser	<i>Viannia (bra, per, nai, guy, pan, lai)</i>			Polar con carga básico x Polar sin carga
14	576	Glu	Ala	<i>Viannia (bra, per, nai, guy, pan, lai)</i>			Polar con carga ácidos x Apolar
15	605	Val	Thr	<i>Viannia (bra, per, nai, guy, pan, lai)</i>			Apolar x Polar sin carga

Leyenda: * P: posición de la secuencia en que se produce el cambio aminoacídico; aa: aminoácido predominante en todas las especies; aa I, cambio de aminoácido que se presenta para las especies I, aa II: cambio de aminoácido que se presenta para las Especies II. Se indican los cambios que se producen de polaridad y carga, en correspondencia con los cambios aminoacídicos mostrados. *ama*: *L. amazonensis*, *mex*: *L. mexicana*, *gar*: *L. garnhami*, *bra*: *L. braziliensis*, *per*: *L. peruviana*, *nai*: *L. naiffi*, *guy*: *L. guyanensis*, *pan*: *L. panamensis*, *lai*: *L. lainsoni*, *don*: *L. donovani*, *inf*: *L. infantum*, *arc*: *L. archibaldi*, *cha*: *L. chagasi*.

De manera general, predomina en esos sitios la existencia de un solo cambio aminoacídico (13/15), y del cambio apolar por polar sin carga (6/15). Solamente dos posiciones evidenciaron dos cambios de aminoácidos, uno de los cuales ocasiona

modificaciones de la polaridad.

4.3 Utilidad del gen *hsp70* para el análisis filogenético de *Leishmania* spp.

Las relaciones filogenéticas entre las distintas especies estudiadas, se analizaron en base a la información obtenida de las secuencias del gen *hsp70*, en comparación con dos cepas de *Trypanosoma* spp. que se utilizaron como grupo externo, y se basaron en el análisis de 51 secuencias (44 obtenidas en este trabajo y siete reportadas con anterioridad) y en la construcción de distintos árboles basados en parámetros de distancia y caracteres. La figura 17 muestra el árbol construido a partir de las secuencias nucleotídicas utilizando el método de Unión al Vecino (*Neighbor-Joining*).

Como se observa, los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* forman cada uno un clado monofilético diferente donde se agrupan el ancestro con todos sus descendientes. Entre ambos se ubicó el subgénero *L. (Sauroleishmania)*, en una rama separada, como un taxón independiente, aunque de esta especie, solo se analizó una secuencia. Dentro del subgénero *L. (Leishmania)* el árbol distingue claramente entre las especies y los complejos de especies del Viejo y Nuevo Mundos.

Los grupos monofiléticos que se pudieron distinguir fueron, dentro del subgénero *L. (Viannia)*: *L. lainsoni* y *L. naiffi* y los complejos *L. braziliensis* y *L. guyanensis*; dentro del subgénero *L. (Leishmania)* la *hsp70* identificó *L. major*, el complejo *L. donovani*, el complejo *L. mexicana* y un grupo comprendido por los complejos *L. aethiopica* y *L. tropica*.

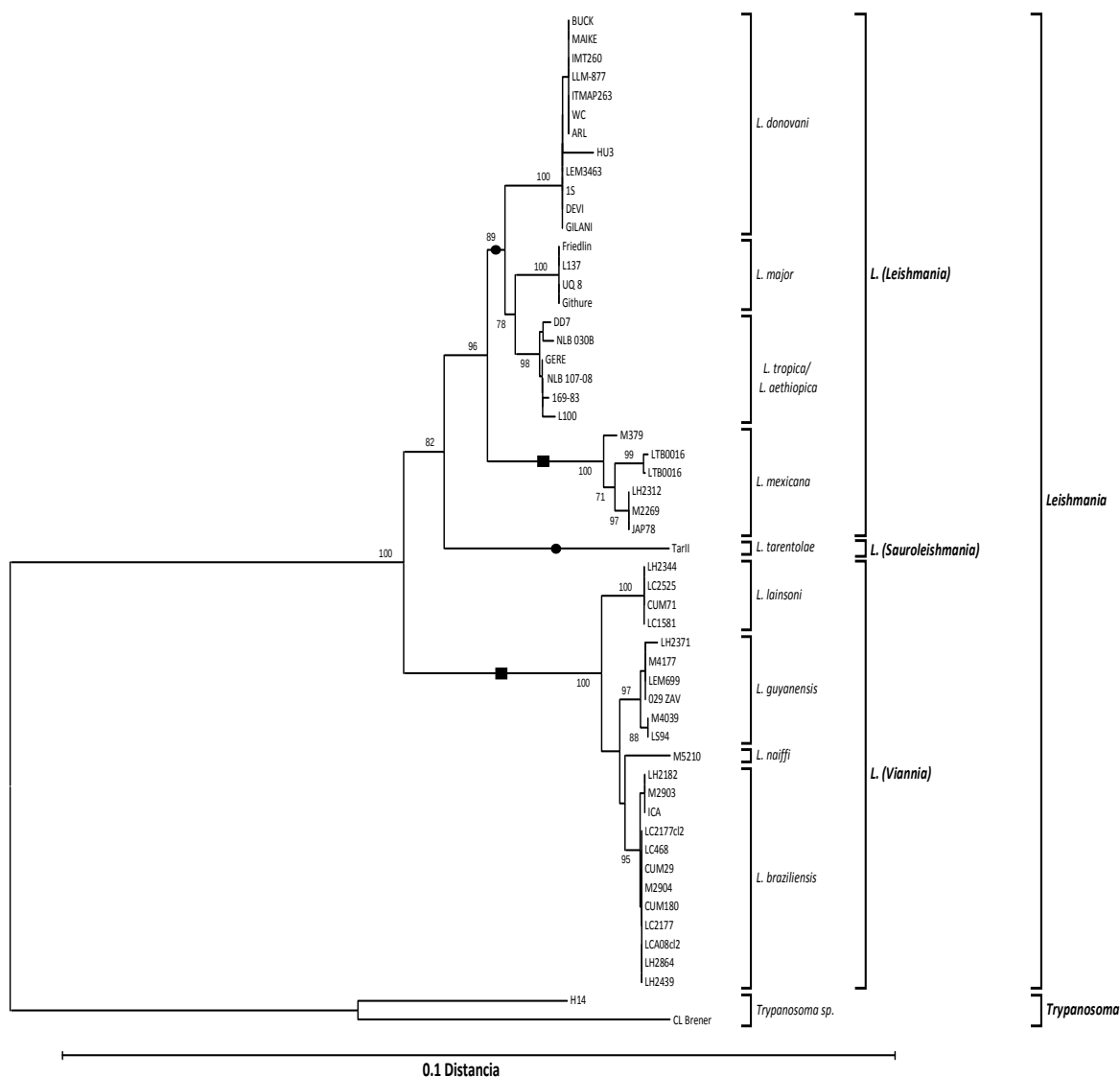


Figura 17. Dendrograma obtenido del análisis de secuencias nucleotídicas de la *hsp70* de distintas especies de *Leishmania*, según método de Unión al vecino (*Neighbor Joining*).

Todos estos grupos se verificaron también en árboles construidos por los métodos de Evolución Mínima (figura 18) y Máxima Parsimonia (figura 19). De igual forma, los árboles basados en las secuencias aminoacídicas deducidas no contradijeron las relaciones filogenéticas estimadas con anterioridad en base al análisis de las secuencias nucleotídicas, es decir, que las mismas especies o grupos de especies se agruparon filogenéticamente de igual forma. En la figura 20 se muestran las relaciones establecidas por el árbol construido en base a dichas secuencias, utilizando el método de Unión al Vecino.

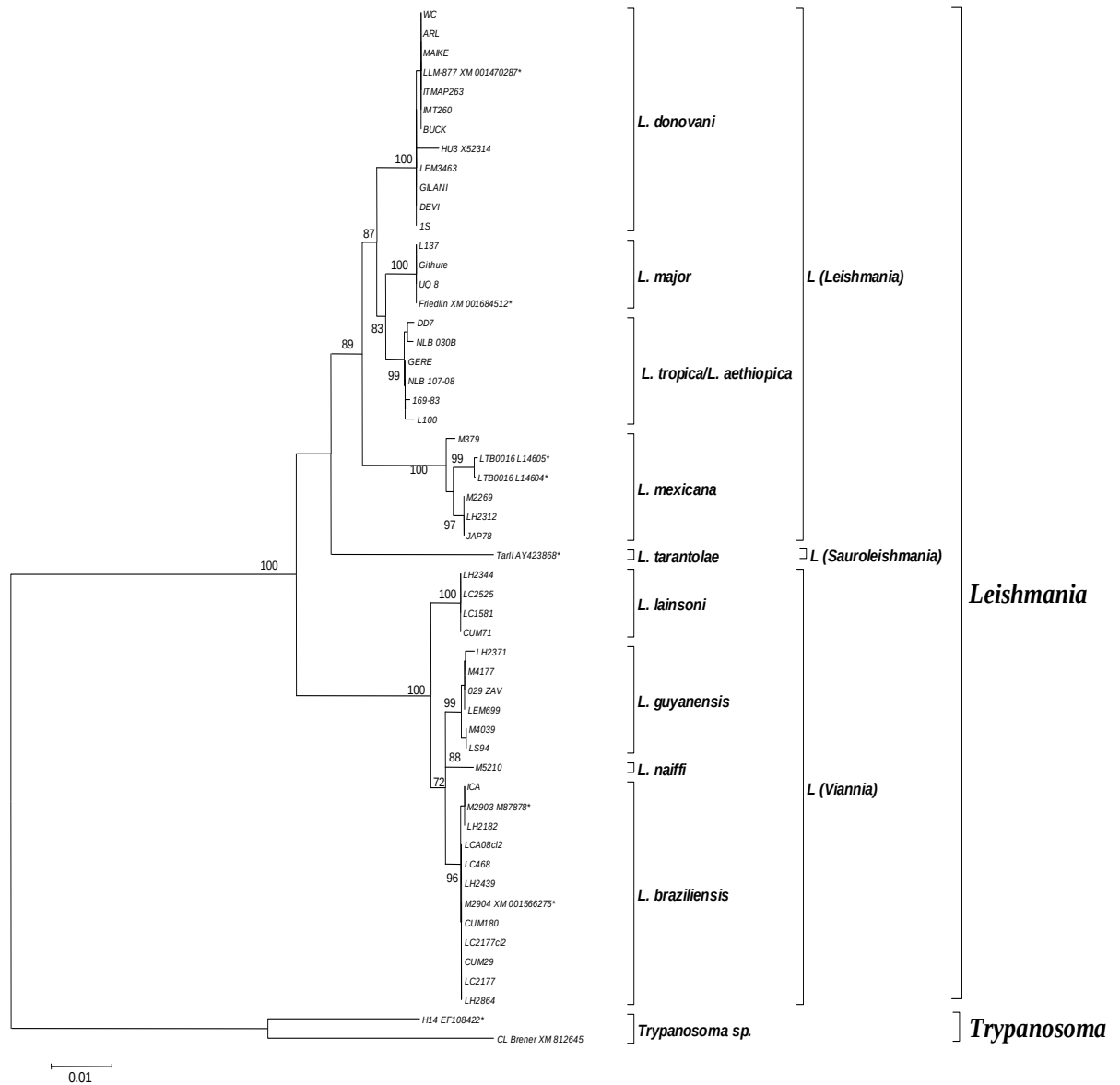


Figura 18. Dendrograma obtenido del análisis de secuencias nucleotídicas de la *hsp70* de distintas especies de *Leishmania*, según el método de Evolución Mínima (*Minimum Evolution*)

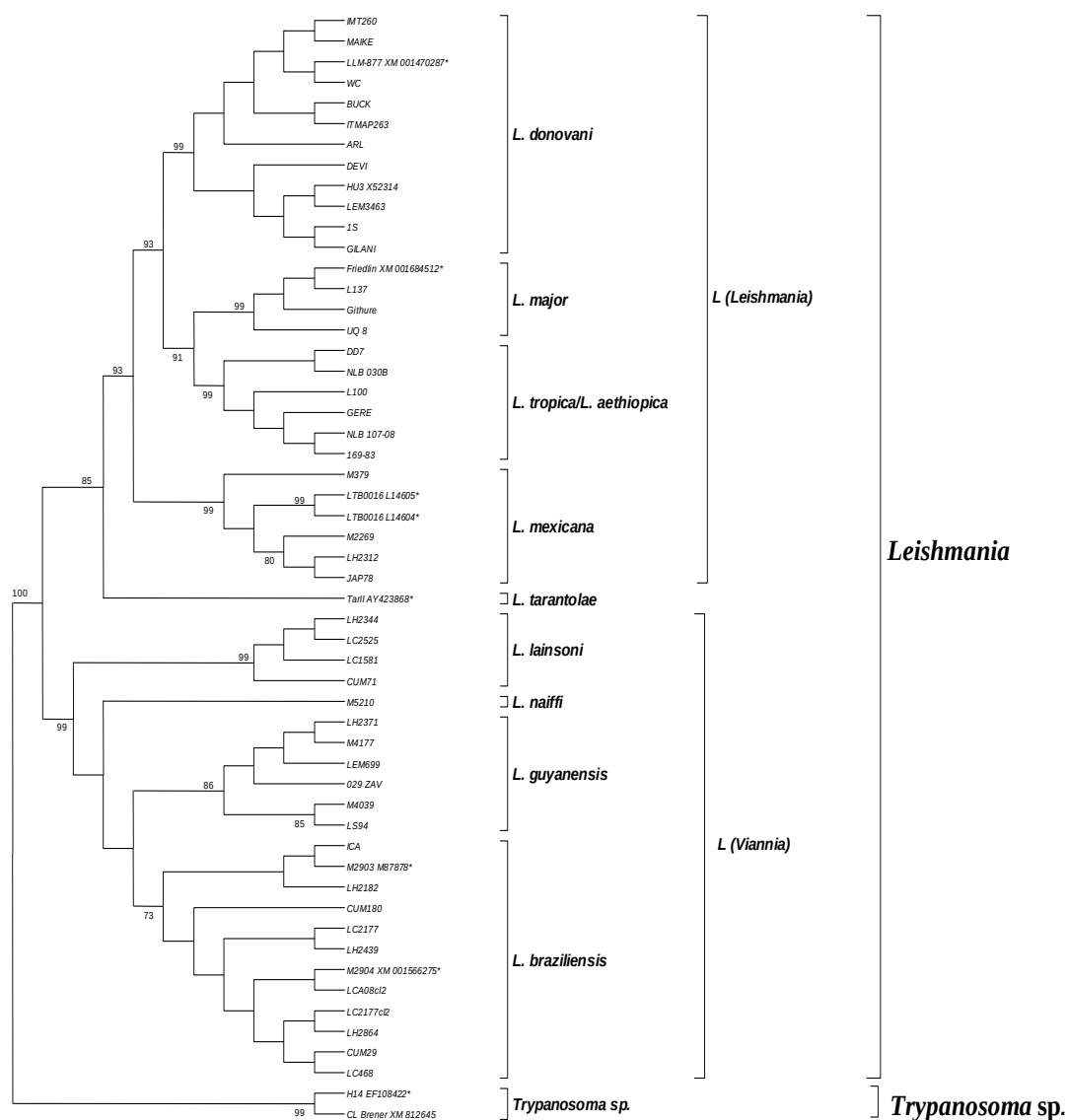


Figura 19. Dendrograma obtenido del análisis de secuencias nucleotídicas de la *hsp70* de distintas especies de *Leishmania*, según método de Máxima Parsimonia (*Maximum Parsimony*).

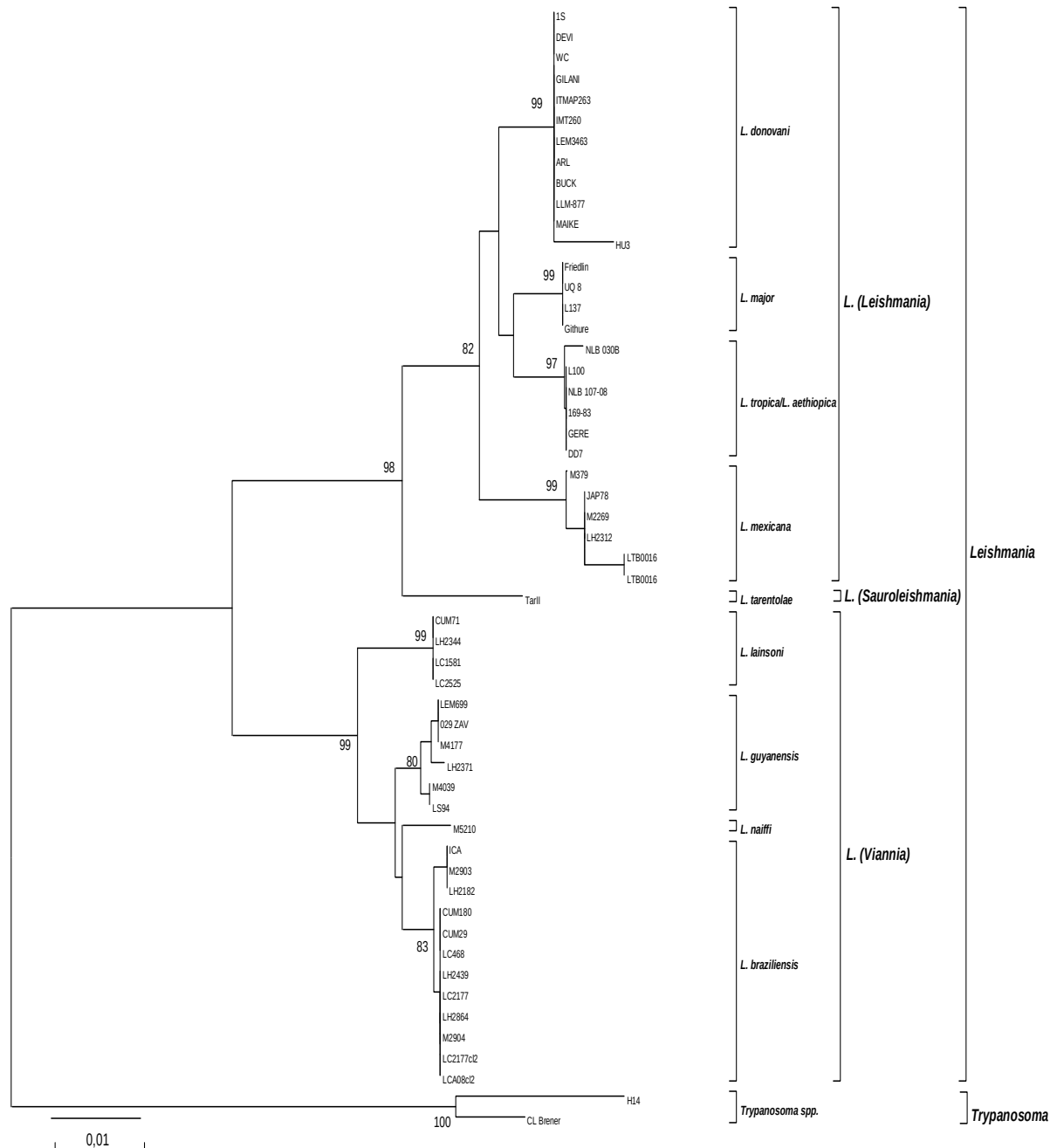


Figura 20. Análisis filogenético basado en las secuencias aminoacídicas deducidas de la *hsp70*, según método de Unión al vecino (*Neighbor-Joining*).

Utilizando las mismas secuencias nucleotídicas, se construyó una red filogenética utilizando el método de *Neighbor-Net*, modelo p-distancia no corregido, excepto *Trypanosoma* y *L. tarentolae* que fueron excluidos de la red por ser entidades muy divergentes. Como se puede observar, los mismos grupos que se identificaron por medio de los análisis filogenéticos convencionales, se muestran también en esta red: los

subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, donde además, se agrupan las especies de este último subgénero de acuerdo a su origen geográfico (figura 21). Una ampliación del grupo que comprende las especies del subgénero *L.* (*Viannia*) (figura 21B), muestra que *L. panamensis* y *L. peruviana* se encuentran como subgrupos separados dentro de los complejos *L. guyanensis* y *L. braziliensis* respectivamente, de la misma forma que se muestra cómo *L. infantum* aparece como subgrupo separado dentro del complejo *L. donovani* en la figura 21. En el caso de *L. tropica* y *L. aethiopica* no se distinguieron como entidades separadas dentro del grupo, así como tampoco *L. mexicana*, *L. amazonensis*, y *L. garnhami*, lo que puede corroborarse en la figura 21.

