

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
LEISHMANIA INFANTUM EN PARAGUAY MEDIANTE LA
TÉCNICA DEL kDNA-PCR-RFLP**

ANDREA STEFANIA GOMEZ DE LA FUENTE FRETES

**Tesis presentada al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica y Dirección
General de Postgrado de la Universidad Nacional de Asunción, como
requisito para la obtención del Grado de Magister en Ciencias
Biomédicas**

ASUNCION- PARAGUAY

2013

Universidad Nacional de Asunción
Dirección General de Postgrado
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

**“Análisis de la diversidad genética de *Leishmania infantum* en Paraguay
mediante la técnica del kDNA-PCR-RFLP”**

Trabajo de Tesis para optar el título de Magister en Ciencias Biomédicas

Autor: Andrea Stefania Gómez de la Fuente Fretes

Director: Eva Megumi Nara Pereira, DVM, PhD

**ASUNCION-PARAGUAY
2013**

Catalogado por: Biblioteca del IICS

Gómez de la Fuente Fretes, Andrea Stefanía

Análisis de la diversidad genética de *Leishmania infantum* en Paraguay mediante la técnica del kDNA-PCR-RFLP / Andrea Stefanía Gómez de la Fuente Fretes; dir de tesis Eva Nara Pereira -- Asunción: UNA. Dirección General de Postgrado. Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. IICS, 2013.
90 p. : il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) -- IICS, 2013

1. *Leishmania infantum*. 2. Leishmaniasis visceral. 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa. 4. Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción. 5. Kinetoplasto.
I. Título

CDD (ed. 18^a) 616.9364

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
LEISHMANIA INFANTUM EN PARAGUAY MEDIANTE LA
TÉCNICA DEL kDNA-PCR-RFLP**

ANDREA STEFANIA GOMEZ DE LA FUENTE FRETES

Aprobado en fecha 28 de febrero de 2013.

Tribunal Examinador:

Prof. Dra. (M.Sc., Ph. D.) Elisa Cupolillo
Prof. Dr. (M.Sc.) Rolando Oddone
Prof. Dr. (M.Sc.) Jorge Miret

FIOCRUZ - Br
IICS/UNA - PY
IICS/UNA - PY

EVA MEGUMI NARA PEREIRA, D.V.M, Ph. D.
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por ser mi creador, darme salud, y porque todo lo que tengo es un regalo que él me ha dado.

A mi directora de tesis la Dra. Eva Nara, por sus orientaciones, consejos, apoyo y confianza, así como su disposición en todo momento para resolver cualquier duda surgida durante la elaboración del trabajo de tesis.

A la jefa del Departamento de Biología Molecular IICS-UNA, Dra. Graciela Russomando, por haber permitido que desarrolle este trabajo de tesis en el laboratorio a su cargo y por su apoyo durante el proceso de esta tesis.

A los compañeros del laboratorio de Biología Molecular, por la ayuda desinteresada y amistad brindada en todo momento, y en especial a la Dra Lilían Chena y MSc Emilio Espínola por su participación para la elaboración del trabajo de tesis.

Al coordinador del proyecto *LeishEpinetSA*, Dr. Rolando Oddone, por permitir la utilización de las muestras y el desarrollo del trabajo de tesis.

A la jefa del Departamento de producción Bioquímica-IICS la Dra Yvalena Guillen, por su colaboración para la realización de la tesis.

A los profesores de la maestría por sus orientaciones y experiencia que me permitieron crecer más como profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero, que me permitió cursar la maestría.

A mis compañeras de tesis por su compañerismo y amistad, y por todos los momentos compartidos.

A mis padres Antonia y Carlos que se mantuvieron pendientes a lo largo de este proceso, brindándome su amor, apoyo, confianza y ayuda incondicional sobre todo en los momentos más difíciles.

A mis suegros, Enriqueta y Juan que se han convertido en unos padres para mí y me brindaron su apoyo, cariño y confianza durante todo este tiempo.

A mi marido Juan Torales por sus consejos, comprensión, paciencia y constante apoyo que fueron fundamentales para llegar a la conclusión de este trabajo.

A mi pequeño Iván por hacerme muy feliz y ser una inspiración para culminar este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.

Muchas Gracias!

INDICE

TITULO.....	1
RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	4
1. INTRODUCCION.....	6
1.1 Leishmaniosis: consideraciones generales.....	7
1.2 Leishmaniosis visceral human (LVH).....	8
1.3 Leishmaniosis visceral canina (LVC).....	9
1.4 Taxonomía de <i>Leishmania</i>	10
1.5 Ciclo Biológico.....	12
1.6 El genoma de <i>Leishmania</i>	14
1.6.1 Cromosomas.....	14
1.6.2 ADN circular extracromosómico: ADN del Kinetoplasto.....	14
1.6.2.1 Maxicírculos.....	15
1.6.2.2 Minicírculos.....	15
1.7 Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad.....	16
1.8 Leishmaniosis y SIDA.....	17
1.9 Leishmaniosis en Paraguay.....	19
1.9.1 Historia de la Leishmaniosis en Paraguay.....	19
1.9.2 Epidemiología Actual de la Leishmaniosis en Paraguay.....	19
1.10 Técnicas de caracterización.....	22
1.10.1 Electroforesis de Isoenzimas por sus siglas en inglés: MLEE: (Multilocus Enzyme Electroforesis).....	22

1.10.2 Hibridación con sondas de ADN.....	23
1.10.3 Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, por sus siglas en inglés RFLP (Restriction Fragment length polymorphism).....	24
1.10.4 Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés PCR (Polimerasa chain Reaction).....	25
1.10.5 Amplificación Aleatoria de AND polimórfico, por sus siglas en inglés RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA).....	25
1.10.6. Microsatélites.....	26
1.10.7 PCR-RFLP.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1 Diseño del Estudios.....	32
3.2 Consideraciones Éticas.....	32
3.3 Población de Estudio.....	33
3.3.1 Cepas de referencia utilizadas.....	33
3.3.2 Muestras de pacientes humanos y caninos.....	33
3.3.2.1 Muestras biológicas.....	33
3.3.2.2 Aislados en cultivo.....	34
3.4 Control de calidad.....	34
3.5 Búsqueda de secuencias de <i>Leishmania</i> del complejo <i>Leishmania donovani</i> en el <i>GenBank</i>	36
3.6 Preparación del ADN genómico total de las muestras.....	36
3.7 Cuantificación de ADN de muestras biológicas.....	37

3.8. Reacciones de PCR para la amplificación del ADNk de <i>Leishmania</i>	37
3.8.1 Detección del género <i>Leishmania</i>	37
3.8.2 PCR del minicírculo para genotipificación.....	38
3.8.2.1 PCR directa para amplificar minicírculos de ADNk.....	38
3.8.2.2 PCR semianidada para amplificar minicírculos de ADNk en muestras biológicas.....	39
3.9 Análisis de los productos de amplificación.....	39
3.10 Prueba de sensibilidad y especificidad de las reacciones de PCR.....	40
3.11 Predicción de los patrones de restricción del producto amplificado.....	41
3.12 Digestión de los productos de PCR.....	41
3.13 Análisis de los fragmentos de restricción.....	42
3.14 Construcción del dendograma.....	42
3.15 Cálculo de las frecuencias de los genotipos encontrados.....	42
4.RESULTADOS.....	44
4.1 Determinación del género <i>Leishmania</i>	45
4.2 Sensibilidad de las reacciones de PCR.....	45
4.2.1 Sensibilidad de la PCR directa.....	45
4.2.2 Sensibilidad de la PCR semianidada.....	46
4.3 Especificidad de las reacciones de PCR.....	47
4.3.1 Especificidad de la PCR directa.....	47
4.3.2 Especificidad de la PCR semianidada.....	48
4.4 Reacciones de PCR.....	49
4.4.1 PCR directa.....	49

4.4.2 PCR semianidada.....	50
4.5 Cortes con la endonucleasa <i>RsaI</i>	51
4.6 Análisis de los geles con el programa UN-SCAN-IT.....	51
4.7 Elaboración del dendograma.....	52
4.8 Frecuencias de los diferentes genotipos encontrados.....	59
5. DISCUCION.....	60
6. CONCLUSIONES.....	73
7. BIBLIOGRAFIA.....	75
8. ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cladograma que muestra la relación filogenética de 15 complejos del género <i>Leishmania</i>	11
Figura 2. Taxonomía de <i>Leishmania</i>	12
Figura 3. ADN del kinetoplasto de <i>Leishmania</i>	16
Figura 4. Esquema del ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	17
Figura 5. Esquema de transmisión mixto de <i>Leishmania</i>	18
Figura 6. Tendencia de aumento de casos en el departamento Central hasta el 2010, marcándose un descenso para el año 2011.....	19
Figura 7. Esquema de la aplicación del método ADNk-PCR-RFLP <i>Leishmania spp</i>	28
Figura 8. Esquema de la PCR para la detección del género <i>Leishmania</i>	37
Figura 9. Esquema de la PCR directa para amplificar minicírculos del ADNk.....	38
Figura 10. Esquema de la PCR semianidada para amplificar minicírculos del ADNk.....	40
Figura 11. PCR para la amplificación de la región conservada de los minicírculos del ADNk de <i>Leishmania</i> con los cebadores 13A y 13B en muestras biológicas.....	45
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la sensibilidad de la PCR directa.....	46
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la sensibilidad de la PCR semianidada.....	47

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la especificidad de la PCR directa.....	48
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la especificidad de la PCR semianidada.....	49
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR directa para la amplificación del minicírculos del ADNk de <i>Leishmania</i> con los cebadores AJS31 y DBY en muestras biológicas.....	50
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra la PCR semianidada para la amplificación de los minicírculos del ADNk de <i>Leishmania</i> con los cebadores LINR4, LIN17 y LIN19 en muestras biológicas.....	51
Figura 18. Análisis de un gel de agarosa al 3% con el programa UN-SCAN-IT que permite determinar el tamaño de las bandas obtenidas luego de la digestión del producto de PCR con <i>RsaI</i>	52
Figura 19. Dendograma <i>UPGMA</i> construido con los datos la técnica PCR-RFLP del ADNk, que muestra la distribución en <i>clusters</i> de las 53 muestras de <i>Leishmania infantum</i> estudiadas.....	53
Figura 20. Dendograma <i>UPGMA</i> construido con los datos la técnica PCR-RFLP del minicírculo ADNk.....	54
Figura 21. Fragmentos de restricción del ADNk digeridos con <i>RsaI</i> y separados con gel de agarosa al 3%.....	56
Figura 22. Fragmentos de restricción del ADNk digeridos con <i>RsaI</i> y separados con gel de agarosa al 3%.....	57