Comprender las relaciones evolutivas entre las distintas entidades constituye un paso esencial en el diseño de una metodología para la diferenciación del parásito. Mediante la búsqueda de caracteres individuales a nivel molecular, y la identificación de sitios polimórficos en las secuencias, se puede lograr este segundo propósito.

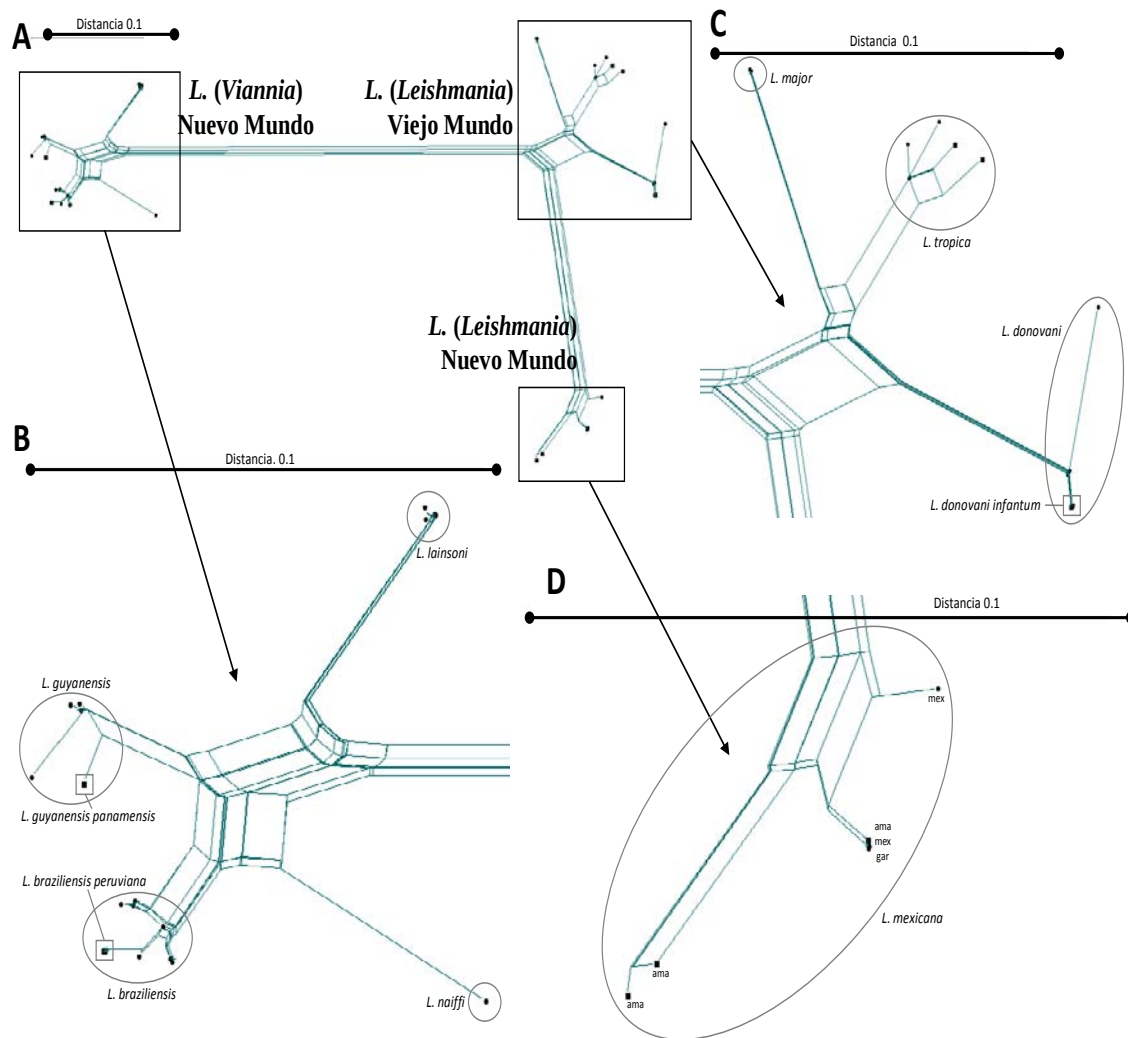


Figura 21. Red filogenética en base a secuencias *hsp70* de *Leishmania* mediante el Método de Redes (*Neighbor-Net*).

4.4 Identificación de especies o entidades taxonómicas de *Leishmania* en base al análisis teórico de las secuencias y a su polimorfismo

Se realizó un análisis teórico de las secuencias nucleotídicas obtenidas en nuestro estudio, y otras adicionales reportadas en el Banco de genes, para determinar la utilidad de la enzima de restricción *Hae*III en nuevas diferenciaciones. Como resultado del análisis, se determinó el patrón de bandas para cada una de las cepas estudiadas, así como la talla de los fragmentos que componen cada patrón.

Detalles individuales del patrón teórico de digestión para cada secuencia se pueden observar en la figura 22, donde se indica también la talla teórica de los fragmentos de restricción. Se comprobó que *HaeIII* reconoce 13 sitios en las secuencias de *Leishmania*, de los cuales 10 son responsables de las diferencias en los patrones de restricción obtenidos. De acuerdo con esto, las secuencias analizadas se congregaron en ocho grupos que difieren en relación con sus patrones y que se corresponden con especies o grupos de especies diferentes.

Así, solo dos especies se pueden distinguir de manera individual utilizando la restricción con esta enzima: *L. lainsoni* y *L. major*, mientras que el resto de ellas no generaron fragmentos especie-específicos, sino característicos de grupos. Las agrupaciones encontradas fueron: (*L. donovani*/*L. infantum*/*L. archibaldi*/*L. chagasi*); (*L. aethiopica*/*L. tropica*); (*L. peruviana*/*L. braziliensis*/*L. naiffi*); y (*L. panamensis*/*L. guyanensis*). Los patrones restantes correspondieron al complejo *L. mexicana*.

Se destaca el hecho de que las tres secuencias de *L. amazonensis* analizadas mostraron patrones teóricos de restricción diferentes, a pesar de que dos de ellas pertenecen a una misma cepa: LTB0016, y las secuencias se obtuvieron a partir de ADN genómico y cDNA, las cuales se reportaron con anterioridad en el Banco de genes. La tercera cepa analizada, M2269, cuya secuencia nucleotídica se obtuvo por nuestro grupo de trabajo, generó un patrón compartido con las otras secuencias del complejo: las de *L. mexicana* y *L. garnhami*. A excepción de este caso, no se observó otra diferencia entre cepas de la especie a nivel de los fragmentos teóricos de digestión para *HaeIII*.

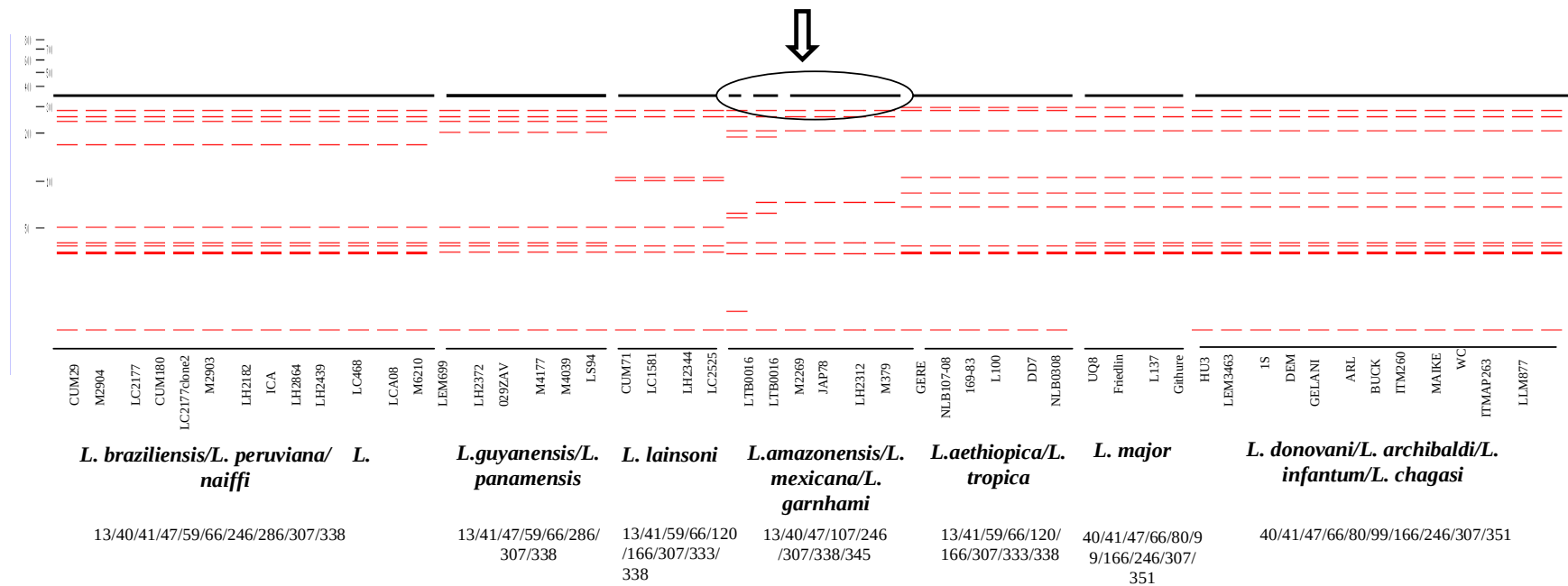


Figura 22. Patrones generados por el análisis *in silico* de cada secuencia, con relación a la digestión teórica con *Hae*III. Leyenda: Las líneas superiores indican patrones comunes obtenidos para una o más secuencias. La flecha indica los patrones obtenidos en el complejo *L. mexicana*, donde se evidenciaron diferencias intra-especies. Bajo la línea inferior, aparecen en vertical los códigos correspondientes a cada cepa, representativas de las especies mencionadas. Debajo se muestran las tallas de los fragmentos esperados. Detalles adicionales de cada cepa pueden consultarse en la tabla 3.

Para completar la comprensión de estos aspectos, se muestra en la tabla 7 el polimorfismo nucleotídico que sustenta los patrones de restricción para cada cepa o grupo de cepas. En cada caso, se indica la posición del primer nucleótido en la secuencia de reconocimiento y se muestran los cambios que se identificaron.

Con relación a *HaeIII*, todas las secuencias que generaron patrones teóricos idénticos también presentaron nucleótidos idénticos en los sitios de reconocimiento de las endonucleasas, a excepción de *L. naiffi*, que compartió patrón teórico con *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Sin embargo, en las dos últimas especies, la ausencia de la secuencia de reconocimiento para *HaeIII* en la posición 1276 se debe a la presencia de una T, a diferencia de una A en *L. naiffi*.

Una vez que se demostró la imposibilidad teórica de identificar de manera individual la mayoría de las especies utilizando la enzima *HaeIII*, se realizó el análisis del polimorfismo de esas secuencias para realizar, paralelamente, el reconocimiento, análisis y propuesta de otras endonucleasas, que pudieran resultar útiles para la identificación individual, al ser utilizadas en una segunda digestión del mismo producto amplificado.

Tabla 7. Panorama de los sitios polimórficos individuales (SNPs) que afectan sitios de reconocimiento de endonucleasas en las secuencias de la *hsp70* estudiadas

Enzima y secuencia de reconocimiento	HaeIII (GGCC)										RsaI (GTAC)	RsaI (GTAC)	BclI (CCATC)	BsaHI ⁶ (GRCGYC)	MluI (ACGCGT)
SNPs en los distintos grupos de secuencias para las enzimas abajo listadas ¹															
Sitios de reconocimiento con el SNP ²	37	65	119	703	743	790	1156	1171	1196	1276	115	390	1080	763	429
L. donovani (5) ³	...A						..A.	.CG.							C
L. infantum (7) ⁴	...A						..A.	.CG.							
L. aethiopica (4)	...A					A...	..A.	.CG.							
L. tropica (2)	...A					A...	..A.	.CG.						...A..	
L. major (4)	...A		..T.				..A.	.CG.							
L. amazonensis LTB0016 (L14605) ⁵		..G.					..A.		..T.	.T.G		.C..			
L. amazonensis LTB0016 (L14604) ⁵	...A	..G.					..A.		..T.	.T.G		.C..			
L. amazonensis M2269	...A	..G.					..A.	.CG.	..T.	.T.G		.C..			
L. garhnam JAP78	...A	..G.					..A.	.CG.	..T.	.T.G		.C..			
L. mexicana LH2312	...A	..G.					..A.	.CG.	..T.	.T.G		.C..			
L. mexicana M379	...A	..G.					..A.	.CG.	..T.	.T.G					
L. peruviana (4)	...G			...G				.CG.		.T..	A...				
L. braziliensis CUM29	...G			...G				.CG.		.T..	R... ⁷				
L. braziliensis (7)	...G			...G				.CG.		.T..					
L. naiffi M5210	...G			...G				.CG.		.A..					
L. panamensis (2)	...G			...G				.CG.	..T.	.A..			.T...		
L. guyanensis (4)	...G			...G				.CG.	..T.	.A..					
L. lainsoni (4)	...G			...G	..T.			.CG.	.CT.						
Sitios adicionales de reconocimiento ²	106										685	115	108	47	1209
comunes a todas las cepas de las cuales	457										865	685		334	
se muestran los SNPs	1097										1147	865		973	
											1213	1147			
											1348	1213			
											1405	1405			

¹ Cuando se presenta más de una secuencia en un grupo, se indica el número de secuencias analizado entre paréntesis. Solo se muestran las diferencias en los sitios de reconocimiento de enzimas. Los nucleótidos idénticos están representados por puntos.

² El número de sitios de reconocimiento se refieren a la primera posición nucleotídica de la secuencia de reconocimiento en el alineamiento utilizado para el análisis de la RFLP, lo que comprende las secuencias de las cepas y los cebadores de la *hsp70*.

³ Incluye *L. archibaldi* cepa LEM3463 que no es ya reconocida como especie separada (Lukšs, 2007)

⁴ Incluye las 3 cepas de *L. chagasi* MAIKE, WC, ARL., sinónimos para *L. infantum* en el Nuevo Mundo, (Cupolillo *et al.*, 94; Lukšs *et al.*, 2007).

⁵ Dos secuencias de esta cepa aparecen en el Genbank, cuyos números de acceso se indican entre paréntesis

⁶ R = G o A, Y = C o T. Los SNPs se indican como puntos cuando son compatibles con estas ambigüedades.

⁷ R= Representa una ambigüedad de secuencia en las purinas (A o G)

Los sitios variables que se identificaron entre las secuencias de las distintas especies que permanecieron agrupadas, y los sitios parsimoniosamente informativos encontrados en cada caso, se muestran en la tabla 8. El análisis individual de cada sitio polimórfico posibilitó determinar aquellos donde el cambio en los nucleótidos permitía la utilización de una enzima de restricción, que cumpliera los requisitos necesarios para poder utilizarse en la discriminación.

Tabla 8. Variabilidad en los sitios nucleotídicos entre especies no distinguibles individualmente mediante PCR-*hsp70*-RFLP/*Hae*III.

Grupos de especies	Número de sitios variables por grupos de especies	Número de sitios parsimoniosamente informativos entre las especies	Posición del SNP seleccionado	Enzima de restricción seleccionada
<i>L. bra</i> / <i>L. per</i>	21	6	115	<i>Rsa</i> I
			625	-
<i>L. ama</i> / <i>L. mex</i> / <i>L. gar</i>	12	7	391	<i>Rsa</i> I
<i>L. aet</i> / <i>L. tro</i>	7	1	766	<i>Bsa</i> HI
<i>L. don</i> , <i>L. arc</i> / <i>L. inf</i> , <i>L. cha</i>	6	1	434	<i>Mlu</i> I
<i>L. guy</i> / <i>L. pan</i>	4	2	1081	<i>Bcc</i> I
			1301	-

Leyenda: Se indica el número de sitios variables y los sitios parsimoniosamente informativos para cada grupo de especies. La posición de cada sitio polimórfico individual (SNP) corresponde al cambio de nucleótido de cada sitio seleccionado, entre los existentes, como el más indicado para la diferenciación, en correspondencia con la enzima de restricción propuesta para realizar la segunda restricción del producto amplificado.

Los patrones teóricos generados por estas nuevas enzimas identificadas se pueden observar en la figura 23, así como las tallas de los fragmentos obtenidos por la digestión teórica, para cada cepa.

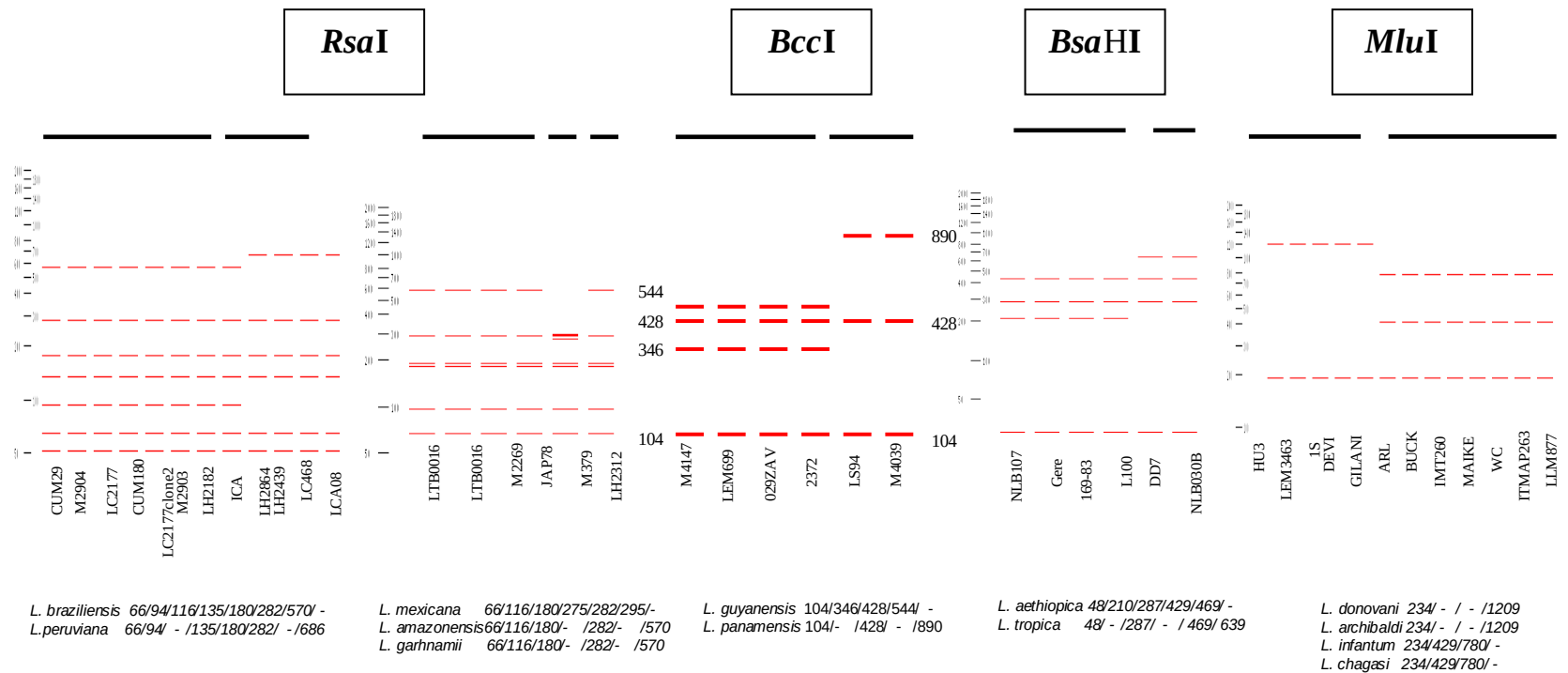


Figura 23. Patrones generados por el análisis *in silico* de la restricción de las secuencias *hsp70* de diferentes cepas de *Leishmania* con las nuevas enzimas propuestas para la diferenciación individual.