Figura 23. Fragmentos de restricción del ADNk digeridos con *RsaI* y separados con gel de agarosa al 3%.....58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas.....	33
Tabla 2. Datos de las muestras analizadas.....	34
Tablas 3. Predicción de los patrones de restricción con la enzima <i>RsaI</i>	41
Tabla 4. Sitio de corte <i>RsaI</i>	31
Tabla 5. Genotipos observados luego de la digestión con <i>RsaI</i>	55
Tabla 6. Frecuencia absoluta (F) y relativa (f%) de los perfiles genotípicos encontrados en la población de parásitos analizados.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN/DNA Ácido desoxirribonucleico/Deoxyribonucleic acid

ADNg ADN genómico

ADNk/ kDNA ADN del kinetoplasto/Kinetoplast DNA

ADVP Adictos a drogas por vía parenteral

ARN Ácido ribonucleico

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CAN – Centro Anti-rábico Nacional

DMSO Dimetilsulfóxido

dNTP Deoxinucleótidos

D. O. Densidad óptica

EDTA Ácido etilendiaminotetracetato sódico

GenBank Genetic code databank

gp63 glycoprotein 63

hsp70 70 kDa heat shock protein

ITS Internal Transcribed Spacers

LC Leishmaniosis cutánea

LMC Leishmaniosis mucocutánea

LVH Leishmaniosis visceral humana

LVC Leishmaniasis visceral canina

min minutos

MLEE Multilocus Enzyme Electrophoresis

MO Médula ósea

NNN Medio difásico de Novy-McNeal-Nicolle

OMS/WHO Organización Mundial de la Salud/World Health Organization

pb Pares de bases

PBS Solución salina tamponada con fosfato

PCR Reacción en cadena de la polimerasa/Polimerasa chain reaction

RAPD Random Amplified Polimorphic DNA

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism/Polimorfismo en la Longitud de los fragmentos de restricción.

RPMI Roswell Park Memorial Institute

SMLE spliced leader miniexón

TAE Tampón Tris-Acetato-EDTA

Taq Polimerasa de *Thermus aquaticus*

Tris Tri-(hidroximetil)-aminoetano

UPGMA Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages

URL Uniform Resource Locator

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

“Análisis de la diversidad genética de *Leishmania infantum* en Paraguay mediante la técnica del kADN-PCR-RFLP”

“Analysis of *Leishmania infantum* genetic diversity in Paraguay by kDNA-PCR-RFLP”

RESUMEN

Leishmania infantum es el agente causal de la leishmaniasis visceral canina y humana en Paraguay. Una alta proporción de canes infectados y un aumento en el número de casos humanos, hacen necesario un control más eficaz de la enfermedad así como también una evaluación más profunda de la epidemiología de la misma. En la actualidad lo que se busca es la aplicación de técnicas moleculares sensibles que detecten el ADN del parásito y que permitan caracterizarlo directamente en muestras biológicas.

En el presente trabajo se estudió la diversidad genética de la especie *Leishmania infantum*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, empleando como blanco molecular los minicírculos del ADNk seguido por cortes con la enzima de restricción *RsaI*, con el fin de evaluar la asociación genotípica de los parásitos encontrados en muestras humanas y caninas.

El análisis de las 53 muestras, que incluye tanto a muestras biológicas de humanos y caninos además de parásitos aislados en cultivo, mostraron un alto grado de polimorfismo genético con un total de 19 perfiles diferentes separados en 5 *clusters*. No se observó tendencia de agrupamiento de acuerdo al tipo de muestra, más bien una tendencia de agrupamiento debido a la región geográfica, pero sí se observaron perfiles compartidos por parásitos de muestras de humanos y perros, lo que confirma el patrón epidemiológico ya conocido. Se observó además, una selección clonal de los parásitos en cultivo al no presentar los mismos perfiles las formas amastigote, presente en la muestra biológica y su correspondiente aislado en cultivo, la forma promastigote.

El estudio de la variación genética en *Leishmania* no sólo podría tener implicancias importantes para el control de la enfermedad, sino que también ayudaría a dilucidar la evolución biológica del agente causal de leishmaniosis visceral.

Palabras clave: *Leishmania infantum*, leishmaniosis visceral canina, leishmaniosis visceral humana, kinetoplasto, minicírculo, ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto, reacción en cadena de la polimerasa, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, *RsaI*, patrones de restricción, dendograma, perfil genético.

SUMMARY

Leishmania infantum is the causal agent of canine and human visceral leishmaniosis in Paraguay. A high proportion of infected dogs and an increasing number of human cases, lead to the necessity of a more efficient control of the disease as well as further evaluation of the epidemiology itself. Nowadays it is aimed to achieve more sensitive molecular techniques that detects the parasite DNA and allows the characterization directly from biological samples.

The present work studied the genetic diversity of *Leishmania infantum* by the polymerase chain reaction, using as a molecular target the kDNA minicircles, followed by enzyme restriction digestion with *RsaI* in order to evaluate the genotyping association among the parasites found in samples from human being and dogs.

The analysis of 53 samples, that included biological samples from both human and canine and parasites isolated in culture, showed a high genetic polymorphism with a total of 19 different genotypes separated into 5 clusters. Grouping tendency between the three types of samples was not observed, rather a grouping tendency due to the geographic region, however it was found parasites profiles shared by human and dog samples confirming the epidemiological pattern already known. It was also observed a clonal selection of the isolate in culture due to the profile was different in the amastigote form presented in the biological sample and its corresponding isolate in culture, promastigote form.

The study of genetic variations in *Leishmania* could have important implication on the leishmaniosis control programs as well as helping in the understanding of the biological evolution of the causal agent of visceral leishmaniosis.

Keywords: *Leishmania infantum*, canine visceral leishmaniasis, human visceral leishmaniasis, kinetoplast, minicircle, the kinetoplast deoxyribonucleic acid, polymerase chain reaction , restriction fragment length polymorphism, *RsaI* restriction patterns, dendrogram, genetic profile.

1. INTRODUCCION

1.1 Leishmaniosis: consideraciones generales

Se define como una histoparasitosis producida por protozoos parásitos del género *Leishmania*, de localización intracelular (macrófagos), caracterizada por diversas manifestaciones clínicas y transmitidas por la picadura de insectos dípteros de la familia Phlebotomidae, géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (1). Afectan a mamíferos entre los que se incluye el hombre. Los cuadros clínicos, pueden variar desde lesiones cutáneas ulcerosas que cicatrizan, la leishmaniosis cutánea (LC); las no ulcerosas o difusas que no curan fácilmente, la leishmaniosis cutáneo difusa (LCD), la forma mucosa, la leishmaniosis mucocutánea (LMC) y una forma sistémica fatal, la leishmaniosis visceral (LV) o también denominada kalazar, estas diversas manifestaciones clínicas dependen tanto del estado inmunológico del hospedador como de la especie causante de la infección, con al menos 20 especies patógenas para el humano (2–4).

Esta enfermedad es un importante problema de salud pública debido al aumento en el número de casos y, para contraerlo no sólo existen los factores de riesgo ambientales, como las migraciones masivas, la urbanización, la deforestación; sino también se encuentran los factores individuales como el VIH, la desnutrición, la genética, etc. (2). La leishmaniosis afecta un total de 98 países en todo el mundo, con una incidencia mundial estimada de 0,2 a 0,4 millones de casos para LV y de 0,7 a 1,2 millones de casos para la LC (5).

A pesar de los considerables progresos en la biología celular y molecular de este parásito, su complejo ciclo de vida, el hecho de estar presente en diversos nichos ecológicos y su capacidad para infectar a una amplia variedad de huéspedes vertebrados hacen que aun se esté lejos de entender por completo la compleja biología de este microorganismo (6).

1.2 Leishmaniosis visceral humana (LVH)

Es producida principalmente por especies de *Leishmania* pertenecientes al complejo *Leishmania donovani* *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. Estas especies se distribuyen de acuerdo a una región geográfica en particular así en el viejo mundo, África y Asia, encontramos a *L. donovani*, y en la Cuenca del Mediterráneo a *L. infantum* y en el Nuevo mundo, América a *L. chagasi*. (7). Métodos enzimáticos y genéticos indican que *L. infantum* y *L. chagasi* son indistinguibles entre si y se ha propuesto utilizarlos como sinónimos. El grado de diversidad de la especies *L. chagasi* y *L. infantum* es menor que el encontrado dentro de las cepas de *L. donovani*, incluso de las cepas de *L. donovani* pertenecientes a una misma área geográfica. Se ha encontrado evidencia inequívoca para un reconocimiento formal de que *L. infantum* y *L. chagasi* son dos nombres para la misma especie. El nombre de *L. infantum* tiene prioridad porque fue descrito en 1908 por Nicolle. (8–11).

El periodo de incubación de la enfermedad suele ser de aproximadamente dos meses, aunque puede llegar a los dos años, y la sintomatología es secundaria a la invasión de los órganos diana: bazo, hígado, médula ósea, mucosa intestinal, etc. Además de fiebre, leucopenia y hepato-esplenomegalia, pueden aparecer diarrea, tos y pérdida de peso. Si no se trata, la mortalidad llega a alcanzar más del 90% (1,3).

El tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniosis se lleva a cabo con los mismos fármacos, tales como los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y la pentamidina, aunque la posología y la vía de administración difiere según el caso (3).

Aunque hay diferentes tratamientos para la leishmaniosis se presentan ciertas dificultades debido a que hay drogas que han perdido su eficacia a causa de que el parásito desarrolla

resistencia. Además, el tratamiento de quimioterapia puede ser eficaz contra la leishmaniosis, pero es tóxico cuando se usa en tratamientos a largo plazo. La mayor proporción de la población infectada o en riesgo, es pobre, y hay una falta de interés de las industrias farmacéuticas para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la leishmaniosis. Las dificultades relacionadas al tratamiento de la leishmaniosis hacen que la prevención de la infección sea de suma importancia (12).

1.3 Leishmaniosis visceral canina (LVC)

La leishmaniasis visceral canina (LVC) está ampliamente distribuida en América del Sur y es una de las enfermedades caninas transmitidas por vectores más importantes de la región, principalmente debido a su importancia zoonótica (13).

Varias especies de *Leishmania* han sido aisladas y caracterizadas molecularmente de los perros en América del Sur. En las que se incluyen *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombiense*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. pifanoi* (13,14).