Leyenda: Los códigos de las cepas cuyas secuencias fueron analizadas se indican en la base del diagrama, así como la talla de los fragmentos teóricamente generados. La línea continua superior indica el total de patrones compartidos por las respectivas cepas.

De esta forma, se muestra cómo la enzima *RsaI* distinguió teóricamente entre varios complejos. *L. peruviana* presentó una sustitución de A/T en el sitio de reconocimiento de la posición 115, que permitió distinguirla de *L. braziliensis* y *L. naiffi*. En este caso, la cepa CUM29 de *L. braziliensis* presentó una ambigüedad de secuencia para las purinas en dicha posición (A o G), a diferencia del resto de las siete cepas analizadas. Con la misma enzima *RsaI*, la cepa de *L. mexicana* M379, al no presentar sustitución de C/T, se distinguió de la cepa LH2312, la cual compartió patrón con *L. amazonensis* y también con *L. garnhami*. En este caso, las tres cepas analizadas de *L. amazonensis* ofrecieron un patrón de digestión teórica idéntico, a diferencia de lo observado con *HaeIII*.

La enzima *BccI* distinguió *L. panamensis* de *L. guyanensis* debido a la presencia de una T/C en la posición 1 080, mientras que la enzima *MluI* permitió separar teóricamente a *L. donovani* de *L. infantum*, donde se incluyen *L. archibaldi* y *L. chagasi*, respectivamente, debido a la presencia de una C/T en la posición 429 para el primer caso. En el caso de *BsaHI*, a pesar de presentar sitios ambiguos en su secuencia de reconocimiento, representados por R (G ó A) y Y (C ó T), permitió discriminar entre las especies *L. aethiopica* y *L. tropica* ya que *L. tropica* presentó un cambio de A/T en dicho sitio de reconocimiento, ubicado en la posición 763.

El conjunto de todos los patrones *in silico*, obtenidos para cada cepa y enzima, aparecen en un diagrama (figura 24), que muestra la posición de cada cepa en el dendograma mostrado (base del diagrama) que es un árbol consenso derivado del análisis mediante el método de Máxima Parsimonia.

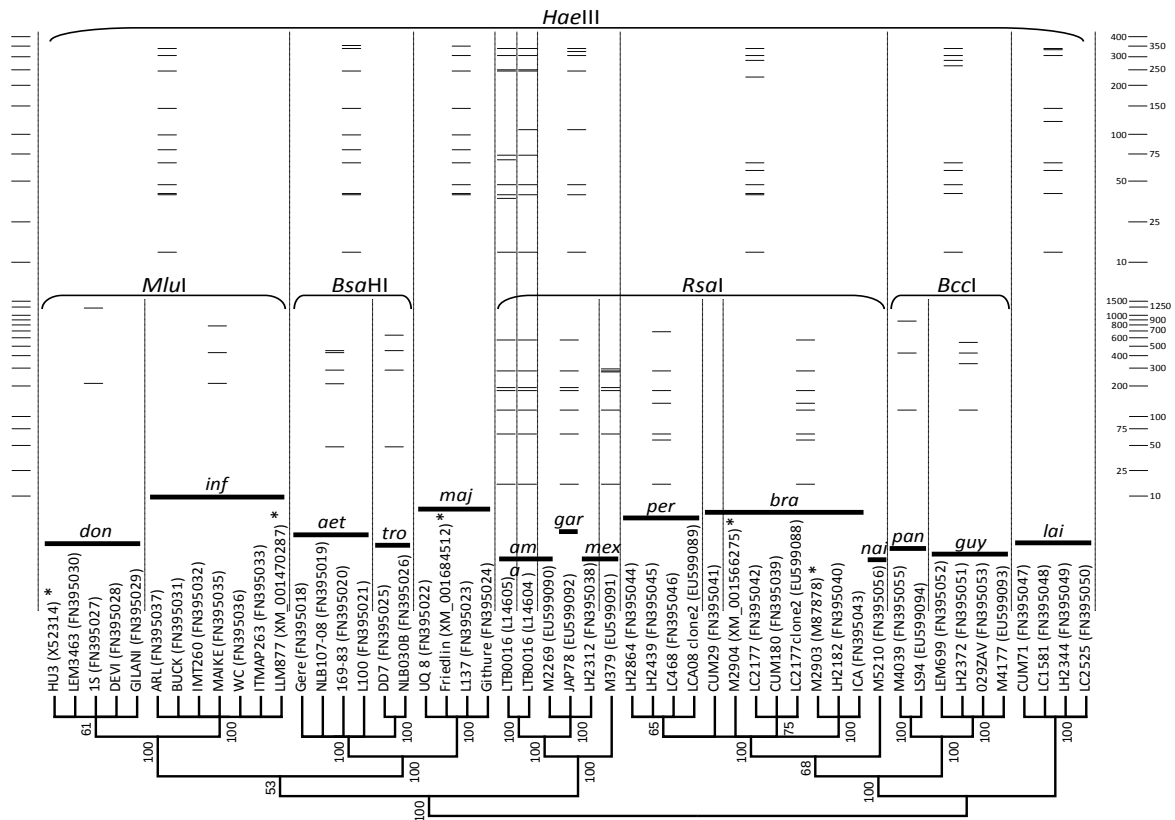


Figura 24. Diagrama integrado del análisis teórico general realizado para la diferenciación de especies basada en las secuencias *hsp70* de *Leishmania*.

Leyenda: Los fragmentos de la digestión teórica con *HaeIII* aparecen en la parte superior y los correspondientes a las enzimas propuestas para la segunda digestión están señalados en la parte inferior. Los patrones de peso molecular se colocaron en el lateral derecho. Los códigos de las cepas aparecen en vertical, ubicadas en el dendograma, que es un árbol consenso derivado del análisis mediante el método de Máxima Parsimonia y que sirve de base a la figura.

Este análisis general permitió identificar enzimas que facilitan la discriminación teórica individual de *Leishmania*, en base a diferencias moleculares en sus secuencias. Se procedió a comprobar la validez de esta propuesta y por tanto, la posibilidad real de distinguir individualmente las entidades taxonómicas de *Leishmania*, con independencia de su nomenclatura taxonómica, lo cual es importante por razones médicas.

4.5 Verificación de la identificación de *Leishmania* mediante PCR-*hsp70*/RFLP

Se realizó la PCR-*hsp70*/RFLP/*HaeIII* tomando como base cada producto amplificado, lo que permitió obtener los patrones de bandas, que se correspondieron con lo esperado del análisis teórico anterior. Estos resultados se comprobaron en más de dos ocasiones, mediante la repetición de la reacción de amplificación y posterior digestión enzimática

de cada producto amplificado.

Los patrones de bandas representativos de las restricciones enzimáticas realizadas para cada especie se muestran en la figura 25. En la composición fotográfica se muestran los patrones de una cepa representativa de cada especie, salvo cuando se encontró ambigüedad con relación al análisis teórico, casos en los que se muestran las cepas implicadas.

De manera general, se encontró una buena correspondencia entre el análisis teórico y el análisis con ADN cuando se utilizó la enzima *HaeIII*, excepto para *L. naiffi* y la cepa LTB0016 de *L. amazonensis*. En el primer caso, aún cuando el análisis de la secuencia *hsp70* analizada y la PCR-RFLP se realizó a partir de la misma cepa (M5210), la digestión enzimática demostró la presencia de un fragmento adicional que parece diferenciar *L. naiffi* del grupo *L. braziliensis/L. peruviana*. Este resultado, aunque inesperado, fue reproducible.

Por otro lado, la cepa LTB0016, cuyas secuencias habían mostrado diferencia con el resto del complejo en el análisis teórico, tuvo un comportamiento idéntico a otras cepas del mismo complejo (*L. mexicana*, *L. garnhami*, y *L. amazonensis*) obteniéndose un patrón común para todas que permite diferenciar este complejo de otras especies analizadas.

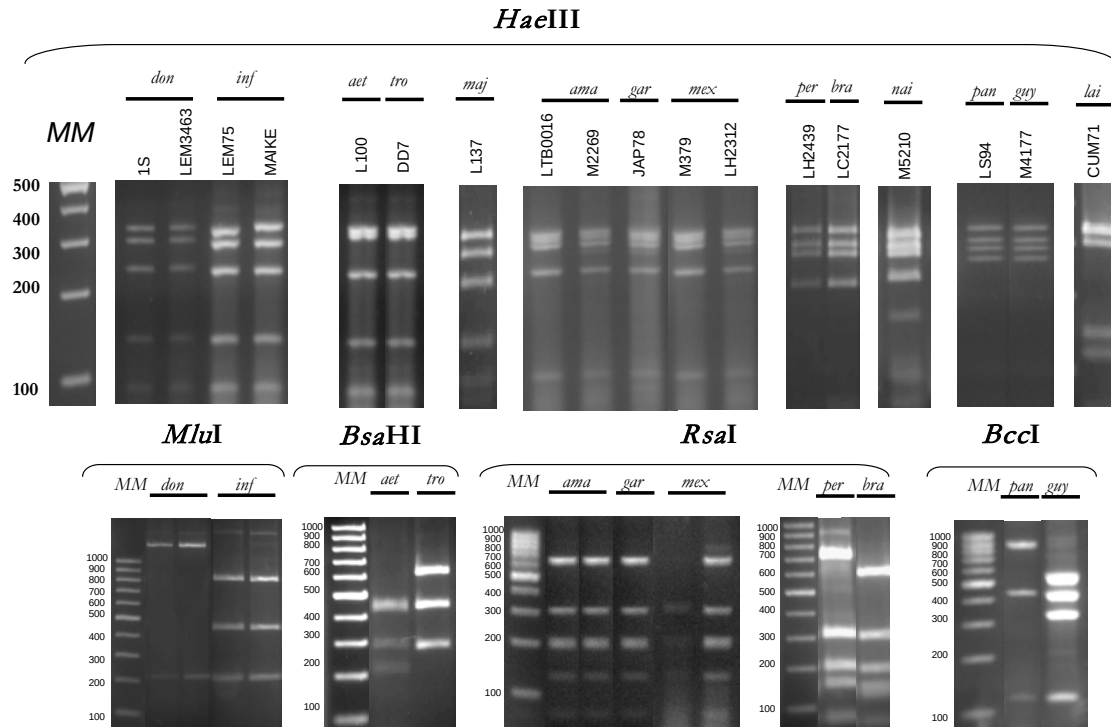


Figura 25. Composición fotográfica que muestra los resultados de la PCR-*hsp70*/RFLP en cepas representativas de las especies de *Leishmania* analizadas.

Leyenda: Las enzimas utilizadas para las distintas digestiones fueron *HaeIII*, *MluI*, *BsaHI*, *RsaI* y *BclI*. Se muestra el resultado de una cepa representativa de cada especie, salvo cuando existió diferencia con el análisis teórico, casos en los que se muestran las cepas implicadas.

Se evaluó la existencia de posibles diferencias entre cepas de una misma especie con relación a la digestión con *HaeIII*, para lo cual se realizó el mismo procedimiento a las 147 cepas, y se verificó, en correspondencia con la similitud de patrones encontrados, que no existe un polimorfismo en las cepas analizadas en relación a este gen, que afecte la identificación individual usando esta enzima de restricción. En la figura 26 se muestran algunos resultados de los patrones obtenidos para las distintas cepas analizadas donde se puede comprobar que no existen diferencias entre ellas en relación a esta digestión.

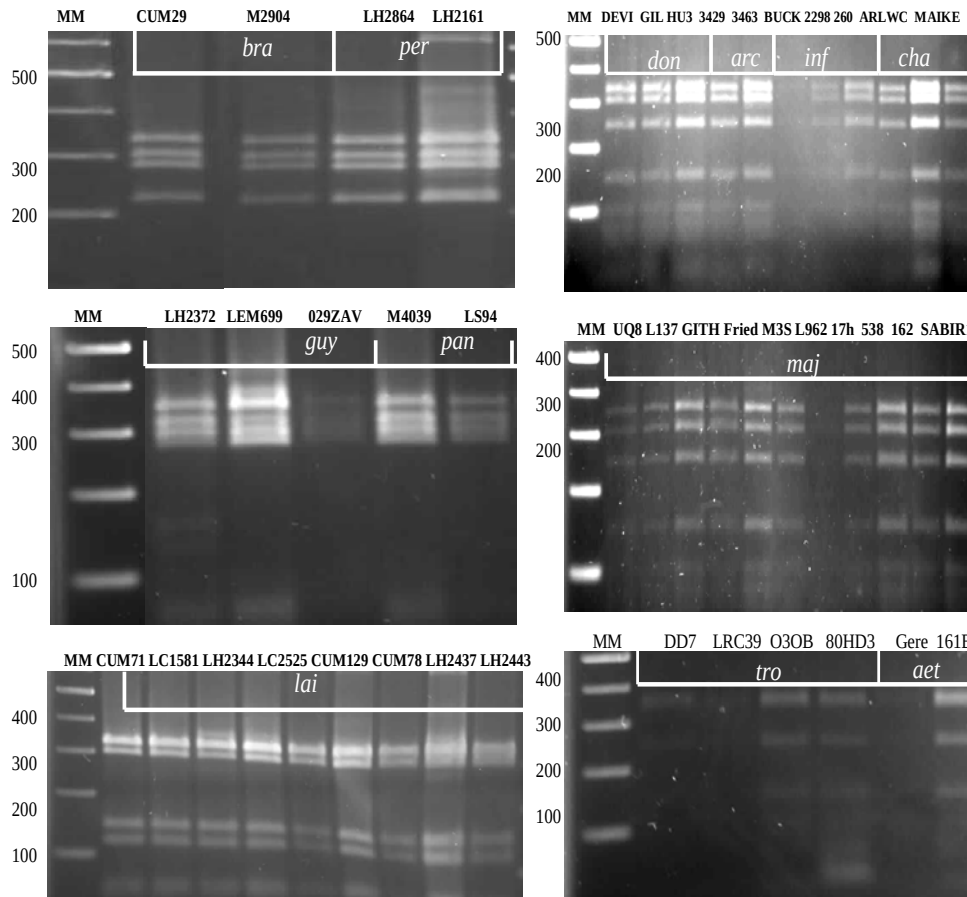


Figura 26. Patrones obtenidos en el análisis de las posibles diferencias entre cepas de una misma especie, de diverso origen geográfico, mediante PCR- *hsp70*/RFLP-*HaeIII*.

Leyenda: En todas las corridas el patrón de peso molecular utilizado fue Gene Ruler 100bp Ladder (MBI, Fermentas, Alemania). Los códigos de cada cepa aparecen sobre el carril correspondiente y su procedencia geográfica se puede consultar en el anexo 3.

Con relación a las restricciones con las nuevas endonucleasas propuestas, se comprobó que los patrones de bandas obtenidos mediante las diferentes digestiones, se correspondieron, de igual forma, con los patrones teóricamente determinados (figura 24), lo que favorece realizar las diferenciaciones individuales previstas para aquellas entidades que no pueden distinguirse al ser digeridas con *HaeIII*.

Así, la enzima *MluI* distinguió *L. donovani* de *L. infantum*, donde se incluyen *Leishmania archibaldi* y *L. chagasi* respectivamente, *BsaHI* discriminó entre *L. tropica* y *L. aethiopica*, *BccI* permitió distinguir *L. panamensis* de *L. guyanensis* y finalmente, *RsaI* resultó útil para distinguir *L. peruviana* de *L. braziliensis* y *L. naiffi*, así como una

cepa de *L. mexicana*, de *L. amazonensis* y *L. garnhami*, que permanecen con patrón compartido.

El análisis mediante PCR-*hsp70*/RFLP de la cepa M379 de *L. mexicana* permitió verificar que la misma, al digerirse con *RsaI*, mostró un patrón diferente tal como se había previsto en el análisis teórico; mientras que la otra cepa de esta especie estudiada, LH2312, mostró un patrón compartido con el resto de las especies del complejo que permite distinguirlas en su conjunto (figura 25).

El estudio de las posibles diferencias intra-especie con relación a estas nuevas restricciones, solamente evidenció diferencias en tres cepas de *L. braziliensis* (CUM505, LH2162, LH2332), al obtenerse un patrón atípico cuando se digirió con *RsaI*, debido a la presencia de una banda adicional de alrededor de 700 pb, que no se evidenció en el análisis *in silico*, lo que demuestra que existen diferencias entre las cepas de *Leishmania braziliensis* con relación a esta restricción (figura 27).

En resumen, el análisis del polimorfismo del gen *hsp70* permitió proponer un algoritmo que posibilita la diferenciación de la mayoría de las especies de *Leishmania* de importancia médica, partiendo de un mismo producto de amplificación, mediante una o dos restricciones sucesivas y utilizando enzimas que se identificaron tomando como base las diferencias nucleotídicas en las distintas secuencias de cada cepa (figura 28).

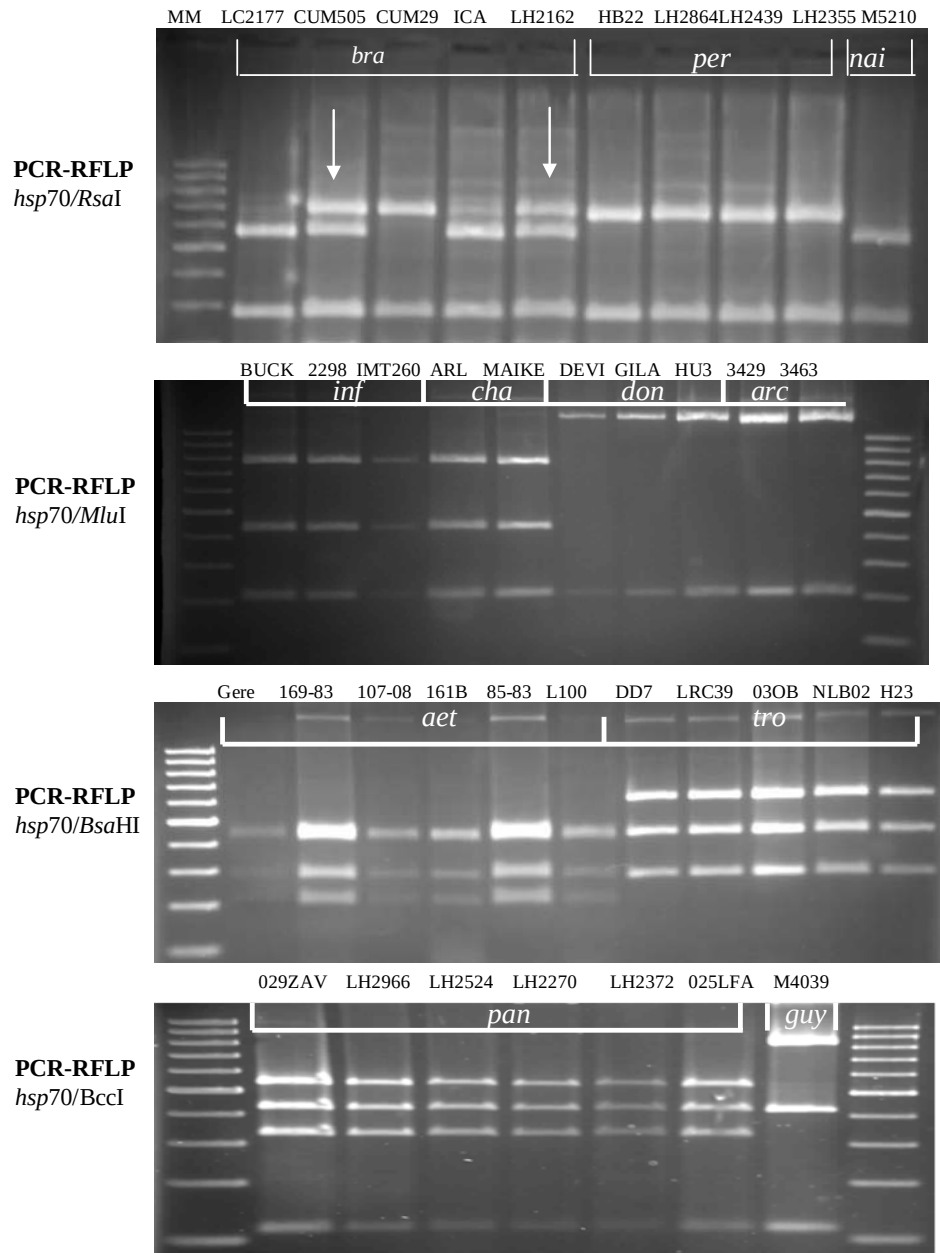


Figura 27. Patrones obtenidos en el análisis de las posibles diferencias entre cepas de una misma especie mediante PCR- *hsp70*/RFLP al utilizar diversas enzimas.

Leyenda: El patrón de peso molecular utilizado fue Gene Ruler 100bp Ladder (MBI, Fermentas, Alemania). Los códigos de cada cepa aparecen sobre el carril correspondiente y su procedencia geográfica puede consultarse en el anexo 3. Las flechas indican dos de las cepas de *L. braziliensis* donde se evidenció el patrón atípico al ser digeridas con *RsaI*.

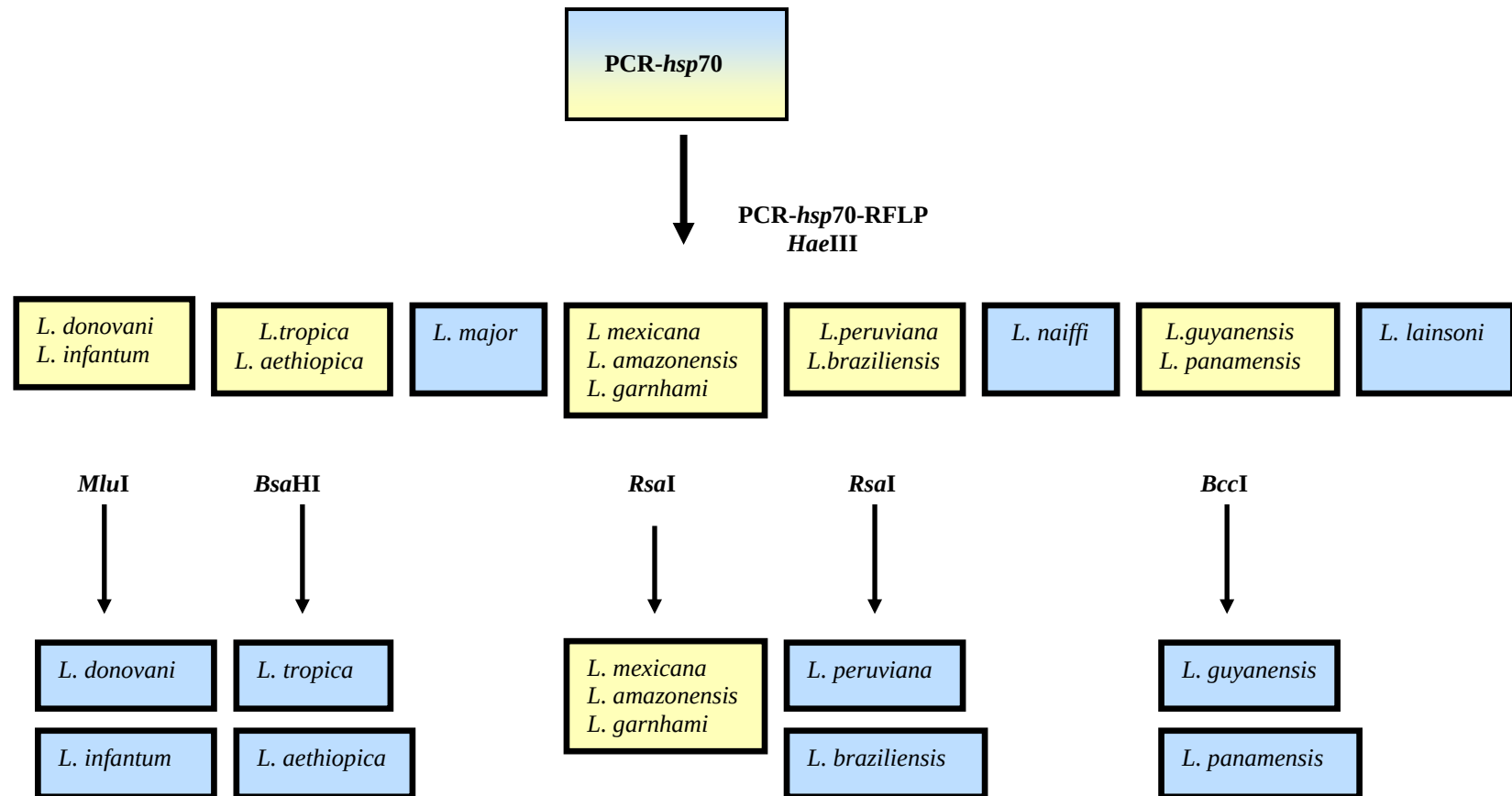


Figura 28. Algoritmo propuesto para diferenciar especies de *Leishmania*.

Leyenda: Tras la obtención del producto de la PCR-*hsp70*, la primera digestión con la enzima *HaeIII*, identifica de manera individual *L. major* y *L. lainsoni*, así como *L. naiffi*, aunque esta última discriminación requiere verificarse con el estudio de cepas adicionales. Se obtienen patrones de digestión adicionales para las especies (*L. donovani*/*L. infantum*); (*L. tropica*/*L. aethiopica*); (*L. mexicana*/*L. amazonensis*/*L. garnhami*); (*L. peruviana*/*L. braziliensis*); (*L. guyanensis*/*L. panamensis*). Una segunda digestión con las enzimas indicadas (*MluI*, *BsaHI*, *RsaI*, *BccI*) permite la identificación individual de las especies que se señalan. Solamente el complejo mexicana no pudo solucionarse. En azul aparecen las entidades taxonómicas que pueden identificarse individualmente, en amarillo las que presentan patrón de bandas compartido.

4.6 Aplicación del algoritmo de identificación de especies a muestras biológicas

Se realizó la PCR *hsp70* utilizando como molde de la reacción inicial el ADN obtenido de diferentes muestras biológicas (aislamientos primarios no caracterizados y muestras clínicas). Se demostró la amplificación del gen que codifica la *hsp70* cuando se utilizó ADN extraído de todos los aislamientos primarios del parásito (n=84) al obtener amplicones de 1,4 kpb en todos los casos (figura 29).

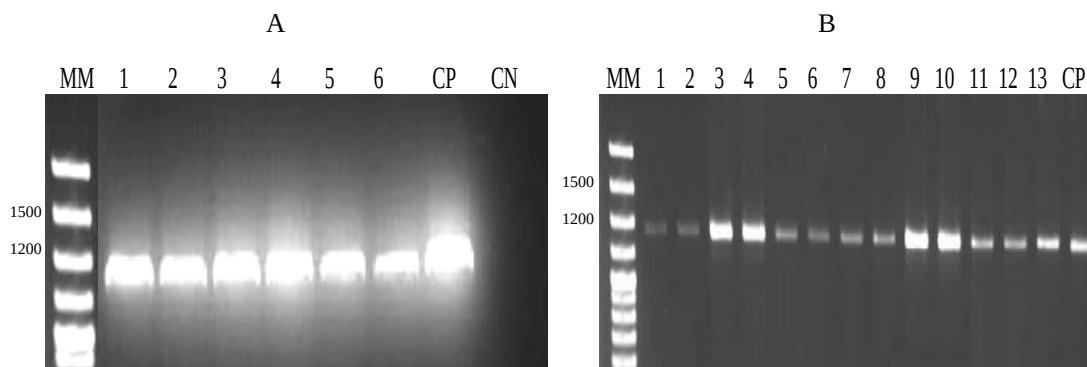


Figura 29. Resultados de la PCR-*hsp70* utilizando ADN de aislamientos y muestras clínicas.
Leyenda: A: Amplicones obtenidos a partir de ADN de aislamientos primarios MM: Marcador molecular Gene Ruler 100bp Plus Ladder (MBI, Fermentas, Alemania) en ambos casos, 1-6: aislamientos primarios procedentes de Colombia, CP: control positivo realizado con ADN de la cepa de *L. braziliensis* CUM180 en ambos casos, CN: control negativo realizado con agua bidestilada estéril en lugar de ADN.
B: Amplicones obtenidos a partir de ADN de algunas muestras clínicas.

De igual forma, se obtuvo amplificación al analizar 54 de las 73 muestras clínicas provenientes de pacientes con leishmaniasis, que procedían en su mayoría de áreas endémicas del Nuevo Mundo (Colombia y Perú), así como de países del Viejo Mundo (Sudán y Turquía), con lo cual se demostró la aplicabilidad de la PCR-*hsp70*, en nuestras condiciones, a la detección del parásito en biopsias y raspados de lesiones cutáneas, así como en aspirado de bazo y médula ósea, en casos de leishmaniasis visceral.

Al determinar el porcentaje de muestras positivas mediante PCR-*hsp70*, según el área geográfica, se obtuvo que para las muestras del Nuevo Mundo analizadas, correspondientes a casos de enfermedad cutánea, la positividad resultó de 95,8%, en tanto para las muestras del Viejo Mundo fue muy baja, de 32%. En este último caso se destaca que todas las muestras de los casos con enfermedad cutánea resultaron positivas (4/4:100%), a diferencia de las provenientes de enfermedad visceral, donde solo 4/21 se

detectaron.

A partir del producto de amplificación de la PCR-*hsp70* se analizaron todos los aislamientos primarios y una parte de las muestras clínicas que resultaron positivas para identificar la especie infectante. Se distinguieron dos grupos de aislamientos primarios de acuerdo a los patrones de bandas obtenidos por PCR-*hsp70*-RFLP/*Hae*III: 14 con patrón correspondiente a (*L. panamensis*/*L. guyanensis*) y 70 con patrón de bandas sugestivo de (*L. braziliensis*/ *L. peruviana*) (figura 30).

Del total de muestras clínicas positivas se tipificaron 15 procedentes de Colombia, dos de casos importados en Cuba atendidos en el IPK, 16 procedentes de Perú, seis de Turquía y una de Sudán. Los patrones de bandas obtenidos por digestión con *Hae*III permitieron agrupar las distintas muestras en cuatro grupos característicos de:

(*L. panamensis* / *L. guyanensis*), (*L. braziliensis* / *L. peruviana*), (*L. tropica* / *L. aethiopica*) y (*L. donovani* / *L. infantum*) (figura 30).

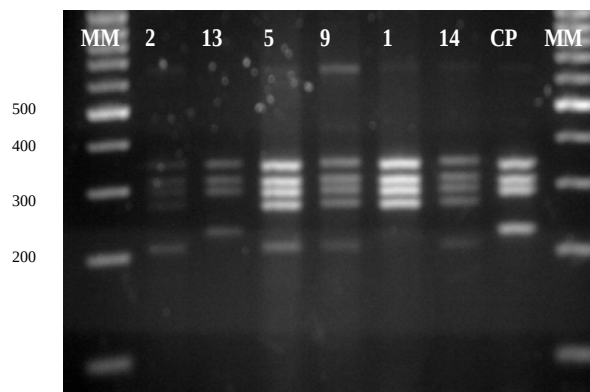


Figura 30. Patrones obtenidos mediante PCR-*hsp70*/RFLP/*Hae*III en distintos tipos de muestras procedentes del Nuevo Mundo.

Leyenda: MM: Marcador de peso molecular Gene Ruler 100bp Ladder (MBI, Fermentas). Patrones correspondientes a (*L. pan*/*L. guy*): número 2 (raspado), 9 y 14 (biopsias), 5 y 1 (aislamientos primarios). Patrón correspondiente a (*L. bra*/*L. per*): 13, (biopsia, Cuba). CP: control positivo de la digestión del producto amplificado de la cepa CUM 180 de *L. braziliensis*.

Debido a la ambigüedad de la primera restricción, se realizó una segunda digestión que permitió tipificar 12 aislamientos con patrón correspondiente a *L. panamensis* y dos con el patrón de *L. guyanensis*, tras la digestión con *Bcc*I (figura 31).

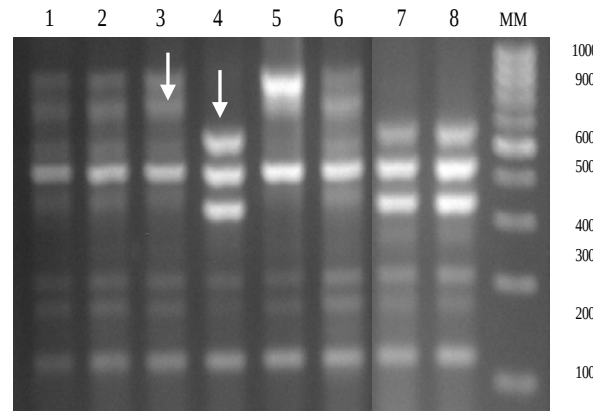


Figura 31. Patrones de bandas obtenidos mediante PCR-*hsp70*-RFLP/*BccI*.

Leyenda: Resultados de la tipificación en cada muestra: *L. panamensis*: 1, 2, 3 (biopsias); 5 (raspado); 6 (aislamiento). *L. guyanensis*: 4 (raspado); 7, 8 (aislamientos). MM: marcador de peso molecular Gene Ruler 100bp Ladder (MBI, Fermentas). Las flechas en los carriles 3 y 4 indican patrones correspondientes a *L. panamensis* y *L. guyanensis* respectivamente.

La restricción con *RsaI* permitió identificar 27 aislamientos como *L. braziliensis*, de acuerdo al patrón de bandas obtenido, en tanto el resto de ellos no se pudieron digerir. Se destaca que en dos de los aislamientos primarios tipificados como *Leishmania braziliensis* y en tres de las muestras clínicas, se obtuvo un patrón atípico, puesto que se observó una banda adicional de alrededor de 700 pb, que no se esperaba del análisis teórico (figura 32).

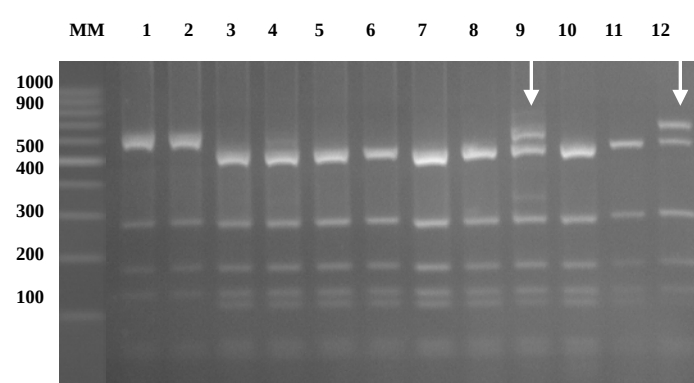


Figura 32. Patrones de bandas obtenidos mediante PCR-*hsp70*-RFLP/*RsaI*.

Leyenda: Resultados de la digestión en muestras clínicas diversas, con patrón previo común para (*L.bra/L.per*). MM: marcador de peso molecular Gene Ruler 100bp Ladder (MBI, Fermentas); Patrón correspondiente con *L. peruviana* en carriles 1 y 2 (biopsias). Patrón correspondiente con *L. braziliensis* en el resto. Los carriles 9 (aislamiento) y 12 (biopsia), señalados con una flecha, muestran el patrón no esperado de *L. braziliensis*.

Al tipificar las especies presentes en las muestras del Viejo Mundo, se verificó que las restricciones con *Mlu*I y *Bsa*HI facilitaron la identificación de las especies infectantes en esas muestras clínicas, ya fueran de lesiones cutáneas o de enfermedad visceral (figura 33).

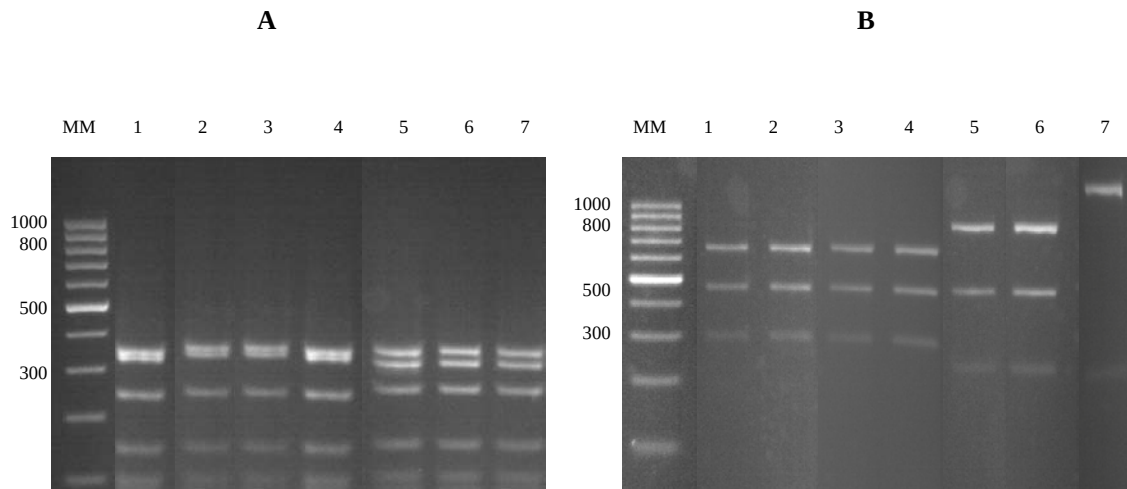


Figura 33 Patrones de bandas obtenidos mediante PCR-*hsp70*/RFLP al digerir productos de amplificación de la PCR-*hsp70* de muestras del Viejo Mundo.

Leyenda: MM: marcador de peso molecular Gene Ruler 100bp Ladder (MBI, Fermentas). A: Digestión con *Hae*III. 1-4: Muestras con patrón correspondiente a *L. tropica*/*L. aethiopica*; 5-7: Muestras con patrón correspondiente a *L. donovani*/*L. infantum*. B: Digestión con *Bsa*HI y *Mlu*I. 1-4: Muestras con patrón característico de *L. tropica*; 5-6: Muestras con patrón característico de *L. infantum*; 7: Muestra con patrón característico de *L. donovani*.

El conjunto de resultados de la tipificación se resume en la Tabla 9.

Tabla 9. Tipificación de muestras clínicas mediante PCR-*hsp70*/RFLP acorde al algoritmo de restricción propuesto.

Procedencia de la muestra	Número muestras tipificadas	Tipo de muestra	1ra digestión PCR-RFLP <i>HaeIII</i>	2da digestión PCR-RFLP
Colombia	15	12 B	12 (<i>L.pan/L.guy</i>)	11 <i>L. pan</i> 1 <i>L. guy</i>
		3 R	3 (<i>L.pan/L.guy</i>)	1 <i>L. guy</i> 2 <i>L. pan</i>
Cuba (CI)	2	2B	1 (<i>L. pan/L. guy</i>) 1 (<i>L.bra/L. per</i>)	1 <i>L. pan</i> 1 <i>L. bra</i>
Perú	16	10 R	10 (<i>L bra/L. per</i>)	6 <i>L.bra</i> 4 <i>L.per</i>
		6 B	6 (<i>L bra/L. per</i>)	6 <i>L.bra</i>
Turquía	6	4 ML 2 S	4 (<i>L. tro/L. aet</i>) 2 (<i>L. don/ L. inf</i>)	4 <i>L. tro</i> 2 <i>L. inf</i>
Sudán	1	1MO	1 (<i>L. don /L. inf</i>)	1 <i>L. don</i>
TOTAL	40	20 B	16 (<i>L.pan/L.guy</i>)	14 <i>L. panamensis</i>
		13 R		2 <i>L. guyanensis</i>
		4 ML	17 (<i>L.bra/L. per</i>)	13 <i>L. braziliensis</i>
		2 S		4 <i>L. peruviana</i>
		1 MO	4 (<i>L. tro/ L. aet</i>) 4 (<i>L. don /L. inf</i>)	4 <i>L. tropica</i> 2 <i>L.infantum</i> 1 <i>L. donovani</i>

Leyenda: CI: casos importados atendidos en el IPK; B: biopsia, R: raspado, ML: material de lesión cutánea S: sangre periférica, MO: aspirado de médula ósea. *L.pan*: *L. panamensis*; *L.guy*: *L. guyanensis*; *L. bra*: *L. braziliensis*; *L. per*: *L. peruviana*; *L. tro*: *L. tropica*; *L. aet*: *L. aethiopica*; *L. don*: *L. donovani*; *L.inf*: *L. infantum*. Las enzimas de restricción utilizadas para realizar las identificaciones individuales fueron: *BccI* (*L.pan/L.guy*); *RsaI* (*L.bra/L.per*); *BsaHI* (*L. tro/L.aet*); *MluI* (*L.don/L.inf*).