L. infantum es el agente causal más importante de la LVC en América del Sur. Los perros son considerados los principales reservorios de *L. infantum*, y se los considera responsables de la urbanización de la enfermedad (13,15–18).

El principal modo de transmisión de los parásitos de perro a perro es a través de la picadura de un flebótomo infectado. En América del Sur, los vectores de *Leishmania* pertenecen al género *Lutzomyia*. Más de 70 especies de *Lutzomyia* han sido sospechosos de estar implicados en la transmisión de *Leishmania* que infectan los perros en el sur de América. Sin embargo, el único vector bien establecido en América del Sur es *Lutzomyia longipalpis* (13).

Hay muchos factores que pueden favorecer la propagación de la leishmaniosis canina en América del Sur, incluyendo el movimiento de los perros entre regiones endémicas y no endémicas y los cambios en la ecología del vector. *Lu. longipalpis*, que está muy extendida en América del Sur, está adaptado para colonizar ambientes modificados por el hombre (13).

Las manifestaciones sintomáticas en los perros son varias, la más característica es el sobre crecimiento de las uñas (onicogrifosis), siendo las demás, la caída de pelo, la presencia de úlceras cutáneas, adelgazamiento, fiebre y conjuntivitis. En estadios avanzados de la enfermedad es típica la parálisis de las patas traseras, llevando a la muerte al animal. Aunque a sus inicios la enfermedad no presenta síntomas clínicos, se pueden encontrar abundantes parásitos en las vísceras, sangre, lo que los convierte en buenos reservorios (16).

La característica más importante de la LVC es su extraordinario polimorfismo clínico. El impacto de la parasitosis canina se visualiza en las implicaciones en la salud pública humana, dado su carácter zoonótico; en la afectación de la sanidad animal, teniendo en cuenta la incidencia de la enfermedad, la dificultad en el diagnóstico y la costo-efectividad del tratamiento (17).

MON-1 *L. infantum* es el zymodema predominante en todas las regiones endémicas, tanto en los seres humanos y perros. Con el fin de responder a importantes preguntas epidemiológicas es esencial determinar si existen variantes genéticas de MON-1 (19).

1.4 Taxonomía de *Leishmania*

Los protozoos del género *Leishmania* pertenecen al orden Kinetoplastida; familia Trypanosomatidae, cuyos linajes principales de acuerdo a comparaciones del ADNk de los

maxicírculos se considera que divergieron en un periodo muy temprano. Safjanova en 1986 sugirió que *Leishmania* probablemente se ramificó de un ancestro común tripanosomátido durante el periodo Mesozoico, antes de la separación de los continentes, cuando los flebótomos surgieron como grupo (20).

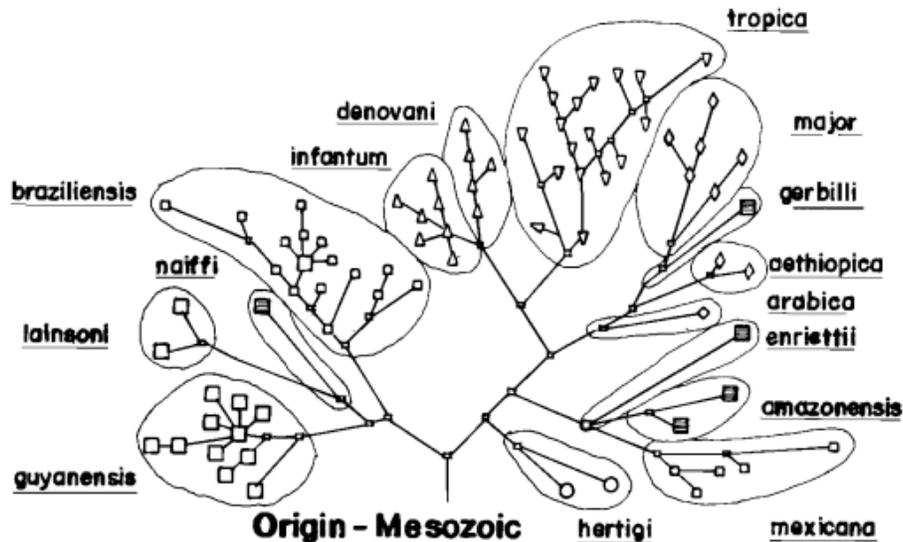


Figura 1. Cladograma que muestra la relación filogenética de 15 complejos del género *Leishmania*. Basado en el análisis de 80 zimodemas utilizando 13 enzimas, demuestra el origen monofilético del género *Leishmania* (Fuente: Shaw et al. 1994)(20)

En el 2000 Cupolillo y colaboradores sugirieron la separación del generó *Leishmania* en dos linajes filogenéticos mayores al que llamaron secciones: Euleishmania y Paraleishmania, basados en varias técnicas moleculares,. Euleishmania comprende a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* como ya fue descrita por Lainson y Shaw en 1987, y Paraleishmania que consiste en *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. colombiensis*, *L. equatoriensis*, *L. herreri* (21).

Las diferencias en el desarrollo en el interior del vector son utilizadas para definir los subgéneros. *Leishmania (Leishmania)*, que lleva a cabo su desarrollo en las parte superior y media del aparato digestivo (desarrollo suprapilórico), mientras que *Leishmania (Viannia)*

necesita un desarrollo adicional en la parte final del aparato digestivo (desarrollo peripilórico), ambos subgéneros se dividen a su vez en varios complejos (1,3,22–24). Dentro del subgénero *Leishmania* se encuentra el complejo *L. donovani* que incluye las especies, *L. donovani*, *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) a las cuales se le asocia la forma visceral de la enfermedad.

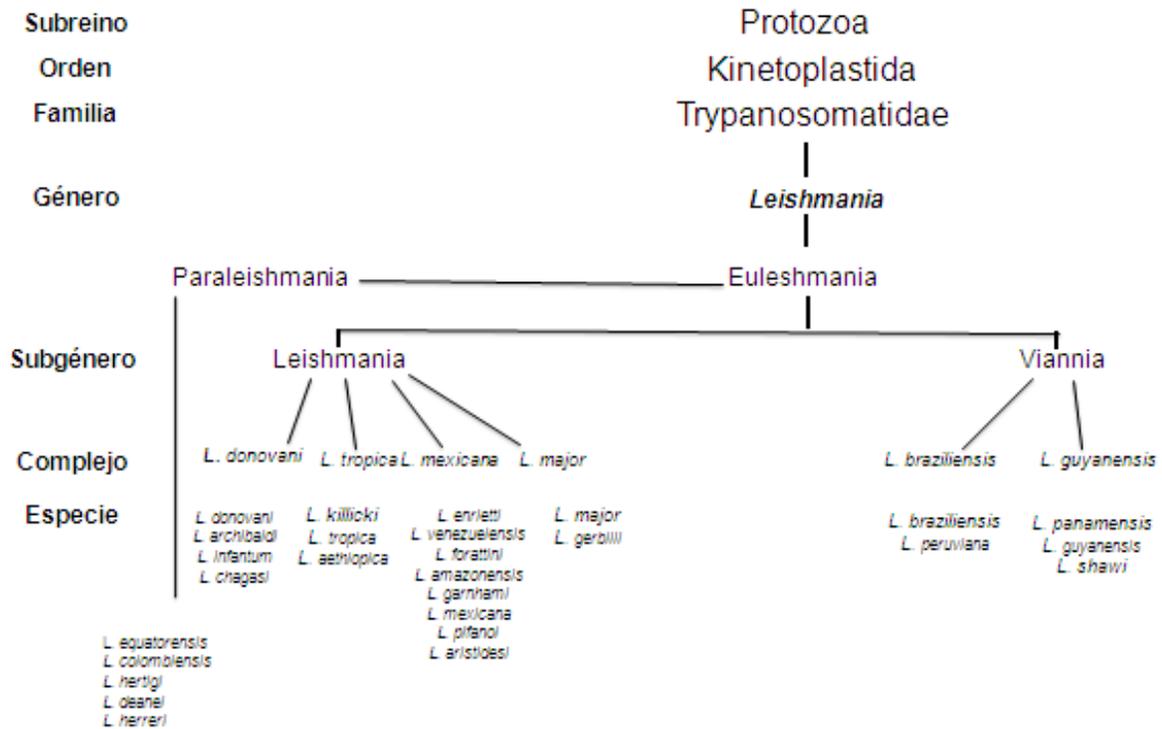


Figura 2. Taxonomía de *Leishmania* (Basado en el esquema publicado por la Organización mundial de la salud [WHO, 1990] con adición de la literatura, adaptado por Cupolillo et al 2000 (21))

1.5 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Leishmania* tiene lugar en dos tipos de hospedadores: uno invertebrado que comprende numerosas especies de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, ambos pertenecientes a la familia Psychodidae, y un hospedador vertebrado que incluye una gran variedad de géneros (1,3,22,23).

Los humanos son hospederos accidentales, cuando se ponen en contacto en el ciclo primario de transmisión animal-vector (zoonosis). Existen excepciones como en la LV de la India, en donde el ciclo primario de transmisión ocurre entre humano-vector-humano (antropozonosis) (1).

El parásito adquiere a lo largo del ciclo biológico formas bien diferenciadas, una móvil y flagelada denominada promastigote, en el hospedador invertebrado, y la otra inmóvil, intracelular y no flagelada, denominada amastigote, en el hospedador vertebrado (1,3,22,23).

Cuando el vector (hospedador invertebrado) ingiere sangre del hospedador vertebrado, inocula los promastigotes infectivos, llamados metacíclicos, que penetran en los macrófagos de la piel, vísceras y membranas mucosas, gracias a su unión con los receptores del complemento, el receptor manosa-fucosa y el receptor del fibrinógeno, donde se transforman en amastigotes, proceso que tiene lugar entre 1 a 4 horas más tarde. La multiplicación de los amastigotes en el interior de la vacuola parasitófora de los macrófagos es mitótica y se produce por fisión binaria (23).

Los macrófagos cargados de amastigotes pueden volver a ser ingeridos por el vector en el transcurso de una nueva picadura, son lisados y liberan los amastigotes que se transforman en promastigotes en el tracto digestivo del vector. Estos promastigotes sufren transformaciones complejas y dan lugar a formas características aún no bien conocidas, que se conocen con los nombres de formas “paramastigotes”, ‘haptomonas’ y “neptomonas”, para dar lugar a los promastigotes metacíclicos, que son los infectivos para el hospedador. Los parásitos pueden ser aislados del hospedador vertebrado a partir de órganos o lesiones

infectadas o del hospedador invertebrado infectado y cultivarse en una gran variedad de medios de cultivo (23).