Se puede resumir que el algoritmo propuesto se aplicó con éxito a la identificación de *Leishmania* spp. en muestras biológicas y clínicas de distintos tipos y procedencias geográfica, demostrando la aplicabilidad de la metodología recomendada para ese propósito.

V. DISCUSIÓN

5.1 Desempeño analítico de la PCR-*hsp70* en la detección de *Leishmania* spp.

Los métodos moleculares, en particular los que se basan en la PCR, han demostrado ser sensibles y específicos para lograr la identificación de especies de *Leishmania* y facilitan la posterior discriminación de especímenes que infectan humanos, reservorios y vectores a partir de distintos tipos de muestras (García *et al.*, 2007; Jamjoom y Sultan, 2009; Maia *et al.*, 2009). Estas características de la PCR facilitan, al mismo tiempo, su aplicabilidad a escala epidemiológica en distintos contextos geográficos (Oliveira *et al.*, 2005; Katakura, 2009). Sin embargo, hasta el momento ninguno de los métodos reportados se considera de referencia. La falta de consenso podría ser consecuencia de la carencia de reportes sobre la estandarización, los controles de la calidad y evaluación multicéntrica de los protocolos que se aplican, por lo general, adecuados a las condiciones particulares de un país o de una zona geográfica (Castilho *et al.*, 2003; Volpini *et al.*, 2004; Hide y Bañuls, 2006; Gadisa *et al.*, 2007).

En este trabajo, dirigido a desarrollar una herramienta que permita la detección y posterior identificación del parásito, se escogió como diana el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática de *Leishmania*, y se hizo necesario realizar una adecuada optimización de la PCR-*hsp70* para demostrar la consistencia de la técnica en nuestras condiciones.

Los cebadores utilizados, propuestos por García y colaboradores (2004), cumplen los requisitos generales que determinan el éxito de este tipo de reacción (Steffen *et al.*, 1999). La concentración óptima que se determinó responde a que concentraciones superiores produjeron bandas igualmente intensas y concentraciones más bajas favorecerían su posible agotamiento durante la reacción, si tomamos en cuenta que el amplicón esperado es un fragmento del gen de talla considerable (1,4 kpb).

La concentración de magnesio presente en la mezcla de reacción es un factor crucial que afecta el funcionamiento de la enzima *Taq* ADN polimerasa. Su carencia puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad de la misma, incrementando la posibilidad de uniones inespecíficas (Eckert y Kunkel, 1990). La concentración que se escogió en este trabajo coincide a su vez con la más frecuentemente notificada (García *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2009; Tsukayama *et al.*, 2009).

Respecto a la enzima polimerisadora, se considera adecuado un rango entre 0,5 y 2,5 U/50µL de reacción. La utilización de 1 U de enzima se seleccionó como óptima cuando se mantuvieron el resto de los parámetros constantes. Incrementos en la cantidad de enzima y el tiempo de extensión, generarían la aparición de artefactos debido a la actividad exonucleasa intrínseca 5'→3' de la misma, y por tanto, podrían disminuir su especificidad (Steffen *et al.*, 1999).

La sensibilidad analítica alcanzada fue excelente para especies como *L. braziliensis*, con un valor que se traduce en la posible detección de un parásito, y de manera general fue muy buena para otras especies agrupadas en el subgénero *L. (Viannia)*, en tanto la posibilidad de detección para las especies del subgénero *L. (Leishmania)* fue menor, alcanzando valores de hasta 1ng.

Debido a la trascendencia de este aspecto, se considera importante hacer una pausa. El amplicón que se logra con esta PCR es de una talla bastante mayor al compararla con la obtenida al amplificar otras dianas útiles para la detección, entre ellos: los minicírculos de kDNA:116-120 pb (Volpini *et al.*, 2004); ITS-1: 328 pb; (Gadisa *et al.*, 2007; Negera *et al.*, 2008); 18S: 115 pb (Deborggraeve *et al.*, 2008); mientras las copias del gen *hsp70* presente en las distintas especies, aunque variables, son pocas, fluctuando entre 1-15 copias (Mac Farlane *et al.*, 1990; Bock y Langer, 1993; Quijada *et al.*, 1997; Zurita *et al.*, 2003) lo cual podría, teóricamente, explicar la dificultad para alcanzar una alta eficiencia en la reacción. Sin embargo, la diferencia de la sensibilidad entre especies de ambos subgéneros no se corresponde con el número diferente de copias del gen en cada grupo, puesto que no son las especies del subgénero *Leishmania* las que menor número de copias del gen presentan, (Folgueira *et al.*, 2007) de manera que la dificultad pudiera encontrarse en la secuencia de los cebadores.

Los oligonucleótidos utilizados se diseñan con anterioridad tomando en cuenta una región conservada entre dos secuencias de *L. (V) braziliensis* y por tanto, son específicos para esta especie (García *et al.*, 2004), por lo que no se analizaron otros posibles sitios polimórficos en secuencias adicionales que pudieran afectar los sitios de unión. El alineamiento de varias secuencias reportadas con anterioridad y los cebadores utilizados, demostró la presencia de algunos cambios de base en el extremo más próximo al 3', en la zona de unión del cebador *hsp70* positivo, fundamentalmente en especies del subgénero *L. (Leishmania)*. Esto pudiera explicar la variabilidad en los niveles de detección obtenidos y la menor sensibilidad de las especies de este grupo, como posible consecuencia del mal apareamiento entre los cebadores y los sitios de unión a las cadenas complementarias respectivas.

En perspectiva, se podrían diseñar nuevos cebadores que pudieran lograr un apareamiento con los sitios de unión a las secuencias complementarias más eficiente para especies de ambos subgéneros, logrando así amplicones que aumenten la sensibilidad, e incluso la especificidad.

En este trabajo no ocurrió amplificación a partir de los nuevos agentes estudiados, que representan varios parásitos, hongos o bacterias y se corroboró lo reportado previamente: que la *hsp70* presente en *Trypanosoma cruzi* amplifica con los mismos cebadores, y que esta ambigüedad se resuelve mediante digestión enzimática con la enzima *HaeIII*, la misma endonucleasa que permitió realizar las primeras diferenciaciones reportadas entre *Leishmania* spp (García *et al.*, 2004).

Debido a que *Leishmania* spp. y *T. cruzi* pueden coincidir en su distribución geográfica y que se reporta la infección mixta en países como Bolivia y Brasil (Bastrenta *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007) esta inespecificidad pudiera revertirse si se utiliza el ensayo para discriminar entre las entidades mencionadas, así como distinguirlas de *T. rangeli*, que al no ser patógeno para el hombre y coexistir en las mismas áreas geográficas, puede conducir a resultados serológicos contradictorios ante sospecha clínica de la infección (Caballero *et al.*, 2007) y por tanto, a errores diagnósticos. Esto es de gran importancia tanto para áreas endémicas en América Latina como para países donde la

enfermedad de Chagas se considera importada producto de la creciente inmigración (Moncayo *et al.*, 2009), así como en casos de transfusión sanguínea o transplantes de órganos provenientes de personas que han tenido previo contacto con el agente etiológico de esa enfermedad (Tobler *et al.*, 2007).

Una adecuada repetibilidad debe lograrse si existe concordancia entre las réplicas durante la realización de un ensayo y entre las distintas realizaciones del mismo tipo de ensayo. En la PCR de nuestro interés se comprobó que la ejecución del protocolo en distintas réplicas, en días diferentes, no afectó los resultados obtenidos. La reproducibilidad, en cambio, se determina utilizando un ensayo idéntico (protocolo, reactivos y controles) en diferentes laboratorios.

Aunque no fue objetivo de este trabajo realizar una validación multicéntrica de los protocolos empleados, la colaboración establecida con distintos laboratorios durante la ejecución de la investigación conllevó a la necesidad de estudiar la reproducibilidad en las condiciones diferentes de cada uno. Tal como se demostró, se logró la amplificación del gen deseado utilizando ADN de distintas fuentes, sin que pequeños cambios asociados a preparación de tampones, equipos diferentes o manipuladores, provocaran resultados diferentes en los tres laboratorios (de Cuba, Colombia y Bélgica).

Reportes relativos a la reproducibilidad son muy escasos, en tal sentido, se debe mencionar el estudio realizado por Romero y colaboradores (2009), donde se ensayó a ciegas la sensibilidad y reproducibilidad de una PCR útil para la detección en biopsias de piel impregnadas en papel de filtro, que constituye una metodología reciente para la toma de muestras de la leishmaniasis cutánea (Marques *et al.*, 2001).

La PCR-*hsp70* se optimizó en nuestras condiciones y cuenta con adecuados parámetros analíticos que garantizan un buen desempeño para lograr la amplificación del gen *hsp70* en todas las especies de interés incluidas en el estudio.

5.2 Caracterización de las secuencias obtenidas

La alta homología entre las secuencias, tanto nucleotídicas como aminoacídicas, apoya el criterio de que el gen *hsp70* está muy conservado entre las distintas especies y que

dichas secuencias provienen de genes ortólogos, es decir, que la similitud entre ellos proviene de que parten de un ancestro común y mantienen la misma función en cada especie que surge del proceso de especiación (Fitch, 1971).

La presencia de sitios parsimoniosamente informativos significa que al menos dos o más nucleótidos diferentes pueden estar presentes en la misma posición, en dos secuencias. En tales casos el polimorfismo es mayor, y por tanto, se interpretan como sitios potencialmente más útiles para la discriminación.

La proteína que codifica este gen presenta un dominio de unión al ATP en la mitad amino terminal y una parte carboxilo terminal responsable de la unión a polipéptidos (Folgueira *et al.*, 2006) y su actividad se basa en la unión a segmentos peptídicos hidrofóbicos. Aunque el fragmento que se amplificó y secuenció no posee completos los extremos amino y carboxilo, es posible que los pocos cambios de polaridad y carga identificados en dichas posiciones, que se producen en correspondencia con los cambios de aminoácidos identificados, pudieran guardar alguna relación con la función de la proteína, lo cual debería ser investigado con posterioridad mediante nuevas aproximaciones en el análisis de secuencias basadas en la proteómica.

Por otra parte, al comparar las sustituciones aminoacídicas presentes en las distintas secuencias se constata, que las sustituciones sinónimas predominaron sobre las no sinónimas, lo que se corresponde con lo planteado por Kimura (1977) en el sentido de que, las primeras, ocurren en un rango mucho mayor durante la evolución. Además, la relación negativa entre las tasas de sustitución evidencia la ocurrencia de una selección purificadora (Kimura, 1977) encargada de eliminar aquellas mutaciones que “estropean” las adaptaciones ya existentes, garantizando así la función de la proteína, todo lo cual permite valorar la importancia de la selección en la evolución de secuencias (Perfectti *et al.*, 2009).

Existen evidencias que apoyan la idea de que la mayor presión selectiva externa es ejercida por el vector, tanto desde el punto de vista biológico como ecológico. Se conoce

que en la naturaleza una especie de flebótomo se asocia con la transmisión de una especie del parásito, pero se ha demostrado más recientemente, que más de un vector puede estar implicado en ese proceso lo que también indica una adaptación exitosa a las presiones evolutivas (Myskova *et al.*, 2007).

5.3 Utilidad del gen *hsp70* para el análisis filogenético de *Leishmania* spp.

Este acápite no pretende imponer una revisión de la clasificación del parásito basada en este gen, pues la filogenia en base a un gen no refleja necesariamente la filogenia del organismo. La intención es contribuir a la discusión sobre un consenso taxonómico para *Leishmania*, derivado del conjunto de datos generados con anterioridad por otros investigadores y de los obtenidos del análisis del blanco genético escogido por nosotros, que sirva de marco de referencia para la diferenciación de especies que se propone.

Para analizar las relaciones filogenéticas de *Leishmania* se asume que cada entidad taxonómica debería ser monofilética en la naturaleza. Tal como ocurre en todos los organismos unicelulares, en el caso de *Leishmania* los datos que ofrecen los caracteres morfológicos no son suficientes para analizar las relaciones evolutivas de este parásito, por lo cual, para comprender aspectos relativos a su filogenia, es necesario recurrir a la información obtenida por métodos moleculares.

Es necesario recordar que las poblaciones naturales de *Leishmania* se consideran clonales y que como entidad asexual, el concepto biológico de especie, unidad básica de clasificación, es difícil de aplicar a este parásito (Bañuls *et al.*, 1999) por lo que muchos autores, a partir de los datos, métodos y experiencias que posean, emiten criterios diversos sobre la clasificación de algunas especies, subespecies o complejos de especies, en torno a lo cual ha existido un gran debate en los últimos años.

Recientemente, se informa la utilización de secuencias *hsp70* para establecer relaciones filogenéticas entre las especies de *Leishmania* que causan enfermedad en Brasil, en particular del subgénero *L. (Viannia)* (Alves da Silva *et al.*, 2010). Con anterioridad, no existían aplicaciones del uso de este blanco genético para tales fines en este parásito, por

lo que el presente estudio constituye el primer análisis filogenético que involucra cepas representativas de especies del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo con relación a *hsp70*.

Todas las secuencias de *Leishmania* se diferenciaron considerablemente de las dos secuencias de *Trypanosoma* utilizadas como grupo externo, y todas las cepas de *Leishmania* que infectan a mamíferos, así como *L. tarentolae*, conforman un grupo monofilético. Esto se corresponde con resultados de estudios basados en isoenzimas y secuencias de genes provenientes de ITS rDNA, *polA*, *rpoIILS*, 7SL RNA y *cytB* (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993; Croan *et al.*, 1997; Dávila y Momen, 2000; Orlando *et al.*, 2002; Luyo-Acero *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2005) y con la clasificación propuesta por Safjanova (1982) de *L. tarentolae* como subgénero: *L. (Sauroleishmania)*, basada en criterios biológicos, en lugar de clasificarla como un género separado (WHO, 1990; Bañuls *et al.*, 2007).

En relación con los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*, los resultados obtenidos coinciden con la división propuesta por Lainson y Shaw (1987) y ambos constituyen grupos monofiléticos. Mientras *L. (Viannia)* se circunscribe a las regiones neotropicales, *L. (Leishmania)* está presente tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo (Kerr, 2000). Esta dicotomía geográfica se refleja de manera general en base al gen *hsp70*, que muestra la separación de los grupos que componen el subgénero *L. Leishmania* dentro del Nuevo Mundo (representado por el complejo *L. mexicana*, y el Viejo Mundo, donde se presentan varias especies y los llamados complejos de especies. En este punto, los resultados coinciden con otros análisis realizados utilizando otras secuencias como: *polA* y *rpoIILS* (Croan *et al.*, 1997), ITS rDNA (Dávila y Momen, 2000), 7SL RNA (Zelazny *et al.*, 2005), y *cytB* (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Asato *et al.*, 2009).

Por otra parte, el hecho de que las especies del Viejo Mundo se separen del ancestro común de *L. (Leishmania)* tras la divergencia entre los dos subgéneros que parasitan mamíferos, concuerda con la idea del origen de *Leishmania* en el Nuevo Mundo, tal como sugieren otros investigadores (Croan *et al.*, 1997; Noyes 1998; Lukšs *et al.*, 2007). En tal escenario, ambos subgéneros debían evolucionar a partir del ancestro común en el

Nuevo Mundo, tras lo cual las cepas que conquistaron el Viejo Mundo encontraron su camino hacia aquella región.

En este contexto, *L. tarentolae* aparece como una especie que se ramifica desde el Viejo Mundo hacia el Nuevo Mundo, pero que está más próxima al subgénero *L. (Leishmania)* que *L. (Viannia)*, lo cual se deduce tanto del análisis realizado con las secuencias de la *hsp70*; como de análisis previos que utilizan otros genes como *polA* y RNA polimerasa II, (Croan *et al.*, 1997); ITS rRNA, (Orlando *et al.*, 2002); 7SL RNA, (Zelazny *et al.*, 2005) y *cytB*, (Luyo-Acero *et al.*, 2004).

Como se pudo constatar, las secuencias *hsp70* analizadas provenientes de parásitos que infectan mamíferos se agrupan en ocho grupos monofiléticos, cada uno apoyado por valores de bootstrap del 95% o superiores. Estos grupos se corresponden con especies bien definidas por el método de referencia actual, MLEE, o con los llamados complejos de especie. Algunos de ellos contienen distintos subgrupos que se corresponden con especies definidas mediante MLEE. Por su interés, a continuación se discute cada grupo en detalle.

Complejo *L. (L.) donovani*: Esta agrupación se apoya también por estudios anteriores de secuencias de ADN repetidas, (Piarroux *et al.*, 1995), *polA* y *rpoIILS* (Croan *et al.*, 1997), ITS rDNA (Dávila y Momen, 2000, Berzunza-Cruz *et al.*, 2002; Kuhls *et al.*, 2005), *cytB* (Luyo-Acero *et al.*, 2004, Asato *et al.*, 2009) y *gp63* (Mauricio *et al.*, 2007). De acuerdo con la clasificación mediante MLEE, y también a las diferencias en sus vectores, reservorios y patologías que causan (Lainson y Shaw, 1987) las secuencias de este grupo se asignan previamente a cuatro especies: *L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. infantum*, y *L. chagasi*, tal como se nombran al inicio de este trabajo. Como se mencionó, *L. infantum* y *L. chagasi* no se pueden distinguir entre sí. Esto concuerda con resultados obtenidos mediante análisis de microsatélites, RFLP, RAPD y de secuencias de ADN, sobre cuya base, *L. chagasi* se consideró idéntica a *L. infantum*, lo que paralelamente apoya la reciente introducción de *L. infantum* en el Nuevo Mundo (Rioux *et al.*, 1990; Cupolillo *et al.*, 1994; Lukšs *et al.*, 2007).

L. archibaldi se ha cuestionado previamente como un taxón válido debido a que los marcadores utilizados en su análisis no la distinguen de *L. donovani*, entre ellos: glutamato oxaloacetato transaminasa, rDNA ITS, mini-exon, *cpb*, isocitrato deshidrogenasa, enzima málica, manosa fosfato isomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fumarato hidratasa y *gp63* (Lewin *et al.*, 2002; Jamjoon *et al.*, 2004; Kuhls *et al.*, 2005; Quispe-Tintaya *et al.*, 2005, Zemanova *et al.*, 2007). Tampoco sobre la base de las secuencias de la *hsp70* se pudo identificar *L. archibaldi* como especie.

Tomando en consideración el conjunto de datos se recomienda nombrar a todo el grupo de cepas como *L. donovani* y considerar *L. donovani infantum* como una subespecie que podría haber aparecido más recientemente en la evolución.

Complejo *L. (L.) tropica*: De acuerdo con la información obtenida de las secuencias *hsp70*, *L. tropica* no se pudo distinguir de *L. aethiopica* y ambas constituyen un grupo. Esto se observa también en estudios anteriores que utilizan como marcadores *gp63*, *cytB*, 7SL RNA y los genes que codifican ITS rDNA (Dávila y Momen, 2000; Berzunza-Cruz *et al.*, 2002; Luyo-Acero *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2005; Mauricio *et al.*, 2007; Asato *et al.*, 2009). Tomando en consideración resultados de otros autores y el hecho de que ninguno de los grupos es monofilético, se considera recomendable no designarlos como subespecies, y nombrarlos como *L. tropica*.

L. (L.) major: Previamente, Lainson y Shaw (1987) incluyen a *L. major* dentro del complejo *L. tropica*. Sin embargo, *hsp70* la identifica como un grupo monofilético separado de *L. tropica* como también se observa por MLEE (Rioux *et al.*, 1990; Thomaz-Soccol *et al.*, 1993), una secuencia repetida de ADN (Piarroux *et al.*, 1995), *cytB* (Luyo-Acero *et al.*, 2004), 7SL RNA (Zelazny *et al.*, 2005), y la región ITS (Dávila y Momen, 2000; Berzunza-Cruz *et al.*, 2002). Los resultados de este trabajo apoyan la ubicación de *L. major* como especie independiente, como se propuso por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1990) y Bañuls *et al.* (2007).

Complejo *L. (L.) mexicana*: Este complejo incluye tres especies definidas mediante MLEE: *L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. garnhami*. El grupo está bien definido como

un todo, diferente de los tres grupos que conforman *L. (Leishmania)* en el Viejo Mundo y que se acaba de describir. Resultados similares se notifican al analizar otras secuencias de genes: mini-exon (Fernandes *et al.*, 1994), *polA* y *rpoHLS* (Croan *et al.*, 1997), 7SLRNA (Zelazny *et al.*, 2005), ITS rDNA (Dávila y Momen 2000), y *cytB* (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Asato *et al.*, 2009). Sin embargo, análisis previos que utilizan como diana ITS rDNA, reconocen las especies que conforman el complejo, pero ninguna de ellas se pudo distinguir como clado monofilético en el análisis de secuencias de la *hsp70*. Es por ello que ante la imposibilidad de definir subespecies sobre la base de la *hsp70*, *L. mexicana* debería ser entonces el único taxón reconocido mediante este gen.

L. (V.) naiffi: Esta especie constituye uno de los cuatro grupos reconocidos en el subgénero *L. (Viannia)*, y se corresponde con observaciones anteriores (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993; WHO, 1990; Bañuls *et al.*, 2007). La especie se describe en 1989 y su diversidad, en comparación con otros miembros del subgénero, determina su posición a nivel de complejo (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993; Cupolillo *et al.*, 1994; Cupolillo *et al.*, 1995). Pocos estudios analizan el estatus filogenético de esta especie, basados fundamentalmente en los genes que codifican ITS rDNA y mini-exones, y en todos los casos, se analiza solamente un aislamiento con similares resultados (Cupolillo *et al.*, 1995; Spanakos *et al.*, 2008; Sukmee *et al.*, 2008; Villinski *et al.*, 2008; Alves da Silva *et al.*, 2010). Debido a que este análisis se basó igualmente en los resultados obtenidos con una cepa, no se puede proponer su estatus monofilético.

Complejo *L. (V.) braziliensis*: Compuesto por *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Algunos autores sugieren que *L. peruviana* es simplemente una variante de *L. braziliensis* (Grimaldi *et al.*, 1987) y más tarde se demuestra, mediante análisis bioquímicos y moleculares, una alta similitud entre ambas (Dujardin *et al.*, 1995). Sin embargo, en 1999, Bañuls y colaboradores demuestran mediante MLEE y RAPD que *L. peruviana* se corresponde con una unidad de tipificación diferente de otras cepas de *L. braziliensis* analizadas. Esto se corresponde con los datos de este estudio, donde *L. peruviana* se sitúa como un subgrupo dentro de *L. braziliensis*, tanto en los resultados obtenidos mediante árboles como en redes filogenéticas. De ahí que, de acuerdo a las secuencias

de la *hsp70*, se sugiere el estatus de especie *L. braziliensis* para todas las cepas analizadas pertenecientes al complejo, de las cuales *L. braziliensis peruviana* sería una subespecie.

Complejo *L. (V.) guyanensis*: El análisis muestra que *L. guyanensis* y *L. panamensis* forman un complejo monofilético (97% de bootstrap), lo que coincide con lo reportado en estudios anteriores basados en la comparación de isoenzimas (Rioux *et al.*, 1990; Thomaz-Soccol *et al.*, 1993; Cupolillo *et al.*, 1994), los patrones de restricción de la región ITS rDNA (Cupolillo *et al.*, 1995) y los análisis filogenéticos basados en ITS rDNA y *cytB* (Dávila y Momen 2000, Luyo-Acero *et al.*, 2004). Dentro del complejo, ambas especies forman sub-grupos monofiléticos, y confirman los resultados de análisis que utilizan ITS rDNA y que muestran una clara separación entre ambos (Berzunza-Cruz *et al.*, 2002; Spanakos *et al.*, 2008; Villiski *et al.*, 2008). Sin embargo, en esos estudios solamente se analizaron una o dos cepas por cada especie y tampoco en el presente análisis se pudo comprobar el carácter monofilético de *L. guyanensis* excluyendo a *L. panamensis* (valor de bootstrap por debajo de 70%), y sólo se pudo analizar dos cepas de *L. panamensis*. Por otro lado, aunque, el clado monofilético de *L. panamensis* está apoyado por un valor de bootstrap ligeramente inferior a 90% (88%), el análisis mediante redes filogenéticas identificó a las dos cepas de *L. panamensis* analizadas como un sub-grupo bien definido. De ahí que, considerando los datos obtenidos de la *hsp70*, todas las especies se deberían identificar como parte del complejo *L. guyanensis*, con *L. guyanensis panamensis* como subespecie.

L. (V.) lainsoni: Esta especie reúne caracteres que la diferencian de manera particular del subgénero *L. (Viannia)*, tanto biológicas (morfología, crecimiento en cultivo axénico); bioquímicas (perfiles enzimáticos en electroforesis) y moleculares, aunque algunos datos obtenidos por técnicas moleculares y bioquímicas no son aún conclusivos en relación a su posición taxonómica dentro de dicho subgénero (Correa *et al.*, 2005). Los diferentes árboles filogenéticos contruidos con datos obtenidos de las secuencias *hsp70*, presentan a *L. lainsoni* como la especie más divergente dentro del subgénero *L. (Viannia)*, a pesar de presentar un bajo valor del bootstrap (menor de 70%). Resultados similares se

obtuvieron tras realizar un análisis filogenético basado en los genes que codifican los mini-exones (Fernandes *et al.*, 1994). Los datos obtenidos muestran que *L. lainsoni* es una especie separada dentro del subgénero *L. (Viannia)*, tal como se describe con anterioridad (Cupolillo *et al.*, 1994; Bañuls *et al.*, 2007; Alves da Silva *et al.*, 2010).

5.4 Identificación de especies de *Leishmania* en base al análisis teórico y verificación de la factibilidad mediante PCR-*hsp70*/ RFLP

Una vez definido el cuadro taxonómico basado en el gen *hsp70*, se consideró la posibilidad de ampliar el uso de la PCR-*hsp70*/RFLP a otras especies del Nuevo Mundo no abordadas previamente, así como explorar su uso en el Viejo Mundo, como metodología para identificar estas entidades taxonómicas en un contexto global.

De las endonucleasas identificadas para realizar la segunda digestión enzimática algunas se eliminaron según los siguientes criterios: aquellas que al digerir, generan numerosos fragmentos pequeños (menores de 50 pb), las que muestran polimorfismo intra-específico y que se consideren raras al ser difíciles de obtener. De las restantes, teniendo en cuenta tanto el número como el tamaño de los fragmentos generados, y su carácter individual en relación a las distintas especies, se propusieron nuevas enzimas de restricción capaces de identificar individualmente el mayor número posible de especies, u otras entidades taxonómicas, mediante segundas digestiones enzimáticas.

Se discutirán las inconsistencias que se encontraron entre el análisis *in silico* realizado y su comprobación mediante PCR-*hsp70*-RFLP, para así, identificar las fortalezas y debilidades de la propuesta. En general, la correspondencia entre las aproximaciones teórica y práctica fue muy buena, puesto que se identificaron muy pocas ambigüedades, correspondientes a *L. naiffi* y *L. mexicana*. En el primer caso, no se obtuvo total coincidencia entre ambos análisis ya que contrario a lo que se esperaba, se obtuvo una banda adicional que no presenta ninguna otra especie y que permitió distinguir *L. naiffi* del grupo *L. braziliensis*-*L. peruviana*. A pesar de que nuevas secuencias se reportan recientemente para *L. naiffi* (Alves da Silva *et al.*, 2010), su análisis demuestra la imposibilidad teórica de realizar la distinción entre esas entidades con *HaeIII*, por lo

que, dado que solamente se pudo analizar el ADN de una cepa en este trabajo, es difícil hacer inferencias al respecto.

Con relación a *L. mexicana*, la PCR-RFLP muestra un patrón para *HaeIII* específico para el complejo de especies, y no es posible separar *L. mexicana*/ *L. amazonensis*/ *L. garnhami* en ninguna de las cepas analizadas. Sin embargo, el análisis *in silico* muestra que las dos secuencias pertenecientes a la cepa LTB0016 presentan patrones diferentes con relación al resto del complejo de especies. Esta incongruencia se puede explicar como un error en las secuencias reportadas: L14604 y L14605, derivadas de cDNA y DNAg (Bock y Langer, 1993), las cuales deberían ser idénticas, pero esto no se cumple en la posición 37. De manera adicional, la desviación que presentan con relación al resto de las secuencias alineadas en la posición 1171, donde aparece GGCC en lugar de GCGC, se podría corresponder con una inversión GC erróneamente interpretada, lo que pudiera ocurrir por la presencia de artefactos del gel en una región rica en GC donde el sitio en cuestión está ubicado.

La digestión propuesta con *RsaI*, solo permitió distinguir la cepa de *L. mexicana* M379 del resto de las analizadas, lo que pudiera reflejar las diferencias asociadas al origen de las cepas: Centro América en el primer caso y América del Sur en el resto. La fuerte correlación entre la diversidad genética de las cepas y su origen geográfico, se demostró con anterioridad mediante datos obtenidos mediante MLEE, RAPD y métodos moleculares al estudiar otras especies de otras zonas geográficas (Lukšs *et al.*, 2007). Es importante señalar que, dado que el análisis filogenético de estas entidades no apoya su carácter monofilético (Asato *et al.*, 2009), no sorprende el hecho de que no se haya identificado una enzima que permita su discriminación individual.

También la digestión con *RsaI* fue útil para distinguir *L. braziliensis* de *L. peruviana*; sin embargo, en algunos casos se observó una banda adicional en *L. braziliensis* que resultó en un patrón atípico, no esperado del análisis teórico. Es posible que existan cepas dentro de *L. braziliensis* con alelos diferentes en el sitio de reconocimiento de la enzima *RsaI* en la posición 115, de manera que la presencia de los nucleótidos A o G determine

un cambio en la secuencia de reconocimiento del sitio de corte para *RsaI* y por tanto, la posibilidad de que la digestión enzimática origine fragmentos de 578 pb y de 685 pb, que den lugar a ese patrón no esperado. Otra explicación podría ser que ese patrón de corresponda con parásitos híbridos (*L. braziliensis* + *L. peruviana*), tal y como se propone por Dujardin y colaboradores en 1995, y más recientemente por Nolder y colaboradores, utilizando tipificación por microsatélites (Nolder *et al.*, 2007). Se sugiere también, a partir de un estudio realizado en 124 aislamientos provenientes de pacientes de Bolivia y Perú, que en *L. braziliensis* la reproducción clonal alterna con la sexualidad y que la ocurrencia de eventos recombinantes ocasionales entre parásitos de la misma especie, pero de distinto genotipo, pudiera justificar las diferencias encontradas (Rougeron *et al.*, 2009).

Entre los reportes que proponen la identificación de especies basada en la PCR-RFLP se encuentran en el Nuevo Mundo: IRT (Cupolillo *et al.*, 1995); *gp63* (Victoir *et al.*, 2003); una región no traducida de la G6PD (Castilho *et al.*, 2003); los minicírculos del kADN (Volpini *et al.*, 2004); *hsp70* (García *et al.*, 2004) y SSU-ITS-1 (Rotureau *et al.*, 2006). En el Viejo Mundo, ITS-1 (Schönian *et al.*, 2003; Gadisa *et al.*, 2007; Negera *et al.*, 2008); *cpb* (Quispe-Tintaya *et al.*, 2004) y kDNA (Bensoussan *et al.*, 2006). Sin embargo, con anterioridad a este trabajo, la propuesta más fundamentada para discriminar especies del Viejo Mundo y Nuevo Mundo correspondió a la informada por Marfurt y colaboradores (2003; 2003a). Este grupo propone los mini exones como diana (*spliced leader* en inglés), que al igual que el gen *hsp70* se encuentra en un número de copias diferentes según la especie, muestra una sensibilidad analítica distinta de acuerdo al subgénero y presenta inespecificidad dada por la amplificación de tres especies de *Crithidia* (Marfurt *et al.*, 2003). A diferencia de los resultados de este trabajo, el producto de amplificación que se notifica tiene diferente talla según el subgénero.

Un análisis profundo permite identificar como aspectos más débiles de esa propuesta la presencia de numerosas inconsistencias entre el esquema teórico de genotipaje y los resultados de la PCR-RFLP, la falta de correspondencia entre los patrones esperados en varias secuencias del Banco de genes y la RFLP, las incongruencias relacionadas con

diferencias asociadas a errores en la secuenciación; y en términos prácticos, la imposibilidad de distinguir especies cuya diferenciación es importante para varios países de nuestra área geográfica, como *L. braziliensis*/*L. peruviana* ni *L. panamensis*/*L. guyanensis*. En cambio, su aplicación al análisis de un variado grupo de muestras clínicas que incluyen el aspirado duodenal y gástrico, con un 89% de sensibilidad diagnóstica (Marfurt *et al.*, 2003a) constituye un aspecto de gran relevancia y utilidad para su aplicación práctica.

5.5 Aplicación del algoritmo propuesto a la tipificación de *Leishmania* spp. en muestras biológicas y clínicas

En el caso de los aislamientos primarios, la PCR-*hsp70* amplificó el fragmento deseado a partir del ADN obtenido del total de ellos obteniéndose bandas muy intensas, lo cual es lógico considerando que esos aislamientos se corresponden con cultivos primarios axénicos, de donde se obtiene ADN del parásito puro, y por tanto, con mayores posibilidades de amplificación debido a la ausencia de inhibidores que puedan afectar la reacción, como se reporta en muestras clínicas (García *et al.*, 2007). El hecho de que los 84 aislamientos resultaran positivos a la PCR-*hsp70* facilitó la posterior discriminación de especies en cada caso. En Brasil se informa el uso de protocolos de PCR para caracterizar aislamientos de *Leishmania* (Lima-Junior *et al.*, 2009), y en Bolivia se logra discriminar la especie infectante en un caso de infección mixta LMC-VIH, a partir del análisis mediante PCR-RFLP de parásitos aislados de un cultivo (Torrico *et al.*, 2009).

En el caso de las muestras clínicas analizadas, la PCR-*hsp70* detectó ADN de *Leishmania* en 46/48 muestras del Nuevo Mundo (95,8% de positividad). Las dos muestras que no se detectaron (aspirado y raspado, ambos de Perú) pudieran explicarse porque se tratara de lesiones de mayor evolución o estado de desarrollo, donde la presencia de parásitos en el sitio de la lesión puede ser menor (Weigle *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1994).

Con anterioridad, se usa el gen *hsp70* como diana y se reporta 100% de sensibilidad en biopsias de lesiones cutáneas (26/26) (García *et al.*, 2004) y poco después, con muestras

tomadas de forma invasiva y no invasiva se informa un 95% de sensibilidad total (García *et al.*, 2007). No existen referencias adicionales de la aplicación de esta PCR-*hsp70* para el Nuevo Mundo.

Otros trabajos notifican la detección de ADN de *Leishmania* en muestras clínicas diversas de esta zona geográfica. Al emplear el SSU-rDNA-PCR, se obtiene un 90,9% de sensibilidad para muestras embebidas en parafina (90/99) (Amato *et al.*, 2009), mientras que al emplear kDNA como diana se reporta un valor de 89,3% para biopsias de lesión, (Ampuero *et al.*, 2009) y un 88,3%, en muestras impregnadas en papel de filtro (Romero *et al.*, 2009). De acuerdo con la literatura revisada, los valores más bajos corresponden a la detección de kDNA en muestras de sangre periférica de pacientes con leishmaniasis tegumentaria en municipios endémicos de Pernambuco, Brasil, con 48,7% (58/119) de sensibilidad (Martins *et al.*, 2010). En Perú, se reporta 94,2% de detección para aspirados y raspados (50/66), en tanto la sensibilidad en muestras tomadas sobre papel de filtro (48/66) resultó comparable, de 92,3%, usando como blanco nuevamente kDNA (Boggild *et al.*, 2010).

En el caso de las muestras clínicas provenientes del Viejo Mundo, la sensibilidad diagnóstica obtenida fue considerablemente menor: 32% (8/25). Este resultado no sorprende si se toma en consideración que el análisis de la sensibilidad analítica demostró menor detección para las especies del subgénero *L. (Leishmania)*, que están fundamentalmente representadas en dicha área geográfica, lo cual se explicó previamente por un mal apareamiento entre los cebadores y los sitios de unión a las cadenas complementarias.

Se debe tener en cuenta que este porcentaje refleja la positividad correspondiente a presentaciones clínicas muy diferentes. En los casos de enfermedad cutánea, la sensibilidad de 100% obtenida, es comparable con la reportada por otros autores al utilizar otras dianas genéticas, como 18S-rRNA: 99,3%, en Túnez (Chargui *et al.*, 2005), kDNA: 98,7% e ITS1:91,0% en Israel (Bensoussan *et al.*, 2006). Por otra parte, también

se reportan valores más bajos, de 84,6% (18S-rRNA) en Marruecos (Lemrani *et al.*, 2009) y 53,8% (SLME) en Israel (Bensoussan *et al.*, 2006).

Para las muestras provenientes de pacientes con enfermedad visceral, mayoritariamente de sangre periférica, la positividad fue mínima (19%). Varios factores pudieran influir, como la menor sensibilidad del método para detectar parásitos del subgénero *L. (Leishmania)*, el bajo número de copias del gen, o el tipo de muestra utilizada. Sin embargo, se han reportado valores altos de sensibilidad de la PCR para la LV en el Viejo Mundo usando sangre, al emplear dianas específicas o con un número considerable de copias en el genoma del parásito, como kDNA (100% y 99% de sensibilidad diagnóstica) en la India (Maurya *et al.*, 2005), SSU-rRNA (93,3% y 100%) en Italia (Gatti *et al.*, 2004) y España (Cruz *et al.*, 2006). Aunque las dianas genéticas utilizadas en estas investigaciones son diferentes y no es posible realizar comparaciones, es obvio que la aplicación de la PCR para este tipo de muestra es consistente y deben realizarse estudios futuros en este sentido.

Otros autores documentan la relación entre la sensibilidad y el tipo de muestra utilizada (Antinori *et al.*, 2007; Babiker *et al.*, 2007; Boggild *et al.*, 2010), así como la conveniencia de usar muestras clínicas tomadas de forma menos invasiva (Mimori *et al.*, 2002; García *et al.*, 2007), por lo que sería interesante realizar estudios posteriores que tomen en cuenta estos aspectos.

En relación con la discriminación individual de las especies, se discutirá la importancia de distinguir los binomios de especies identificados en las distintas muestras tras la primera digestión enzimática. (*L. guyanensis* / *L. panamensis*) se corresponde con una agrupación del árbol filogenético, ambas entidades taxonómicas son responsables de diferentes formas clínicas cutáneas, que van de lesiones simples a múltiples nódulos que siguen una distribución linfática (WHO, 1990) y en ambos casos, se reporta la posibilidad de diseminación sanguínea o linfática de los parásitos (Osorio *et al.*, 1998) a pesar de que su compromiso mucoso es menos destructivo que la forma crónica y desfigurante de la enfermedad, ocasionada por *L. braziliensis* (Marsden *et al.*, 1986).