1.6 El genoma de *Leishmania*

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida presentan un ADN nuclear (ADNn), encargado de la replicación del parásito, y un ADN extracromosómico situado en la única mitocondria, que se replica independientemente, conocido como ADN del kinetoplasto (ADNk). El ADNk puede ser separado del ADNn por centrifugación en gradiente de densidad por cloruro de cesio/bromuro de etidio (1,3,22,23)

1.6.1 Cromosomas

Los genomas de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major* y se componen cada uno de los 36 cromosomas, mientras que el genoma de *L. braziliensis* más alejadas sólo tiene 35 cromosomas como resultado de un evento de fusión que incluye los cromosomas 20 y 34. El genoma de *L. mexicana* consiste en 34 cromosomas, con dos eventos de fusión únicos que se ha producido entre los cromosomas 8 y 29, y entre los cromosomas 20 y 36 (25)

Los cromosomas son lineales entre 200 y 4000 kb, y poseen telómeros aunque centrómeros todavía no han sido identificados. La variabilidad en el tamaño de los cromosomas de algunas especies de *Leishmania*, incluso entre cromosomas homólogos, complica el uso del cariotipo para estudios taxonómicos (6,26).

1.6.2 ADN circular extracromosómico: ADN del Kinetoplasto

El kinetoplasto es una estructura que se encuentra situada en todos los protozoos pertenecientes al orden kinetoplastida dentro de la membrana mitocondrial, siendo uno de los ADNs más inusuales que se encuentran en la naturaleza. Está constituido por un disco de 1-2 μm de diámetro, visible al microscopio óptico y que contiene 10^7 pares de bases de

ADN mitocondrial. El ADNk representa del 10 al 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red gigante de miles de moléculas circulares, maxicírculos y minicírculos, concatenadas covalentemente (3,6,23,27).

1.6.2.1 Maxicírculos

El ADNk contiene aproximadamente de 25 a 50 maxicírculos de 20 a 40 Kb. Los maxicírculos pueden ser separados mediante electroforesis del ADNk digerido con enzimas de restricción. Los maxicírculos están formados por una región conservada y otra variable. Contienen secuencias de ADN a las que por homología se les atribuye el mismo papel que el ADN mitocondrial en otros sistemas celulares, como es contener los genes para los ARN ribosomales además de tener otras unidades transcripcionales y al menos 6 genes estructurales (6,23).

1.6.2.2 Minicírculos

Los minicírculos son las moléculas más pequeñas de ADN mitocondrial que se pueden encontrar en la naturaleza (23). El ADNk de *Leishmania* contiene de 10.000 a 20.000 minicírculos de 500 a 2.500pb (10 a 20 familias). Los minicírculos tienen alrededor de un 80% de su secuencia nucleotídica variable y el resto conservada. En la mayoría de las especies de *Leishmania* el 80% de los minicírculos tienen cuatro o menos clases de secuencias mayoritarias. Los minicírculos tienen una secuencia conservada de aproximadamente 120 pb y una gran región variable de unos 700pb (3,6,23,28). Los minicírculos se comportan como unidades independientes mientras se produce la replicación. (23). La heterogeneidad genética de la región variable del minicírculo ha sido estudiada para ser utilizada en la diferenciación de parásitos dentro de una misma especie. El minicírculo de ADNk es esencial para la función de los genes mitocondriales, pues codifica para ARN guías, que

juegan un importante rol en editar el ARNm de los maxicírculos que contienen genes esenciales para proteínas mitocondriales (29).

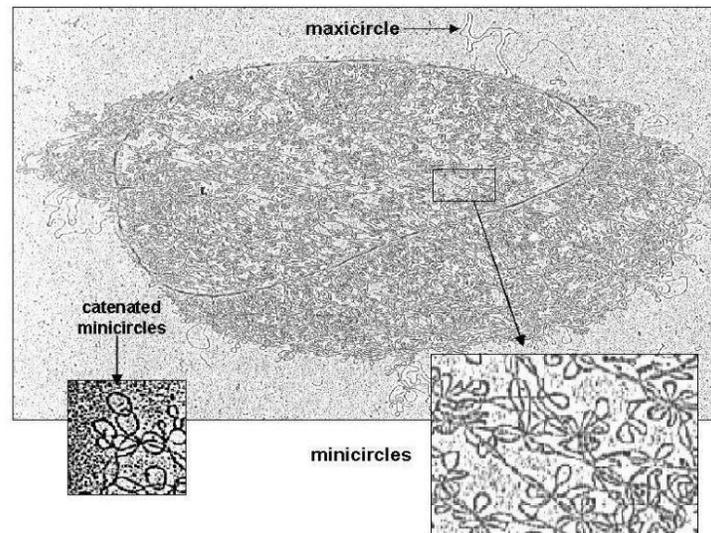


Figura 3. ADN del Kinetoplasto de *Leishmania*. El ADNk es una red concatenada de miles de moléculas de ADN (minicírculos y maxicírculos). (Fuente: http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/kdna/subchapters/kdna1.htm)

1.7 Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad

A pesar de los numerosos estudios desde 1990 el modo de reproducción de *Leishmania* continúa bajo debate. Dos hipótesis son las que se postulan: sexualidad o clonalidad (30).

La reproducción clonal es el principal mecanismo de reproducción propuesto, se basa sobre todo en que los parásitos descendientes son idénticos a sus padres (30–32). La teoría de reproducción clonal no contradice la aparición de recombinación genética en poblaciones naturales del parásito, simplemente que éstas no son lo suficientemente frecuentes para romper los patrones de prevalencia de la estructura de la población clonal. En estudios de segregación genética en cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes coinfectados por el VIH, sugieren que en estos pacientes el parásito también sigue un patrón clonal, con las implicaciones epidemiológicas que de ello se derivan (3,27,33).

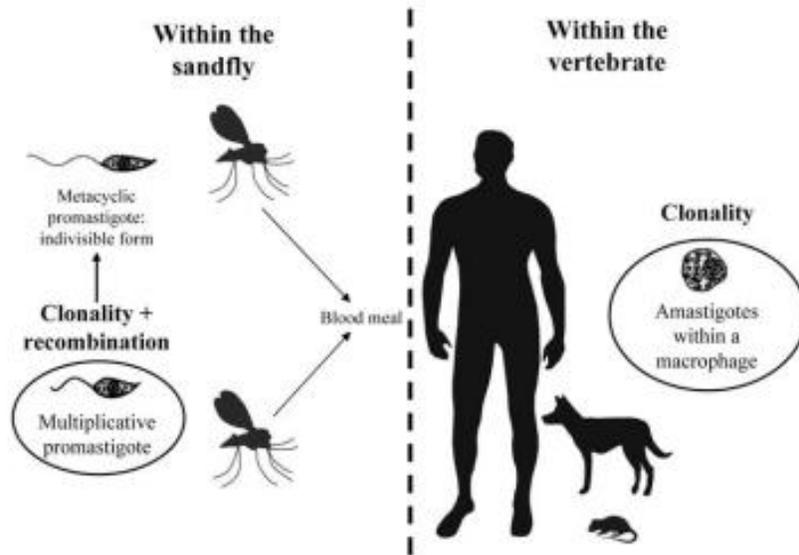


Figura 4. Esquema del ciclo de vida de *Leishmania*, donde muestra en que etapa del ciclo biológico ocurrirían los fenómenos de recombinación y clonalidad (Fuente: Rougeron et al.,2010) (30)

Recientemente fue reportado que la forma promastigote de *Leishmania* que se encuentra en el vector, denominado también huésped invertebrado, es capaz de tener un ciclo sexual consistente con un proceso meiótico(34). Sin embargo, a que frecuencia ocurre el mecanismo de recombinación y cuando ocurre en el huésped mamífero, permanece incierto(11).

1.8 Leishmaniosis y SIDA

En Europa ha habido importantes cambios en los patrones epidemiológicos de la LV. Tradicionalmente era una enfermedad infantil, mientras que hoy la coinfección VIH-*Leishmania* afecta sobre todo a adultos: el 77% de los pacientes coinfectados tienen edades comprendidas entre los 31-50 años. Esta distribución de edad coincide con la distribución de edad de los adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs) (3,23,27,35).

En los países del suroeste de Europa, hasta el 70% de los casos de LV en adultos están asociados con una infección por VIH y hasta el 9% de los pacientes con SIDA sufren de LV (primoinfección o reactivada) (3,23,27,35).

La fuerte asociación entre el parásito y el virus hizo pensar que las infecciones asintomáticas pasarían a expresarse clínicamente al producirse la inmunodepresión. Una segunda hipótesis propone además que la transmisión del parásito se realiza a través de las jeringuillas compartidas por ADVPs. Se ha propuesto un esquema de transmisión mixto de *L. infantum* en los países mediterráneos. Existe un ciclo zoonótico mantenido entre perros y a través de la picadura del flebótomo y que de manera accidental infecta al humano, al que se asocia un ciclo antroponótico artificial, en el que el flebótomo ha sido sustituido por las jeringuillas compartidas entre ADVPs. (3,23,27,35)

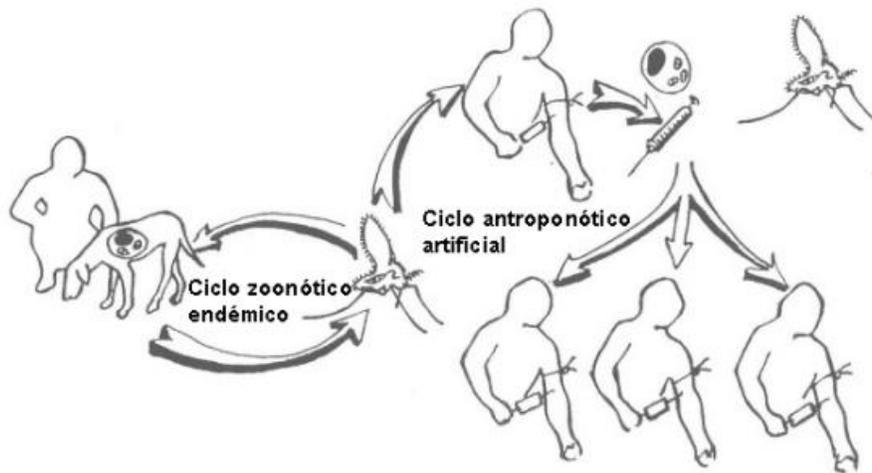


Figura 5. Esquema de transmisión mixto de *Leishmania*, como se observa existe un ciclo zoonótico mantenido entre perros y a través de la picadura del flebótomo y que de manera accidental infecta al humano, al que se asocia un ciclo antroponótico artificial, en el que el flebótomo ha sido sustituido por jeringuillas compartidas entre ADVPs (Fuente: Alvar et al., 1997)(35)

1.9. Leishmaniosis en Paraguay

1.9.1 Historia de la Leishmaniosis en Paraguay

En América el primer caso de leishmaniosis visceral fue detectado en Paraguay por Luis Migone en el año 1911. Luego de unos años de diagnosticado este primer caso, se diagnosticaron otros 5 casos hasta 1951. Pasaron luego unos 45 años, hasta que en 1995 la Dra. Kasamatsu y colaboradores diagnostican un nuevo caso, en un niño pequeño. Desde ese entonces se comenzó a investigar el fenómeno y se encontró que en el país había una gran cantidad de perros autóctonos con LV. En 1996 otros trabajos confirman la existencia del vector *Lu. longipalpis* lo que pone en evidencia la existencia del ciclo biológico completo para la transmisión zoonótica (16,18,36–38).