En algunos contextos *L. guyanensis* puede ser difícil de curar y se requiere la aplicación de varios ciclos de tratamiento con antimoniales, y en otros se notifica una buena respuesta, a diferencia de *L. panamensis* que responde rápidamente a estas drogas (Lainson y Shaw, 1987; Arévalo *et al.*, 2007). La tipificación del mayor número de muestras como *L. panamensis* concuerda con reportes previos sobre la distribución de esta especie en Colombia, país de donde provienen la mayoría de ellas (Corredor *et al.*, 1990; Saravia *et al.*, 2002). Las restantes fueron clasificadas como *L. guyanensis*, especie usualmente selvática, que recientemente se relacionó con un brote epidémico de LC en Colombia (Rodríguez-Barraquer *et al.*, 2008), lo que llama la atención a propósito de los cambios reportados en la transmisión de distintas especies del parásito en relación a los cambios climáticos en ese territorio (Cárdenas *et al.*, 2006).

Se considera importante distinguir entre las entidades taxonómicas que conforman el grupo (*L. braziliensis*/*L. peruviana*) en muestras clínicas. Aunque ambas causan lesiones cutáneas, su evolución se caracteriza por una severidad diferente en relación con la especie: mientras *L. peruviana* causa lesiones que por lo general son pequeñas y pueden sanar espontáneamente (Arana *et al.*, 1990) *L. braziliensis* es mucho más agresiva y causa metástasis en el 10% de los casos (Desjeux, 2001) provocando una lesión mucosa mutilante (Marsden, 1986). Por otra parte, se demuestra una alta proporción de falla al tratamiento en pacientes infectados con *L. braziliensis* en Perú (Arévalo *et al.*, 2007; Llanos-Cuentas *et al.*, 2008).

Del grupo de muestras en las que se evaluó la posible diferenciación mediante PCR-*hsp70*/RFLP/*RsaI*, no se identificó ninguna con el patrón correspondiente a *L. peruviana* en aquellas provenientes de Colombia, donde hasta el momento, no se ha reportado la presencia de esa entidad. Por el contrario, en 12 de las muestras clínicas provenientes de Perú se identificó *L. braziliensis*, especie bien distribuida en este territorio (Lucas *et al.*, 1998; Arévalo *et al.*, 2007) y en tres de ellas, se presentaron patrones de bandas atípicos, al igual que ocurrió en algunos aislamientos antes analizados, lo que se discutió con anterioridad.

Se considera necesaria la distinción entre *L. tropica* y *L. aethiopica* pues a nivel clínico y de tratamiento se comportan de manera diferente (Blum *et al.*, 2009; Gadisa *et al.*, 2007). *L. aethiopica* es una especie con menor respuesta al tratamiento y responsable de varias formas clínicas que incluyen la presentación mucocutánea en el Viejo Mundo (Teklemariam *et al.*, 1994), por lo cual definir su presencia en una muestra es relevante.

La digestión con *Bsa*HI permitió identificar *L. tropica* en muestras procedentes de Turquía y se distinguió *L. donovani* de *L. infantum* en una muestra de Sudán al digerir con *Mlu*I. A excepción de una propuesta de Arora *et al.*, (2008), que utiliza un fragmento del gen *hsp70* para identificar *L. donovani* de manera específica mediante PCR, no existen aplicaciones anteriores de este blanco en esa área geográfica para la detección o la tipificación de *Leishmania*.

Otros autores proponen alternativas para distinguir entre *L. donovani*/*L. infantum*, así como entre *L. tropica*/*L. aethiopica*. En ambos casos el gen *cpb* ofrece varias alternativas como diana de la PCR o de la PCR-RFLP (Hide y Bañuls, 2006; Hide *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 2009; Gadisa *et al.*, 2010, y se utiliza también la región génica ITS-1 (Gadisa *et al.*, 2007; Spanakos *et al.*, 2008).

En Turquía existen siete regiones geográficas con ambientes ecológicos diferentes con los cuales se relaciona la distribución de los parásitos de distintas especies (Ozensoy *et al.*, 2009). Se considera que *L. tropica* es el agente causal principal de la leishmaniasis cutánea antroponótica en el territorio (Ok *et al.*, 2002), mientras *L. infantum* es responsable de la leishmaniasis visceral y canina (Ertabaklar *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha relacionado *L. infantum*, usualmente viscerotrópica, con la enfermedad cutánea en algunos pacientes de distintos distritos (Serin *et al.*, 2005; Ozensoy *et al.*, 2009), lo que reviste gran importancia clínica y epidemiológica. Aunque no hay distinción en el tratamiento que se indica para ambas entidades en ese país, se documenta que las lesiones que causa *L. tropica* son por lo general más difíciles de tratar con antimoniales (Shani-Adir *et al.*, 2005) y en países fronterizos, como Irán, se identificó *L. infantum* como agente causal de la forma cutánea diseminada y visceral (Alborzi *et al.*, 2008).

Sudán se considera el mayor foco mundial de leishmaniasis visceral, la enfermedad infecciosa de mayor importancia en el país (Zijlstra y el-Hassan, 2001). Las mayores evidencias epidemiológicas apuntan a que la LV allí es una zoonosis causada por *L. donovani* (Osman *et al.*, 2000; Elnaiem *et al.*, 2003), y se confirma por análisis electroforéticos y moleculares (Oskam *et al.*, 1998) lo que sustenta la clasificación de la única muestra que se pudo analizar, proveniente de ese territorio.

La demostración total de la utilidad del algoritmo de tipificación que se propone será posible en la medida que se puedan validar las diferentes propuestas de digestión enzimática en la identificación de muestras de distinta procedencia geográfica, donde circulen los parásitos de importancia médica que hemos estudiado. Por tanto, diversos estudios se pueden derivar de la aplicación de las herramientas desarrolladas.

En el contexto actual, en que las migraciones humanas, los eventos climatológicos y el intercambio entre países y áreas geográficas son crecientes, sería útil disponer de herramientas que, como esta que se propone, tengan un alcance global, aplicable a diversas situaciones epidemiológicas y donde el desarrollo tecnológico, aún cuando no es asequible a todos, permita beneficiar a las grandes masas de personas que viven en áreas susceptibles y se encuentran en riesgo de padecer leishmaniasis, una enfermedad desatendida y ligada a los sectores más pobres y marginados de los países endémicos.

VI.1 CONCLUSIONES

- 1- Se demostró la posibilidad de detectar el gen *hsp70* en 16 especies de *Leishmania* mediante PCR-*hsp70*, de las cuales nueve se estudian por primera vez con relación a este gen.
- 2- Las nuevas secuencias nucleotídicas *hsp70* y sus secuencias aminoacídicas correspondientes podrían resultar de utilidad en estudios posteriores relacionados con el diagnóstico, la búsqueda de blancos terapéuticos o vacunas.
- 3- Las relaciones filogenéticas entre las entidades taxonómicas estudiadas son consistentes y confirman las principales agrupaciones establecidas para otros blancos genéticos y marcadores.
- 4- El análisis teórico de las secuencias nucleotídicas del gen *hsp70* demostró que la variación nucleotídica identificada entre las distintas entidades taxonómicas es suficiente para tipificar, de manera individual, la mayoría de ellas.
- 5- Se demostró que el algoritmo teórico de identificación propuesto, basado en la PCR-*hsp70*/RFLP, es válido para tipificar el parásito en muestras biológicas y clínicas de distintos tipos y procedencias, lo que pudiera ser una alternativa en centros asistenciales de países endémicos, de referencia o clínicas del viajero.

VI.2 RECOMENDACIONES

- 1- Incrementar la sensibilidad de la PCR-*hsp70* mediante el diseño de nuevos cebadores que amplifiquen un fragmento del gen de menor talla y tomen en cuenta el polimorfismo identificado en las nuevas secuencias *hsp70* determinadas para las entidades taxonómicas analizadas.
- 2- Realizar una validación multicéntrica del algoritmo propuesto, que abarque diferentes contextos geográficos, para evaluar su aplicabilidad en diversas situaciones epidemiológicas que involucren al hombre, vectores y/o reservorios.
- 3- Profundizar en el análisis de las secuencias aminoacídicas de la HSP70 con el objetivo de explorar la utilidad de la proteína en otros estudios.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkafa F, Dilmen F, Apua Z. Identification of *Leishmania* parasites obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic regions, Sanliurfa province, in Turkey. *Parasitol Res* 2008;103:583-6.
- Alam MZ, Kovalenko DA, Kuhls K, Nasirova RM, Ponomareva VI, Fatullaeva AA, *et al.* Identification of the agent causing visceral leishmaniasis in Uzbeki and Tajiki foci by analyzing parasite DNA extracted from patients' Giemsa-stained tissue preparations. *Parasitology* 2009;136:981-86.
- Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, Motazedian, GRH, Kadivar MR. Case report: isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:435-37.
- Alexander J, Bryson K. T helper: Th1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 2005;99:17-23.
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 1999;112:2993-3002.
- Al-Jawabreh A, Diezmann S, Müller M, Wirth T, Schnur LF, Strelkova MV, *et al.* Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania* (*Leishmania*) *major* by microsatellite analysis. *BMC Evol Biol* 2008;8:183.doi:10.1186/1471-2148-8-183.
- Alvar-Ezquerro JP. Las leishmaniasis: de la biología al control. Lab Intervet S.A. eds. Salamanca, España, 2003.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:334-59.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez, R, *et al.* *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:298-319.

- Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006;61:227-79.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006a; 22:552-57.
- Alves da Silva L, dos Santos de Sousa C, Cardoso da Graça G, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Inf Gen Evol* 2010;10:77-83.
- Amato VS, Rabello A, Rotondo-Silva A, Konoa A, Maldonado TPH, Alves IC, *et al.* Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. *Acta Trop* 2004;92:127-32.
- Amato VS, Tuon FF, de Andrade HF, Bacha JH, Pagliari C, Raniero Fernandes E, *et al.* Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. *Int J Dermatol* 2009;48:1091-95.
- Ampuero J, Pereira Rios A, Carranza-Tamayo CO, Romero GAS. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104: 992-97.
- Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni R, *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: A single center, 8 year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007;44:1602-10.
- Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, *et al.* Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis?. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:46-51.
- Arana M, Evans DA, Zolessi A, Llanos-Cuentas A, Arévalo J. Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:526-29.
- Arévalo J, Ramírez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C. *et al.* Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Inf Dis* 2007;195:1846–51.

- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, *et al.* Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* 2002;49:42-3.
- Arisue N, Sánchez LB, Weiss LM, Muller M, Hashimoto T. Mitochondrial- type *hsp70* genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int* 2002a;51:9-16.
- Arora SK, Gupta S, Bhardwai S, Sachdeva N, Sharma NL. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:41-5.
- Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, *et al.* Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol* 2009;121:352-61.
- Attar ZJ, Chance ML, El-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, *et al.* Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2001;78:11-6.
- Babiker ZOE, Davidson R, Mazinda C, Kipnetich S, Ritmeijer K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:689-93.
- Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007;25:203-11.
- Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol* 1998;30:435-43.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007;64:1-109.
- Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol* 1999;29:1137-47.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Neto M, Carvalho E. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:256-59.
- Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, Vargas F, Flores M, Machane M. *et al.* Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:255-64.

- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006;44:1435-39.
- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis* 1997;24:684-703.
- Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa-Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I.. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 2002;88:918-25.
- Bhattacharya SK, Sur D, Sinha PK, Karbwang J. Elimination of leishmaniasis (kala-azar) from the Indian subcontinent is technically feasible & operationally achievable. *Indian J Med Res* 2006;123:195-96.
- Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, *et al.* Genetics and visceral leishmaniasis of mice and man. *Parasite Immunol* 2009;31:254-66.
- Blum JA, Hatz CF. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. *J Travel Med* 2009;16:123-31.
- Bock JH, Langer PJ. Sequence and genomic organization of the *hsp70* genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;62:187-97.
- Böelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, Van Damme W, Le Ray D, Van der Stuyft P. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:465-71.
- Böelaert M, El-Safib S, Hailuc A, Mukhtarb M, Rijal S, Sundar S, *et al.* Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:32-40.
- Bogaert-Díaz RF, Rojas A, Leon D, Martínez M, Quiñones L. Leishmaniasis tegumentaria americana. Reporte de los primeros tres casos descubiertos en R.D. Forma anérgica en tres hermanos. *Rev Dom Dermatol* 1975;9:19-33.
- Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arévalo J, Adaui V, Gianfranco T, *et al.* Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol* 2007;7:3680-84.
- Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arévalo J, *et al.* Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Inf Dis* 2010;50:1-6.
- Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito ME, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological

- surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999;93:488-94.
- Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, *et al.* The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. Am J Trop Med Hyg 2002;67:344-48.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infections in humans and determine cross reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. Clin Vaccine Immunol 2007; 14:1045-9.
- Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, *et al.* *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. BMC Infect Dis. 2006;13;6:139. doi:10.1186/1471-2334-6-139.
- Cárdenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales A, Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. Am J Trop Med Hyg 2006;75:273-77.
- Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin. Microbiol 2003;41:540-46.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007;5:873-82.
- Chargui N, Bastien P, Kallel K, Haouas N, Messaid-Akrout F, Masmoudi A *et al.* Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005;99:762-8.
- Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JMC. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Proc Nat Acad Sci USA 1999;96:15155-60.
- Coler RN, Reed SG: Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends Parasitol 2005, 21:244-49.

- Correa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus, a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100:587-92.
- Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, *et al.* Distribution and ecology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg 1990;42:206-14.
- Courmes E, Escudien A, Fauran P, Monnerville A. Premier cas autochtone de leishmaniose viscerale humaine a la Guadeloupe. Bull Soc Pathol Exot 1966;59:217-26.
- Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. Mol Biochem Parasitol 1997;89:149-59.
- Croft S, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res 2006;123:399-410.
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol 2003;19:502-8.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006a;19:111-26.
- Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, *et al.* Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric mediterranean visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006;44:2343-7.
- Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg 1994;50: 296-311.
- Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 1995;73:145-55.
- Davies CR, Kaye P, Croft, SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. BMJ 2003; 326:377-82.
- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodríguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saúde Publica 2000; 16:925-50.
- Dávila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:651-4.
- Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M. *et al.* A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of

- leishmaniasis. J Infect Dis 2008;198:1565-72.
- Desjeux P. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. World Health Stat Q 1992; 45:266-75.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:239-43.
- Doolittle WF. Lateral genomics. Trends Cell Biol 1999;9:M5-M8.
- Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, De Doncker S, Jacquet D, *et al.* Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. Acta Trop 1995;59:293-307.
- Eck RV, Dayhoff MO. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs eds. MD 1966.
- Eckert KA, Kunkel TA. High fidelity DNA synthesis by the *Therrmus aquaticus* DNA polymerase. Nucleic Acids Res 1990;18:3739-44.
- Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. Proc Nat Acad Sci USA 1996; 12:13429-34.
- El-Safi SH, Abdel-Haleem A, Hammad A, El-Basha I, Omer A, Kareem HG, *et al.* Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. East Mediterr Health J 2003;9:844-55.
- Elnaiem DE, Mukhawi AM, Hassan MM, Osman ME, Osman OF, Abdeen MS, *et al.* Factors affecting variations in exposure to infections by *Leishmania donovani* in eastern Sudan. East Mediterr Health J 2003;4:827-36.
- Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitology 1994;109:423-33.
- Ertabaklar H, Oncu S, Ertug S. A new focus for cutaneous leishmaniasis in the west coast of Turkey. Trop Doctor 2005;35:189-92.
- Fairchild GB, Trapido H. The West Indian species of *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae). Ann Entomol Soc Am 1950,43:405-17.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985;39:783-91.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraive WM, Campbell D.A. Miniexon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol 1994;66:261-271.

- Fernández-Cotarelo MJ, Martínez JA, Guerra JM, Martínez P, Gómez RM, Salto E. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus–infected patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37:973-7.
- Ferroglio E, Romano A, Trisciuglio T, Poggi M, Ghiggi E, Sacchia P, *et al.* Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:636-41.
- Fitch WM. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *System Zool* 1971;20:406–16.
- Flegontov PN, Strelkova MV, Kolesnikov AA: The *Leishmania major* maxicircle divergent region is variable in different isolates and cell types. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 146:173-79.
- Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology* 2006;134:1-9.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:359-77.
- Fouche V, Montestruc E. Un cas de leishmaniose americaine cutanée. *Arch Inst Pasteur Martinique* 1951 ;4:12-3.
- Fuentes O. Flebótomos. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, eds. *Microbiología y Parasitología Médica Vol 3*. ECIMED, Ciudad Habana, 2001.
- Gadisa E, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, Aseffa A, *et al.* *Leishmania* (Kinetoplastida): species typing with isoenzyme and PCR-RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. *Exp Parasitol* 2007;115:339-43.
- Gadisa E, Kuru T, Genet A, Engers H, Aseffa A, Gedamu L. *Leishmania donovani* complex (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Comparison of deoxyribonucleic acid based techniques for typing isolates from Ethiopia. *Exp Parasitol* 2010;126:203-8.
- García L, Kindt A, Bermúdez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arévalo J, *et al.* Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004;42:2294-7.

- García A, Parrado R, De Doncker S, Bermúdez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:368-71.
- Gatti S, Gramegna M, Klersy C, Madama S, Bruno A, Maserati R, *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. *Ann Trop Med Parasitol* 2004;98:667-76.
- González R, García I. Estudio y distribución de la familia *Phlebotominae*. Dos especies y una nueva subespecie para Cuba. Ed Científico Técnica, La Habana, 1981.
- Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:230-50.
- Grimaldi GJ, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:270-87.
- Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:117-26.
- Guerin JP, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P, *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, a proposed research and development agenda. *Lancet* 2002;2:494-501.
- Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80:583-6.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;295:1852-8.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354:1191-9.
- Hide M, Bañuls AL. Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. *Acta Trop* 2006;100:241-45.
- Hide M, Bras-Goncalves R, Bañuls AL. Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. *Parasitology* 2007;134:379-389.

- <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> Acceso: Marzo, 2007.
- <http://www.basis.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> Acceso: Marzo, 2007.
- [http:// www.vectorbase.org/Image/organism_papatasi](http://www.vectorbase.org/Image/organism_papatasi). Acceso: Marzo, 2007.
- <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/product-lines/standard-synthesis.html> Acceso: Junio, 2007.
- <http://www.megasoftware.net> Julio Acceso: Junio, 2007.
- <http://www.york.ac.uk/res/cii/imageGallery/KayeRes1> Acceso: Enero, 2008.
- <http://www.genedb.org> Acceso: Febrero, 2008.
- <http://www.tools.neb.com/NEBcutter2> Acceso: Marzo, 2008.
- <http://www.bioinformatics.org/~docreza/cgi-bin/restriction/DistinctiEnz.pl> Acceso: Marzo, 2008.
- <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/>. Acceso: Mayo, 2008.
- http://www.ufpe.br/biomol/leishmanioses_Apostila_on_line Acceso: Octubre, 2009.
- <http://wwwwww.icp.ucl.ac.be/.../parasites/images/WHO1> Acceso: Octubre, 2009.
- http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index5.html Acceso: Mayo, 2010.
- http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/ Acceso: Mayo, 2010.
- <http://www.dfarmacia.com/.../4v21n09-13038008tab05.gif> Acceso: Mayo, 2010.
- <http://www.iowh.org>. Acceso: Acceso: Junio, 2010.
- <http://www.dndi.org> Acceso: Junio, 2010.
- <http://www.leishrisk.net.kaladrug> Acceso: Junio, 2010.
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006;23:254–67.

- Huson DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 1998; 14:68–73.
- Ibrahim ME, Barker DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infect Genet Evol* 2001; 1:61-8.
- Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, *et al.* Imported visceral leishmaniasis: Diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol* 2002; 40:475-79.
- Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhães AL, Guerra-Junior RB, Melo MN, Gomes R, *et al.* Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med* 2002;96:S111-S21.
- Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM, Smith DF. A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Res* 1998;8:135-45.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science* 2005; 309:436-42.
- Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Chance ML, Kemp SJ, Watts PC *et al.* *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology* 2004;129:399-409.
- Jamjoom M, Sultan AH. Diagnostic of clinical samples spotted on FTA cards using PCR based methods. *J Egypt Soc Parasitol* 2009;39:227-46.
- Kager PA, Rees PH. Splenic aspiration. Review of the literature. *Trop Geogr Med* 1983; 35:111-24.
- Katakura K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections) *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22:126-30.
- Kato H, Abraham G, Cáceres E, Gómez A, Mimori T, Uezato H, *et al.* Short report: molecular mass screening to incriminate sand fly vectors of Andean-type cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:719-21.
- Kerr SF. Palaearctic origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:75-80.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med Vet Entomol* 1990;4:1-24.

- Killick-Kendrick R. The biology and control of *Phlebotomine* sand flies. Clin Dermatol 1999;17:279-89.
- Kimura M. Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. Nature 1977;267:275-6.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980;16:111-20.
- King RJ, Campbell-Lendrum DH, Davies CR. Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia. Emerg Infect Dis 2004;10:598-607.
- Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schonian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. Microbes Infect. 2005;7:1224-34.
- Lachaud L, Merchergui-Hammammi S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002;40:210-5.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters W, Killick-Kendrick, R. (eds.). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press, Londres, 1987.
- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology 2007;134:339-50.
- Launois P, Tacchini-Cottier F, Kieny MP. Cutaneous leishmaniasis: Progress towards a vaccine. Experts Rev Vaccines 2008;7:1277-87.
- Laurent T, Van der Auwera G, Hide M, Mertens P, Quispe-Tintaya W, Deborggraeve S, *et al.* Identification of Old world *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. Diag Microbiol Infect Dis 2009;63:173-81.
- Lee MGS, Atkinson BL, Giannini SH, Van der Ploeg LHT. Structure and expression of the *hsp70* gene family of *Leishmania major*. Nuc Acid Res 1988;16:9567-85.
- Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. J Infect Developing Countries 2009;3:115-22.

- Lewin S, Schonian G, El Tai N, Oskam L, Bastien P, Presber W. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int J Parasitol* 2002; 32:1267-76.
- Lima-Junior MSD, Andreotti R, Morães-Cavalheiros MED, Oshiro ET, Gutiérrez de Oliveira A, Cepa-Matos MF. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:303-8.
- Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaría-Castrellon G, Ramírez L, *et al.* Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2008; 46:223-31.
- Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, *et al.* Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:312-7.
- Lugo J, Aldecoa T, Miqueli E, García A. Infestación experimental de *Lutzomyia* (C) *orestes* (Diptera: Psychodidae) con 2 cepas del Complejo *Leishmania mexicana*. *Rev Cub Med Trop* 1988;40:88-94.
- Lugo J, Fuentes O, Castex M, Navarro A. Estudio de la actividad hematofágica y el tiempo de ingesta de *Lutzomyia* (C) *orestes* (Diptera, Psychodidae). Informe preliminar *Rev Cub Med Trop* 1983;35:257-62.
- Lukšs J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Debet JP, *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:9375-80.
- Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, *et al.* Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 2004;128:483-91.
- Mac Farlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Kelly JM. Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 1990;190:377-84.
- Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionísio L, Campino L. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *J Vector Borne Dis* 2009;46:268-72.

- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003a;41:3147-53.
- Marfurt J, Niederwieser I, Divine MN, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003;46:115-24.
- Markel EK, John DT, Voge M. Parasitología Médica. M. Ferrero ed. Madrid, España, 1990.
- Marques, MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:902-6.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80:859-76.
- Martins L, Alexandrino A, Guimarães G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. *Rev Saúde Pública* 2010;44:1-4.
- Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007; 37:565-76.
- Maurya R, Sing RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis on Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3038-41.
- Mayr E. Fundamental ideas in evolutionary biology. *Naturwissenschaften* 1969;56:392-7.
- McMahon-Pratt D, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* 1981;291:581-83.
- Mendes DG, Lauria-Pires L, Nitz N, Lozzi SP, Nascimento RJ, Monteiro PS, *et al.* Exposure to mixed infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. *Trop Med Int Health* 2007; 12:629-36.
- Meyerhoff A. US Food and Drug Administration approval of Ambisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2:279-92.

- Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña MH, Gómez EA, Saya H, Katakura K, *et al.* Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop* 2002;81:197-202.
- Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;1:29-45.
- Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:583-88.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends in Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:17-30.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class *Kinetoplastea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1861-75.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction 1986. *Biotechnology* 1992;24:17-27.
- Murillo-Solís J, Maldonado-Moll JF. Is leishmaniasis possible in Puerto Rico? *P R Health Sci* 1991;10:5-7.
- Murray HW. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004;2:279-92.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366:1561-77.
- Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect* 2007;3:317-24.
- Navin TR, Arana FE, de Mérida M. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:36-42.
- Neal RA, Allen S, McCoy N, Oliaro P, Croft SL. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:577-84.
- Negera E, Gadisa E, Yamuah L, Engers H, Hussein J, Kuru T, *et al.* Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Silti woreda, Ethiopia: risk factor assessment and causative agent identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:883-90.
- Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics Oxford University Press eds, Nueva York, EUA, 2000.

- Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis Am J Trop Med Hyg 2007;76:573-78.
- Noyes HA. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93:57-61.
- Oddone R, Schweynoch C, Schönián G, dos Santos de Sousa C, Cupolillo E, Espinosa D, *et al.* Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. J Clin Microbiol 2009;47:2818-25.
- Ok U, Balcioglu IC, Ozkan T, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey Acta Trop 2002; 84:43-48.
- Oliveira FS, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2005;15:219-27.
- Orlando TC, Rubio MA, Sturm NR, Campbell DA, Floeter-Winter LM. Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:695-701.
- Osman OF, Kager PA, Oskam L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis in clinical aspects. Trop Med Intern Health 2000; 8:553-62.
- Osman OF, Oskman L, Zijlstra EE, Kroon NCM, Schoone J, Khalil EAG, *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 1997;35:454-57.
- Oskam L, Pratlong F, Zijlstra EE, Kroon CC, Dedet IP, Kager PA, *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Leishmania* parasites isolated from an endemic focus in eastern Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92:120-2.
- Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in Colombia: clinical characteristics. Am J Trop Med Hyg 1998;59:49-52.
- Otero ACS, da Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, *et al.* Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. Am J Trop Med Hyg 2000;62:128-33.
- Ovale-Bracho C, Porras de Quintana L, Muvdi-Arenas S, Rios-Parra M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102:549-54.

- Ozensoy TS, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, *et al.* Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. Trop Med Intern Health 2009;14:1401-06.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet. 2007; 39:839-47.
- Pérez JE, Veland N, Espinosa D, Torres K, Ogusuku E, Llanos-Cuentas A. *et al.* Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102:655-58.
- Perfectti F, Picó FX, Gómez JM. La huella genética de la selección natural. Ecosistemas 2009; 18:10-16.
- Piarroux R, Fontes M, Perasso R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H, *et al.* Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. Mol Biochem Parasitol 1995;73:249-52.
- Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 1992;256:1812-5.
- Piscopo TV, Azzopardi CM. Leishmaniasis. Postgrad Med J 2007; 83:649-57.
- Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. J Biol Chem 1997;272:4493-99.
- Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuyper S, Hide M, Bañuls AL, De Doncker S, *et al.* Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. J Infect Dis 2005;192:685-92.
- Quispe-Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. J Infect Dis 2004;189:1035-43.
- Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil:an appraisal. Ann Trop Med Parasitol 2003;97:17-28.

- Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D *et al.* Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitological diagnosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3768-73.
- Ravindran R, Ali N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr Mol Med* 2004;4:697-709.
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal Clin Microbiol* 2007;45:21-5.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Inf Dis* 2007;7:581-96.
- Reithinger R, Mohsen M, Aadil K, Sidiqi M, Erasmus P, Coleman PG. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul, Afganistán. *Emerg Infect Dis* 2003;7:27-29.
- Rijal S, Chappuis F, Singh R, Böelaert M, Loutan L, Koirala S. Sodium stibogluconate cardiotoxicity and safety of generics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:597-8.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65:111-25.
- Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetich S, O'Keeffe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant k39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:76-80.
- Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994;32:2246-52.
- Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Nevas A, *et al.* Etiological agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:276-82.
- Romero GAS, Böelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e584. doi:10.1371.
- Romero GAS, Ferreira-Noronha E, Pirmez C, Silva-Pires FES, Fernandes O, Saad-Nehmec N, *et al.* Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Trop* 2009; 109:74-7.

- Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Bastien P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA) in loci. Mol Biochem Parasitol 1994;65:271-82.
- Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, *et al.* Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J Clin Microbiol 2006;44:459-467.
- Rougeron V, De Meusaa T, Hide M, Waleckxa E, Bermúdez H, Arévalo J, *et al.* Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. Proc Nat Acad Sci USA 2009; 106 doi_10.1073pnas.0904420106.
- Rüfenacht S, Sager H, Müller N, Schaerer N, Heier A, Welle MM *et al.* Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. Vet Record 2009;156:542-5.
- Rzhetsky A, Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. Mol Biol Evol 1992;9:945-67.
- Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol 1989;69:100-03.
- Safjanova VM. The problem of the taxonomy with *Leishmania*. Ser Protozool Soc Acad Sci Leningr 1982;7:5-109.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:6230-34.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987;4:406-25.
- Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A, Ramesh V. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. J Clin Pathol 2003;56:840-3.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Ed. 1989.
- Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, *et al.* Heterogeneity, geographic distributions and pathogenicity of serodemes of *Leishmania Viannia* in Colombia. Am J Trop Med Hyg 2002;66:738-44.

- Schnur LF, Walton BC, Bogaert-Diaz H. On the identity of the parasite causing diffuse cutaneous leishmaniasis in the Dominican Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:756-62.
- Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Böelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* 2008;24:135-42.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:349-58.
- Schulz A, Mellenthin K, Schönian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based Real-Time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:1529-35.
- Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol* 1996;25:862-71.
- Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of minexon region. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:209-14.
- Shani-Adir A, Kamil S, Rozenman D, Schwartz E, Ramon M, Zalman L, *et al.* *Leishmania tropica* in northern Israel: a clinical overview of an emerging focus. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:810-5.
- Silva ES, Gontijo CM, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol* 2005;21:550-2.
- Simpson AM, Suyama Y, Dewes H, Campbell DA, Simpson L. Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also contain small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:5427-45.
- Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5:251-65.

- Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 2008; 155:198-203.
- Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon, Serra R, Gallego M, Ramis A, Fondevila D, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet J* 2003;35:320-3.
- Soto M, Quijada L, Larreta R, Iborra S, Alonso C, Requena JM. *Leishmania infantum* possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. *Parasitology* 2003;127:95-105.
- Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Flemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:46-53.
- Steffen C, Ankenbaver W, Poaver-Hofmann R, Bye S, Eisen D, Frey B, *et al.* En: PCR Application Manual, Steffen C ed. Mannheim Roche Diagnostics, 1999.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 2004;189:1729-33.
- Sukmee T, Sriripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y. *et al.* A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int J Parasitol* 2008;38:617-22.
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2385-91.
- Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, *et al.* A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:139-43.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596-9.
- Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:657-67.
- Teklemariam S, Hiwot AG, Frommel D, Miko TL, Ganlov G, Bryceson A. Aminosidine and its combination with sodium stibogluconate in the treatment of diffuse cutaneous

- leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88:334-9.
- Terayama T, Kato H, Gómez EA, Uezato H, Calvopiña M, Iwata H, *et al.* Molecular typing of sand fly species (Diptera, *Psychodidae*, *Phlebotominae*) from areas endemic for leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. J Vet Med Sci 2008; 70:907-13.
- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Ann Parasitol Hum Comp 1993;68:107-8.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniack F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Res 1997;25:4876-82.
- Tikasingh ES. Observations on *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) (Diptera: *Psychodidae*), a vector of enzootic leishmaniasis in Trinidad, West Indies. J Med Entomol 1975;12:228-32.
- Tobler LH, Contestable P, Pitina L, Groth H, Shaffer S, Blackburn GR, *et al.* Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors. Transfusion 2007;47:90-6.
- Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Trop Med Intern Health 2006;11:1388-98.
- Torrico F, Parrado R, Castro R, Marquez CJ, Torrico MC, Solano M, *et al.* Case report: co-infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and HIV: Report of a case of mucosal leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia. Am J Trop Med Hyg 2009;81:555-8.
- Tsukayama P, Lucas C, Bacon DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. Int J Parasitol 2009;39:355-62.
- Victoir K, De Doncker S, Cabrera L, Álvarez E, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, *et al.* Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003;97:80-7.
- Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. Trends Parasitol 2002;18:81-5.

- Villinski JT, Klena JD, Abbassy M, Hoel DF, Puplampu N, Mehta S, *et al.* Evidence for a new species of *Leishmania* associated with focal disease outbreak in Ghana. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:323-7.
- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004;90:31-7.
- Weigle KA, Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NO, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hvg* 1987;36:489-96.
- Weina PJ, Neafie RC, Wortmann G, Polhemus M, Aronson NE. Old world leishmaniasis: an emerging infections among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1674-80.
- Wiley EO. *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics*. E.O Wiley, John Wiley & Sons, INC. A Wiley Intersciencia publication (eds). EUA, 1978.
- World Health Organization, 1990. Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 793. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. The leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections. WHO fact sheet 116. World Health Organization, 2000, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, 2004. The World Health Report 2004. Changing history. Geneva, WHO, 2004.
- Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, *et al.* Rapid identification of *Leishmania* complexes by a Real-Time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:999-1004.
- Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C, Shaw SE, Aktas M, Yabsley MJ, *et al.* Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. *Vet Parasitol* 2007;145:217-27.
- Yamasaki M, Tajima M, Lee KW, Jeong JR, Yamato O, Maede Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Vet Parasitol* 2002; 11:123-9.
- Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fisher SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:415-20.

- Zeledón R, Bogaert-Díaz H, Mc Pherson AB, Johnson RN, Murillo J. Epidemiological observations on cutaneous leishmaniasis in the Dominican Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985;79:881-2.
- Zemanova E, Jirku M, Mauricio IL, Hora A, Miles MA, Lukes J. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int. J. Parasitol* 2007;37:149-60.
- Zijlstra EE, el-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:S27-58.
- Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:449-70.
- Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JEW, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, *et al.* Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J Parasitol* 2003;89:372-8.

VIII. BIBLIOGRAFIA DEL AUTOR

8.1 Artículos donde se publican los resultados de la Tesis

Montalvo AM, Fraga J, Romero JA, Monzote L, Montano I, Dujardin JC.
PCR-RFLP/HsP70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical.
Rev Cub Med Trop 2006; 58:226-34.

Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M, De Doncker S,
Vélez ID, Dujardin JC. PCR-RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania*
neotropical. *Biomédica* 2008; 28:597-606.

Fraga J, **Montalvo AM**, De De Doncker, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of
Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Inf Gen Evol* 2010;
10:238-45.

Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, Van der
Auwera G. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for
Leishmania species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 2010;
137:1159-68.

Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Marín M, Van der Auwera G, Dujardin JC,
Vélez ID, Muskus C. Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and
Leishmania (*V.*) *guyanensis* using *BccI* for *hsp70* PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop
Med Hyg* 2010; 104:364-67.

8.2 Artículos del autor relacionados con el tema

Montalvo AM, E. Alberti, L. Fonte, A Díaz, A Acosta. Amplification, sequencing and
precloning of a molecule from *Leishmania braziliensis* that stimulates Th1
responses. *Avances en Biotecnología Moderna*.1999.V8.

Montalvo AM, S Sifontes, I Montano, AM Espino. Necesidad del uso de cromógenos para
cuantificar promastigotes de *Leishmania* sp. *Rev Cub Med Trop* 2000, 52:2.

Montalvo AM. *Leishmania*. En: Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III.
Editorial de Ciencias Médicas. Ciudad de la Habana. 2001.

Montalvo AM, E Alberti, MM González, R García, A Acosta, L Fonte. Construcción y
expresión de una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis*. *Rev Cub Med
Trop*. 2001; 53:154-60.

- Monzote L; **Montalvo AM**; I Montano; L Scull; M Miranda; J Abreu. Estudio del efecto de aceites esenciales de plantas cubanas sobre promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*. *Rev Cub Farm* 2001; 35:103-5.
- Montalvo AM**, E. Alberti, L. Monzote, MM González, R. García, I. Montano, L. Fonte. Significant and transitory control of lesion's development in mice immunized with a genomic library of *Leishmania amazonensis*. *Rev Patología Tropical* 2002. 31: 244-47.
- Montalvo AM**, Monzote L, Fonte L, Fonseca L. A. Díaz. Aproximaciones cubanas al estudio de la Leishmaniasis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol 44 (4), 2002.
- Montalvo AM**, Monzote L, Fonseca L, Montano I, Fonte L., Soto M, Requena JM. Inmunización con subgenoteca de *Leishmania amazonensis* protege contra el reto a ratones Balb/c. *Rev Cub Med Trop* 2004; 56:103-10.
- Monzote L, **Montalvo AM**, Scull R, Miranda M, Abreu P. Actividad antileishmanial del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides*. *Rev Cub Farmacia* 2004; 38:644-8.
- Monzote L; **Montalvo AM**; Fonseca L; Pérez R; Suárez M; Rodríguez H. Effect of thiadiazine derivatives on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:329-30.
- Monzote L, Sariego I, **Montalvo AM**, Garrido N, Scull R, Abreu J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Rev Cub Med Trop* 2004; 56:230-33.
- Monzote L, **Montalvo AM**, Fonseca L, Pérez R, Suárez M, Rodríguez H. In vitro activities of thiadiazine derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Drug Research* 2005; 55:232-38.
- Monzote L, **Montalvo AM**, Scull R, Miranda M, Abreu J. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49(3):257-9.
- Montalvo AM**, C Folgueira, J Carrión, L Monzote, C Cañavate, JM Requena. The *Leishmania* HSP20 is antigenic during natural infections but as DNA vaccine does not protect BALB/c mice against experimental *L. amazonensis* infection. *J Biomed Biotech* 2008: ID 695432.
- Montalvo AM**, Folgueira C; Requena JM. Clonaje de la proteína de choque térmico de 20 kDa de *Leishmania amazonensis*. *Rev Cub Med Trop* 2009, 61-2.

- Monzote L, Ordeñana R, Fraga J. **Montalvo AM**, Montano I. Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico. *Rev Cub Med Trop* 2009, 61-2.
- Monzote L. García M, **Montalvo AM**, Linares R, Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. *Forsch Komplementmed* 2009, 16:334-8.
- Monzote L, García M, **Montalvo AM**, Scull R, Miranda M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105:168-173.
- Montalvo AM**. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba. *Rev Cub Hig Epidem* 2010; 48.
- Van der Auwera G, Fraga J, **Montalvo AM**, Dujardin JC. *Leishmania* taxonomy up for promotion? *Trends Parasitol* 2011; 27:49-50.

8.3 Eventos científicos donde se han expuesto los resultados del presente trabajo

- | | |
|------|---|
| 2006 | XI Congreso Internacional de Parasitología, (XICOPA) Glasgow, Reino Unido. |
| 2007 | VIII Simposio PECET, Universidad de Antioquia, Colombia.
Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología FLAP, Islas Margarita, Venezuela.
VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, La Habana, Cuba. |
| 2008 | Convención CPHEM 2008, La Habana, Cuba. |
| 2009 | IV World Congress on Leishmaniasis. Lucknow, India.
Congreso 70 Aniversario del IPK, La Habana, Cuba.
Coloquio de Enfermedades Tropicales Desatendidas de América Latina. |

8.4 Tesis tutoradas en distintas etapas del trabajo:

- Tesis de Diploma de Lic. en Bioquímica. "Optimización de la PCR-RFLP/*hsp70* para la identificación y tipificación de *Leishmania* en el Nuevo Mundo". IPK, 2004
- Tesis para optar por la Maestría en Parasitología "Aplicación de la PCR-RFLP/*cpb* para diferenciar especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo". IPK, 2009.

8.5 Reconocimientos de los resultados:

Resultado Relevante Institucional del año 2009: “Aplicación de métodos moleculares para la tipificación universal de especies de *Leishmania* de importancia médica”.

Mención en XVI Fórum Provincial de Ciencia y Técnica: Aplicación de métodos moleculares para la tipificación universal de especies de *Leishmania* de importancia médica

Propuesta a Reconocimiento Anual de la Academia de Ciencias de Cuba 2010: “Genes que codifican proteínas de choque térmico en *Leishmania*. Aportes para su aplicación a la detección y tipificación del parásito”.