1.9.2 Epidemiología actual de la Leishmaniosis en Paraguay

Más del 90% de los casos de LV proviene del área geográfica que abarca al distrito de Asunción y los departamentos Central y Cordillera, probablemente debido a la instalación del ciclo de transmisión de la enfermedad, en donde convergen una alta proporción de perros con LV y flebótomos vectores, además de un crecimiento urbano desordenado de la población. En menor proporción también se han detectado casos en los departamentos de Guairá, Itapúa, Misiones, Alto Paraná, Concepción y Amambay (39).

El agente de la LV en Paraguay es *L. infantum* y el vector identificado, igual que en los países de la región, es el *Lu longipalpis*. En cuanto al reservorio, la incidencia en canes es alta, provenientes mayoritariamente de central y la capital (40).



*hasta la Semana Epid.47

**Leishmaniosis Visceral
Dpto. Central/2010-2011***

DISTRITO	2010	2011*
LUQUE	16	10
LIMPIO	8	9
CAPIATA	16	7
SAN LORENZO	9	7
AREGUA	7	6
LAMBARE	5	5
ÑEMBY	12	4
SAN ANTONIO	3	4
J.A. SALDIVAR	0	3
VILLA ELISA	3	2
YPANE	6	2
MARIANO R. ALONSO	3	1
ITA	2	1
GUARAMBARE	0	1
YPACARAI	0	1
ITAUGUA	2	0
FERNANDO DE LA MORA	2	0
VILLETA	2	0
TOTAL DPTO.CENTRAL *	96	63
TOTAL CENTRAL ANUAL	102	63
TOTAL PAIS ANUAL	145	95

*hasta la Semana Epid.47

Figura 6. Tendencia de aumento de casos en el departamento Central hasta el 2010, marcándose un descenso para el año 2011. (Fuente: Programa Nacional de Leishmaniosis.GDE/SENEPA-MSP y BS)(41)

En el año 2011 fueron 15 los distritos afectados en el departamento Central, siendo Luque y Limpio los más afectados, juntos alcanzan el 30% (19/63) de los casos notificados por el departamento. Mayoritariamente los casos notificados, se presentan en un 62% en personas del sexo masculino y en mujeres alcanza 38%. El grupo de edad más vulnerable son los menores de 1 a 4 años de edad (41).

Varios son los factores de riesgo que predisponen a las personas a contraer LV, pero sobre todo está la malnutrición y la inmunodepresión a consecuencia de otras patologías, y entre ellas la más importante la infección por VIH, en nuestra país ya se hace común la presencia de LV como infección oportunista en pacientes que viven con el virus del SIDA (42,43).

El diagnóstico de la LV en nuestro país se hace por varios exámenes laboratoriales serológicos como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el análisis inmunoenzimático (ELISA), la inmunocromatografía con antígeno RK39, también por visualización del parásitos en frotis y coloración de giemsa de médula ósea, bazo o ganglio, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (39).

No existen estudios que reflejen la verdadera prevalencia de LVC, pues las muestras de los estudios no son aleatorizadas. Sin embargo, poseen un valor relativo que nos puede dar una idea indirecta de la real prevalencia (44).

En un estudio realizado por Canese y colaboradores entre los años 2001 y 2002, se encontró que 38,7% de los perros estudiados en la ciudad de Asunción presentaban serología positiva para LVC. Mayor cantidad de perros encontró en los municipios de Lambaré, Luque, San Lorenzo y Villa Elisa, que juntos llegaron a reunir el 68% de todo los casos positivos de LVC (45). Estudios más recientes indican tasas de infección similares. A nivel nacional, estudios recientes realizados por el Departamento de Leishmaniasis del Programa Nacional de Control de Zoonosis y Centro Antirrábico Nacional, de enero de 2005 a octubre de 2010, mostraron una prevalencia de LVC del 28,4% en 41776 sueros de caninos, provenientes de exámenes de rutina de muestras remitidas, de búsqueda activa y de intervenciones de focos de casos humanos (46) Una investigación de prevalencia por muestreo consecutivo,

realizada recientemente por perros callejeros de Asunción, muestra la altísima tasa de infección del 69%, Miret J, comunicación personal (datos aun no publicados).

Estos datos nos indican que existen una gran cantidad de perros infectados, lo que pone en riesgo a la población susceptible permitiendo el mantenimiento del ciclo zoonótico.

1.10 Técnicas de caracterización de *Leishmania*

Las distintas especies de *Leishmania* son indistinguibles en lo morfológico pero sin embargo, causan lesiones que evolucionan de forma diferente, por lo que la taxonomía de este género reviste especial importancia médica (22).

En Brasil se han encontrado pacientes que desarrollan una enfermedad muy severa, que en algunos casos conduce a la muerte mientras que otros no presentan muchas complicaciones, con esto surge la pregunta de si esta variación en la patogenicidad de la enfermedad pudiera estar relacionado con variantes genéticas del parásito (11).

La necesidad de caracterizar y diferenciar a las poblaciones de parásitos con la finalidad de establecer un mejor diagnóstico, tratamiento, pronóstico, control e influencia que la variación intraespecífica pueda tener en la epidemiología de la enfermedad, ha dado lugar a que se desarrollen un número importante de métodos de caracterización (22).

1.10.1 Electroforesis de isoenzimas por sus siglas en inglés MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)

La técnica más utilizada para propósitos taxonómicos ha sido la MLEE (47,48). Esta técnica continúa siendo el estándar de oro para la identificación de especies y estudios de diversidad genética. MLEE detecta diferentes alelos de genes conservados midiendo la movilidad electroforética de las enzimas que codifican estos genes. Un cambio en la secuencia nucleotídica se verá reflejado en la movilidad electroforética de la proteína. En el

análisis se considera que las enzimas que exhiben la misma movilidad electroforética están codificadas por el mismo alelo (6,47,48).

El término “zimodema” hace referencia a las poblaciones de parásitos de una misma especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos.(49)

Esta técnica presenta diversas desventajas para su aplicación, requiere el cultivo del parásito, ya que necesita de grandes cantidades de proteína, es muy laboriosa, el equipamiento necesario es costoso y requiere de personal entrenado. Además tiene un bajo poder discriminativo para las sustituciones nucleotídicas que no cambian la composición de aminoácidos de la proteína, y por tanto la movilidad electroforética permanecerá invariable (29,50). Por ejemplo el zimodema más conocido de *L. infantum* MON1, es responsable de la mayoría de los casos de LV. Con marcadores moleculares más específicos se logró comprobar que este zimodema en realidad es un grupo genéticamente heterogéneo (27,29,51,52).

1.10.2 Hibridación con sondas de ADN

Todos los ensayos de hibridación se basan en la gran especificidad de la interacción entre las bases complementarias. Para que la hibridación permita identificar en un genoma u otra muestra cualquiera de ácido nucleico, una secuencia particular, se requieren dos elementos básicos: a) la presencia de la secuencia diana en uno de los fragmentos, generalmente obtenidos con enzimas de restricción de la muestra de ácido nucleico. b) un fragmento corto de ácido nucleico, llamada sonda, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana, marcado de forma que permita su detección (radiactivo, coloreado, fluorescente). Para la caracterización de *Leishmania*, una de las regiones más utilizadas para la hibridación con sondas de ADN, ha sido la de los minicírculos del ADN del

kinetoplasto (ADNk), por presentar secuencias conservadas y repetidas (23,53). Mediante el uso de hibridación con sondas de ADN en la clasificación de *Leishmania*, se ha podido separar *L. braziliensis* de *L. mexicana*, lográndose incluir dentro del subgénero *Viannia* las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (3,53).

1.10.3 Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, por su siglas en inglés RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

La forma más directa de detectar polimorfismo es la secuenciación del ADN, pero por su costo y disponibilidad, se suele acudir a otras técnicas entre las que se encuentra, el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), donde intervienen enzimas de restricción las cuales presentan una gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta (de 4 a 6 nucleótidos) de ADN dúplex y la consiguiente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas del ADN llamadas sitios de restricción. La cantidad de bandas (patrones) que puedan aparecer entre las especies e incluso dentro de la misma especie podrían indicar la proximidad o lejanía filogenética entre las cepas en estudio (53).

En los tripanosomátidos en general, y en *Leishmania* en particular, la técnica se ha venido realizando digiriendo el ADNk previamente separado del ADNn y los patrones de fragmentos obtenidos se denominan esquizodemos, útiles en estudios de caracterización del parásito. A través de zimodemos y esquizodemos en aislados de *Leishmania* procedentes de pacientes y perros con LC y LV de diferentes áreas endémicas en Brasil, los aislados del foco de LC de Rio de Janeiro fueron identificado como *L. braziliensis* y el de LV como *L. infantum* al realizar los análisis de zimodemos y esquizodemos se verificó que los aislados de LC eran idénticos a los de otro foco y, en relación a los aislados de LV que la misma

cepa del parásito circulaba tanto en la población humana como en la canina, lo que confirma la importancia del perro como reservorio de la leishmaniosis visceral (54).

1.10.4 Reacción en cadena de la Polimerasa por su siglas en inglés PCR (Polimerasa chain reaction)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa es una amplificación in vitro del ADN, considerada hoy en día una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética. El objetivo es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirectamente de un ARN. El requisito indispensable para desarrollar la técnica es conocer la secuencia de la región de ADN (o ARN) de interés para amplificar (53).

La técnica de PCR directa presenta una alta sensibilidad, sin embargo, con el propósito de mejorarla cada vez más han surgido variantes de la misma, tales como: la Hot-start-PCR; L-PCR (PCR larga); PCR anidada; PCR semianidada; PCR múltiple; PCR hibridación; PCR-RAPD, PCR-RFLP, PCR en tiempo real; entre otras (53).

1.10.5 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico por su siglas en inglés RADP (Random Amplified Polymorphic DNA)

Las técnicas basadas en la amplificación de secuencias en el ADN genómico mediante cebadores de secuencia variable en tamaño y elegidos al azar como RAPD (10 a 12 pb), utilizan un sólo oligonucleótido con una secuencia arbitraria a diferencia de la técnica de PCR que utiliza cebadores específicos. Los fragmentos amplificados pueden ser utilizados como sondas en el diagnóstico y, posteriormente, donados y caracterizados simplificando así la búsqueda de fragmentos de ADN específicos de especie (23).

Concretamente, la técnica de RAPD se basa en la amplificación de ADN con cebadores cuya secuencia es seleccionada arbitrariamente, permitiendo la discriminación de variantes

intraespecíficas, así como el polimorfismo generado por diferentes mutaciones. Los fragmentos amplificados no pueden ser interpretados desde el punto de vista alélico ya que no es posible distinguir si un segmento de ADN es amplificado a partir de un locus heterocigótico u homocigótico. Es decir un iniciador dado amplificará un “locus” o un grupo de “loci” dados (23,55–57).

1.10.6 Microsatélites

En *Leishmania* se han desarrollado marcadores específicos de secuencias microsatélites; 13 fueron diseñados para *L. major*, 16 para *L. trópica* y 20 para *L. donovani*, así como, 11 marcadores de microsatélites independientes diseñados para *L. infantum*, encontrándose polimorfismo entre las especies e intraespecies de *L. infantum* MON-1. Adicionalmente, se ha podido relacionar las variaciones o polimorfismo de estas secuencias con el área geográfica de procedencia y detectar infección natural en el vector (58–60).

1.10.7 PCR-RFLP

Esta técnica detecta pequeñas variaciones en un gen concreto ya que el producto amplificado es digerido con diferentes enzimas de restricción que reconocerán o no su diana dependiendo de estas variaciones nucleotídicas. Se obtiene así un patrón distinguible y diferente que se puede utilizar para diferenciar especies, como las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacers*) del gen que codifica el ARN ribosómico que permite la diferenciación de especies del género *Leishmania* además de la realización de estudios filogenéticos (61). Otras dianas moleculares del ADN genómico utilizadas con fines similares son: el gen la subunidad pequeña del ARN ribosómico (62), la región del spliced leader miniexón (SLME) (63–65), genes antigénicos como el locus que codifica para *gp63*

(66,67), *Hsp70* (68), y otras como ADNk que es material genético no nuclear (3,29,50,51,69–73).

Con estas técnicas basadas en la PCR se solventa la limitación del análisis isoenzimático ya que no es necesario cultivar los parásitos, la PCR tiene suficiente sensibilidad como para detectar ADN del parásito en cantidades mínimas. Además, la reacción se puede llevar a cabo con ADN total extraído de muestras biológicas y solo se amplifica la región blanco del ADN de *Leishmania* que se desea, gracias a la especificidad de los cebadores (53).

Estas técnicas permiten además, la construcción de dendogramas utilizando algoritmos de *clustering*, por ejemplo en base a los patrones obtenidos con los cortes con enzimas de restricción en caso de la RFLP. Este análisis por conglomerados o *clustering* es una herramienta de análisis exploratorio de datos para resolver problemas de clasificación. Su objeto consiste en ordenar objetos en grupos (conglomerados o *clusters*) de forma que el grado de asociación/similitud entre miembros del mismo *cluster* sea más fuerte que el grado de asociación/similitud entre miembros de diferentes *clusters* (11,27,29,50,51,58,73–75).

La PCR-RFLP del minicírculo del ADNk es una técnica apropiada para estudiar la diversidad genética del parásito, debido a la abundante cantidad de repeticiones que se encuentra en un solo parásito y a la alta variabilidad en la secuencia, la cual juega un importante rol en la función genética mitocondrial. Además, este ADN responde más rápidamente a las condiciones de estrés del medio ambiente, confiriendo al parásito ventajas selectivas que podrían depender del tipo de minicírculos que prevalece (23,28,29,50).

El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de *L. infantum* en Paraguay mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa empleando como blanco molecular los minicírculos del ADNk seguido por el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, con el fin de evaluar la asociación genotípica de los parásitos encontrados en muestras humanas, caninas y parásitos aislados en cultivo.

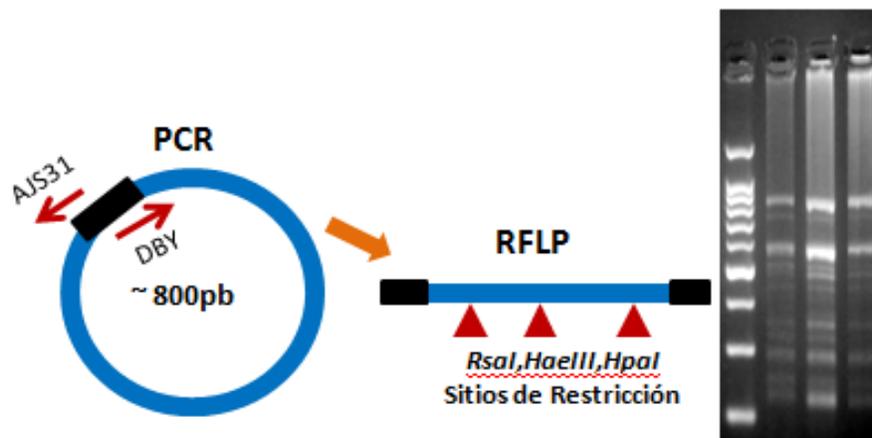


Figura 7. Esquema de la aplicación del método ADNk PCR-RFLP *Leishmania* spp.

2. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Estudiar la diversidad genética de la especie *Leishmania infantum* de parásitos aislados en cultivo y de muestras biológicas de casos humanos y caninos provenientes de diferentes regiones del Paraguay.

Objetivos Específicos:

- Analizar la heterogeneidad genética de *Leishmania infantum* en aislados y muestras biológicas.
- Comparar los perfiles genéticos de *Leishmania infantum* encontrados en las diferentes muestras.
- Elaborar el dendograma de las variantes genéticas encontradas y establecer la distancia genética entre ellas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Diseño del estudio

Este es un estudio observacional descriptivo de corte transverso, el análisis molecular de muestras se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA), con la colaboración del Departamento de Producción Bioquímica del IICS, empleando muestras colectadas en el marco del proyecto de “Estrategias de control para leishmaniosis visceral y leishmaniosis mucocutánea en Sudamérica: aplicaciones de la epidemiología molecular” *LeihEpiNetSA*, que fuera financiado por la Unión Europea (2006-2009).

3.2. Consideraciones Éticas

El protocolo de este proyecto fue presentado a los Comités Científico y de Ética de la investigación del IICS-UNA y aprobado bajo el código P14/2011. Las muestras de ADN fueron seleccionadas a partir de la base de datos digital del proyecto *LeishEpiNetSA* respetando la codificación asignada durante el mismo. Las muestras se encuentran debidamente conservadas en la ADNteca de muestras del IICS-UNA. Las muestras de pacientes humanos cuentan con un consentimiento informado de acuerdo al protocolo del proyecto *LeishEpiNetSA*. Para la utilización de estas muestras se solicitaron los permisos correspondientes al Departamento de Producción-Bioquímica del IICS-UNA y a la coordinación del proyecto previamente mencionado. Esta base de datos solo es manejada por los investigadores relacionados al proyecto y se solicitó el permiso correspondiente para obtener el acceso tanto a los datos como a las muestras de ADN.

Si bien los resultados de este trabajo no contemplan un beneficio directo para los pacientes incluidos en este estudio, los resultados obtenidos serán beneficiosos para la comunidad

científica permitiendo un mejor conocimiento de la epidemiología del parásito causante de la LV en nuestro país.

3.3. Población de Estudio

3.3.1 Cepas de referencia utilizadas

Las cepas de referencia que fueron utilizadas en el presente trabajo para las pruebas de sensibilidad y especificidad de las reacciones de PCR figuran en la tabla 1.

Dichas cepas de *Leishmania* fueron provistas gentilmente por el *Laboratorio de Pesquisa en Leishmaniose/LPL. Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Brasil*. La cepa de *Trypanosoma cruzi* fue proveída por el *Departamento de Medicina Tropical. Instituto de Investigaciones-IICS-UNA, Paraguay*.

Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas

Código IOC-L	Especie	Código Internacional
579	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>	MHOM/BR/1974/PP75
566	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
563	<i>Leishmania (L.) donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3
575	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8
561	<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL21
---	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CL Brener

3.3.2 Muestras de pacientes humanos y caninos

3.3.2.1. Muestras Biológicas: Fueron estudiadas 33 muestras biológicas (ver Tabla 2) de casos sospechosos de LV, 9 pertenecían a casos sospechosos de LVH y 24 pertenecían a casos sospechosos LVC en el periodo comprendido entre los años 2007-2009. Las muestras de LVH fueron obtenidas a partir de aspirados de médula ósea y provenían de casos detectados en Asunción, capital del país y en distritos cercanos como Limpio, Fernando de la Mora y San Lorenzo del departamento Central. Las muestras de LVC fueron obtenidas de muestras de bazo de perros con diagnóstico serológico positivo para LVC, que

provenían de las zonas de Asunción, departamento Central, departamento de Cordillera, departamento de Amambay y departamento de Misiones.

3.3.2.2 Aislados en cultivo: Fueron empleadas 20 muestras de parásitos aislados en cultivo provenientes de casos de leishmaniosis visceral canina. Las formas promastigotes de cultivo de *Leishmania* fueron aisladas en la fase líquida del medio de cultivo NNN (agar base sangre Sigma, USA) a 26° C a partir de muestras de bazo de caninos con LV. Una vez que se obtuvo el crecimiento de las formas promastigotes, se transfirió una alícuota a un medio bifásico NNN cuyo sobrenadante era RPMI 1640 (Sigma, USA) suplementado con suero fetal bovino al 20%. A los 7 días de incubación en RPMI 1640 (Sigma, USA), los parásitos se cosecharon y separaron por centrifugación a 2.000 rpm lavándolos 4 veces con buffer salino-fosfato pH= 7,2 PBS (Wako, Japón).

3.4. Control de calidad

En todas las reacciones de PCR de las muestras de estudio se utilizó la cepa de referencia de *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75.

Como prueba de especificidad para demostrar que los cebadores utilizados no amplifican genomas de parásitos de la misma familia se utilizó una cepa de *T. cruzi* (CL Brenner) como control de especificidad.

Tabla 2. Datos de las muestras analizadas

Nro	Origen de la muestra	Procedencia	Tipo de muestra	Año
1	Perro	Lambaré	Bazo	2007
2	Perro	Ñemby	Bazo	2007
3	Perro	Ñemby	Bazo	2007
4	Perro	Asunción	Bazo	2008
5	Perro	Altos	Bazo	2008
6	Perro	Altos	Bazo	2008
7	Perro	Tobatí	Bazo	2008
8	Perro	Altos	Bazo	2008
9	Perro	Altos	Bazo	2008
10	Perro	Altos	Bazo	2008

11	Perro	Fernando de la Mora	Bazo	2008
12	Perro	Asunción	Bazo	2008
13	Perro	Lambaré	Bazo	2007
14	Perro	Asunción	Bazo	2007
15	Perro	Mariano Roque Alonso	Bazo	2007
16	Perro	Lambaré	Bazo	2007
17	Perro	Tobati	Bazo	2008
18	Perro	Tobati	Bazo	2008
19	Perro	Tobati	Bazo	2008
20	Perro	Tobati	Bazo	2008
21	Perro	Atyra	Bazo	2008
22	Perro	Altos	Bazo	2008
23	Perro	Dpto. Central	Bazo	2008
24	Perro	Luque	Bazo	2008
25	Aislado	Luque	Cultivo	2008
26	Aislado	Encarnación	Cultivo	2008
27	Aislado	Encarnación	Cultivo	2008
28	Aislado	Asunción	Cultivo	2008
29	Aislado	Amambay-Bella Vista	Cultivo	2008
30	Aislado	Amambay-Bella Vista	Cultivo	2008
31	Aislado	Villa Rica	Cultivo	2008
32	Aislado	San Juan Misiones	Cultivo	2008
33	Aislado	Tobati	Cultivo	2008
34	Aislado	Altos	Cultivo	2008
35	Aislado	Altos	cultivo	2008
36	Aislado	Altos	Cultivo	2008
37	Aislado	Altos	Cultivo	2008
38	Aislado	Tobati	Cultivo	2008
39	Aislado	Atyra	Cultivo	2008
40	Aislado	Altos	Cultivo	2008
41	Aislado	Altos	Cultivo	2008
42	Aislado	Asunción	Cultivo	2008
43	Humano	Dpto. Central	MO	2007
44	Humano	Dpto. Central	MO	2007
45	Humano	Dpto. Central	MO	2007
46	Humano	Dpto. Central	MO	2008
47	Humano	Dpto. Central	MO	2009
48	Humano	Dpto. Central	MO	2009
49	Humano	Dpto. Central	MO	2009
50	Humano	Dpto. Central	MO	2009
51	Humano	Dpto. Central	MO	2007
52	Aislado	Ñemby	Cultivo	2007
53	Aislado	Ñemby	Cultivo	2007

3.5 Búsqueda de secuencias de *Leishmania* del complejo *Leishmania donovani* en el *GenBank*

Se realizó la búsqueda en la base de datos *GenBank* utilizando los siguientes métodos: 1) *BLAST* de secuencias poco similares y altamente similares utilizando la secuencia de los cebadores AJS31, DBY, LINR4, LIN17 y LIN19; 2) búsqueda por palabras clave, por ejemplo “*Leishmania infantum minicircle*”. Con estas secuencias, se construyó una base de datos conteniendo 51 secuencias completas de minicírculos correspondiente a las especies del complejo *L. donovani*. Con la base de datos final se realizó el alineamiento múltiple de secuencias junto con las secuencias de los cebadores empleados y las secuencias del minicírculo del ADNk, utilizando el programa *CLUSTAL W* implementado en *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.0*.

Los cebadores utilizados para amplificar el minicírculo del ADNk, AJS31 y DBY para la reacción directa y LINR4, LIN17 y LIN19 para la PCR semianidada son específicos del género *Leishmania*.

3.6. Preparación de ADN genómico total de las muestras

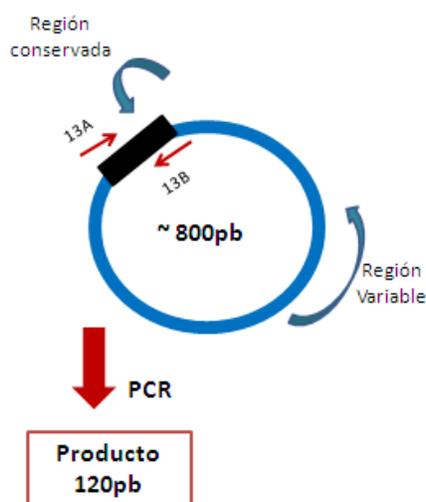
La extracción de ADN total se realizó a partir de una alícuota de 200µL en el caso de los parásitos aislados en cultivo y de muestras de médula ósea de pacientes humanos, y en el caso de muestras de biológicas de caninos se empleó una pequeña fracción de tejido de aproximadamente 2 a 3 mm². Para el efecto fue empleado el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (PROMEGA, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Finalmente, el producto de la extracción fue resuspendido en 100µL de tampón de rehidratación proveído por el *kit* y posteriormente fue empleado como templado para las reacciones de PCR.

3.7. Cuantificación de ADN de muestras biológicas

La cuantificación de ADN de muestras fue realizada por la medida de la absorbancia a 260nm. Se realizó la lectura de la absorbancia utilizando un cuantificador de ADN (Biowave DNA WPA, UK), teniendo en cuenta la relación 1 OD 260nm equivale a 50ng/μL de ADN. Para las reacciones de PCR se emplearon de 150 a 200 ng de ADN por muestra.

3.8. Reacciones de PCR para la amplificación del ADNk de *Leishmania*

Figura 8. Esquema de la PCR para la detección del género *Leishmania*



3.8.1 Detección del género *Leishmania*

Para la amplificación se utilizaron los cebadores **13 A: 5'-GTG GGGGAG GGG CGT TCT-3'** y **13B: 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3'**, descritos por Rodger et al (76) que amplifican la región conservada del ADNk con el siguiente esquema de termociclado: 3min a 94°C; seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 2 min a 72°C. (Termociclador Esco Healthcare Swith MaxPro,China)

La mezcla de reacción contenía: buffer 1X; 1,5mM de MgCl₂; 5% de DMSO; 0,4mM dNTP'S (BIOLINE, UK); 0,2mM de cada cebador, 1U de Taq polimerasa para un volumen total de 50 µL. El producto obtenido tiene un tamaño de 120 pb.

3.8.2 PCR del minicírculo para genotipificación

3.8.2.1 PCR directa para amplificar minicírculos de ADNk

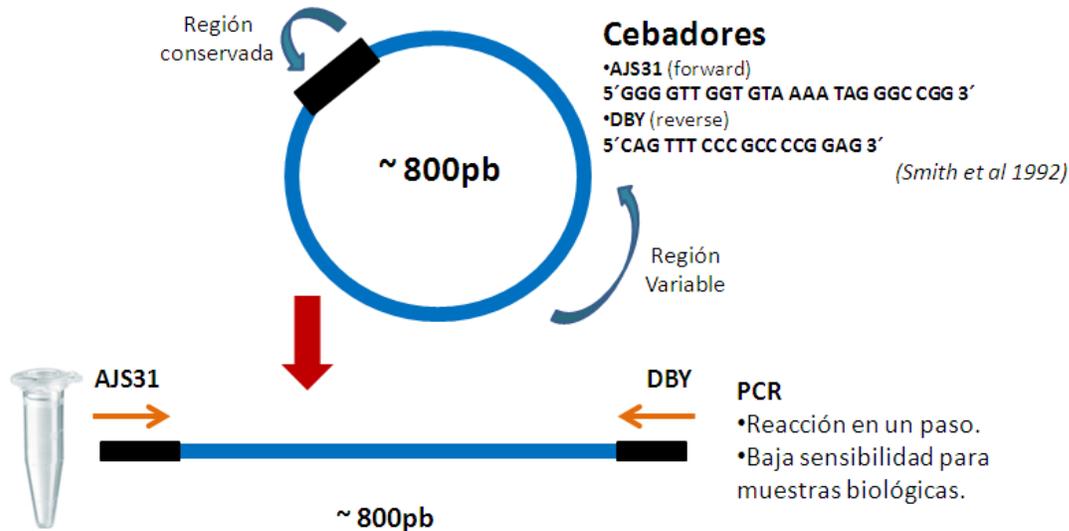


Figura 9. Esquema de la PCR directa para amplificar minicírculos de ADNk.

Para la reacción de amplificación se utilizó el protocolo propuesto por el manual del Curso de entrenamiento de Epidemiología Molecular de la Leishmaniosis en el marco del proyecto *LeishEpiNetSA(77)*.

Los cebadores denominados **AJS31** (forward): 5'GGG GTT GGT GTA AAA TAG GGC CGG 3' y **DBY** (reverse) 5'CAG TTT CCC GCC CCG GAG 3' según lo publicado por Smith et al (78), específicos para el complejo *L. donovani* y que amplifican el ADN del minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania spp.*

La mezcla de reacción consistió en tampón Taq polimerasa 1X (BIOROM, Alemania) 2,5mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 15 pmol de cada primer, 1U de Taq polimerasa y 5 µL de ADN

en volumen total de 50 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 5 min a 94°C, 35 ciclos de; 30 seg a 94°C, 30 seg a 68°C, 30 seg a 72°C, y una extensión final de 6 min a 72°C (Termociclador Esco HealthCare Swith MaxPro, China). Los productos de PCR tienen un tamaño aproximado de 800 pb.

3.8.2.2 PCR semianidada para amplificar minicírculos de ADNk en muestras biológicas

Para el ADN extraído de muestras biológicas se empleó una técnica de PCR semianidada con los siguientes cebadores, que están diseñados para unirse a las regiones conservadas del ADNk descritas por Aransay et al en el 2000 (60). **LINR4** (forward)5'-**GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3'**; **LIN17** (reverse)5'-**TTT GAA CGG GAT TTC TG-3**; **LIN19** (reverse) **5'CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'**.

Amplifican la región variable de los minicírculos de *Leishmania*. La primera reacción de amplificación se lleva a cabo en un total de 10 µL conteniendo tampón Taq polimerasa 1X (BIORON, Alemania), 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTPs, 1 µM LINR4, 0,2 µM LIN17, 1 U de Taq polimerasa (BIORON, Alemania) y 5 µL de ADN extraído, la mezcla de reacción fue desnaturizada a 94°C durante 5 min seguido de 17 ciclos cada uno consistente en 30 seg a 94°C, 30 seg a 52°C, y 30 seg a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. La segunda reacción de amplificación se realiza agregando 40 µL de mezcla de reacción conteniendo buffer 1X, MgCl₂, dNTPs, y Taq polimerasa (BIORON, Alemania) como se describe para la primera reacción y LIN19 en una concentración final de 1 µM por 33 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 52°C, y 1 min a 72°C. Los productos de PCR tienen un tamaño aproximado de 720pb.

3.9 Análisis de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (BIOROM, Alemania) al 2%, empleando solución tampón TAE 1X (0.04M Tris-acetato,

0,001M EDTA) (79). En cubas MUPID-3 (Japón) a 100V durante 30 min. El tamaño de la banda fue verificado corriendo en paralelo un marcador de peso molecular de 100pb (BIOROM, Alemania) o 50pb (O'RangeRuler, FERMENTAS, Lituania) y visualizados con luz UV previa tinción con bromuro de etidio (5µg/ml). Los geles de agarosa fueron registrados con un sistema de documentación digital de geles (Major Science UVDI,USA).

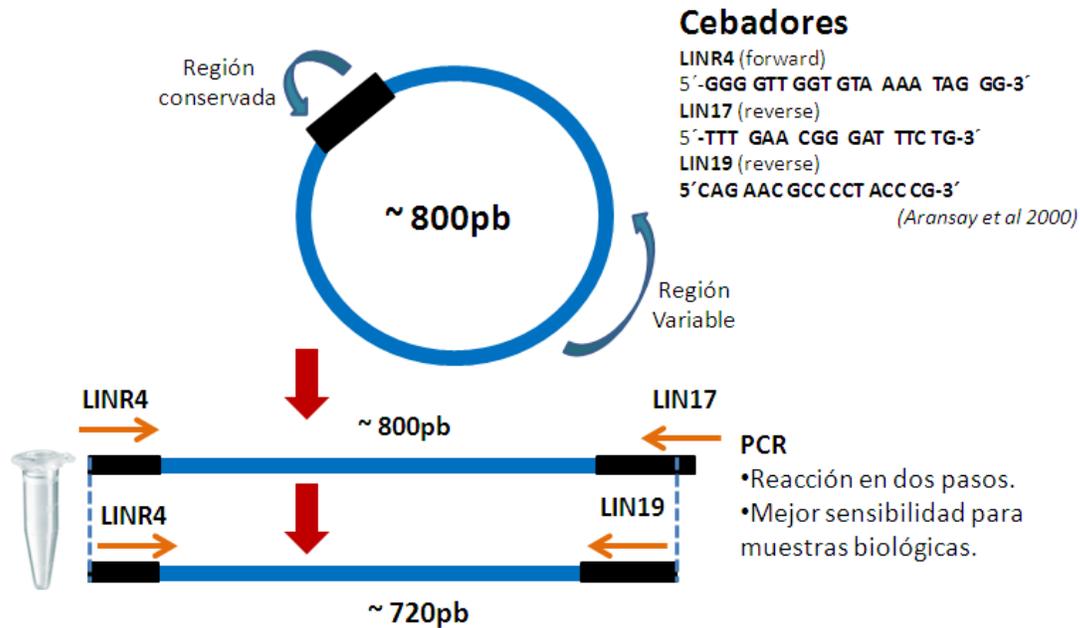


Figura 10. Esquema de la PCR semianidada para amplificar minicírculos de ADNk.

3.10 Prueba de sensibilidad y especificidad de las reacciones de PCR

La sensibilidad de las reacciones de PCR fue determinada por la capacidad de las técnicas para detectar diluciones seriadas de ADN, fijándose así el límite de detección de la técnica bajo las condiciones empleadas. Para el ensayo se empleó la cepa de referencia *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75. La cantidad de ADN ensayada fue del rango de 10^6 parásitos a 1 parásito equivalente a valores de 100ng a 100fg.

La especificidad de las reacciones de PCR fue determinada por la capacidad de las técnicas para diferenciar al género *Leishmania* del género *Trypanosoma*. Para los ensayos se emplearon 10 pg de ADN equivalente a 100 parásitos de las cepas de referencia.

3.11. Predicción de patrones de restricción del producto amplificado

Se obtuvieron 51 secuencias del minicírculo de ADNk de *Leishmania* del complejo *L. donovani* almacenadas en la base de datos del *GenBank*, en las cuales se analizó el número de sitios de corte de la enzima de restricción *RsaI*, utilizando el lenguaje de programación *Perl* para predecir los posibles perfiles que podrían ser generados por la acción de la enzima de restricción *RsaI* sobre las secuencias de los minicírculos del ADNk el resultado de este análisis se resume en la tabla 2. Los números de acceso de las secuencias se encuentran en Anexos II.

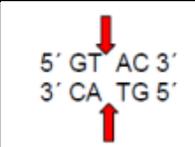
Tabla 3. Predicción de los patrones de restricción con la enzima *RsaI*.

Enzima	<i>RsaI</i>							
	Perfiles	I	II	III	IV	V	VI	VII
Fragmentos de Restricción		490	490	575	315	715	520	430
		315	250	230	230	90	240	370
			65		175		45	
					90			

3.12. Digestión de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *RsaI* (BIOLABS, UK) las digestiones se llevaron a cabo durante toda la noche.

Tabla 4. Sitio de corte *RsaI*

Enzima	Sitio de Corte
<i>RsaI</i>	

Los productos digeridos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3% a 100V durante 45min. Los geles se prepararon en TAE 1X (0.04 Tris-acetato, 0,001M EDTA)(79). La electroforesis se realizó en cubas MUPID-3 (Japón) a 100V durante 30 min. El tamaño de la banda fue verificado corriendo en paralelo un marcador de peso molecular escalera de 100pb (BIOROM, Alemania) o 50pb (OrangeRuler, FERMENTAS, EU) y visualizados con luz UV previa tinción con bromuro de etidio (5µg/ml). Los geles de agarosa fueron registrados con un sistema de documentación digital de geles (Major Science UVDI, USA).

3.13 Análisis de los fragmentos de restricción

Para facilitar la construcción de la matriz binaria se utilizó el software *UN-SCAN-IT* (Versión 6,1 Silk Scientific, USA) que permite analizar la fotografía del gel para determinar los tamaños y elaborar la matriz en base a la presencia o ausencia de bandas.

3.14 Construcción del dendograma

Los patrones obtenidos mediante la PCR-RFLP contribuyen a la determinación de un perfil, que para su análisis debieron ser traducidos a matrices binarias, que reflejan la ausencia o presencia de las bandas. Con la matriz binaria se procedió a la construcción de una matriz de distancia utilizando el programa *RESTDIST* (*Restriction Fragments Distance, modification of Nei and Lei restriction fragment distance method; Nei and Lei 1979*)(80), a partir del cual se elabora un dendograma *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages*) con el programa *NEIGHBOR*, ambos disponibles en el paquete *PHYLIP* (*Phylogeny Inference Package*) versión 3.6 disponible en <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. Para la visualización gráfica del

dendograma resultante se empleó el *software FigTree* v1.3.1 disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Para definir el número de *clusters* se trazó el dendrograma una línea vertical en el punto de donde se produce el cambio de distancia más acentuado.

3.15 Cálculo de las frecuencias de los perfiles encontrados

Los datos fueron introducidos en una planilla electrónica y el cálculo de las frecuencias fue realizado utilizando la herramienta *Microsoft Office Excel* 2007.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación del género *Leishmania*

Se confirmó la presencia del género *Leishmania* en las muestras biológicas de humanos y caninos, observándose en todas las muestras el producto esperado de 120pb. Esta técnica permite detectar la presencia de 1 parásito equivalente a 100fg de ADN (81).

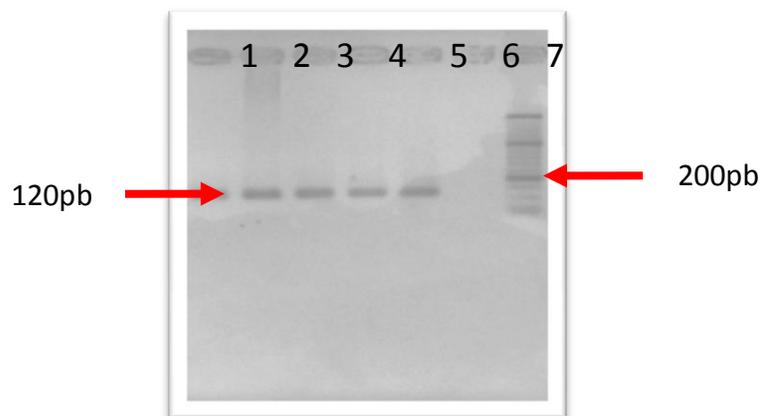


Figura 11. PCR para la amplificación de la región conservada de los minicírculos del ADNk de *Leishmania* con los cebadores 13A y 13B en muestras biológicas. Carriles 1 al 5, muestras biológicas de caninos. Carril 5 control positivo. Carril 6 control negativo. Carril 7 marcador de peso molecular de 50pb (O'RangeRuler, FERMENTAS, EU)

4.2 Sensibilidad de las reacciones de PCR

4.2.1 Sensibilidad de la PCR directa

El límite de detección de la técnica, empleando los cebadores AJS31 y DBY, se determinó tras el procesamiento de diluciones de ADN total de promastigotes de la cepa *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75 desde 10^6 a 1 parásito lo que corresponde a valores de 100 ng a 100 fg de ADN. Detectándose como mínimo 100 parásitos por reacción lo que corresponde a 0,01ng de ADN, lo que puede observarse en la figura 12 del gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El producto esperado es de aproximadamente 800pb. En esta PCR una concentración de parásitos mayor a 10^6 resultó en una inhibición de la reacción.

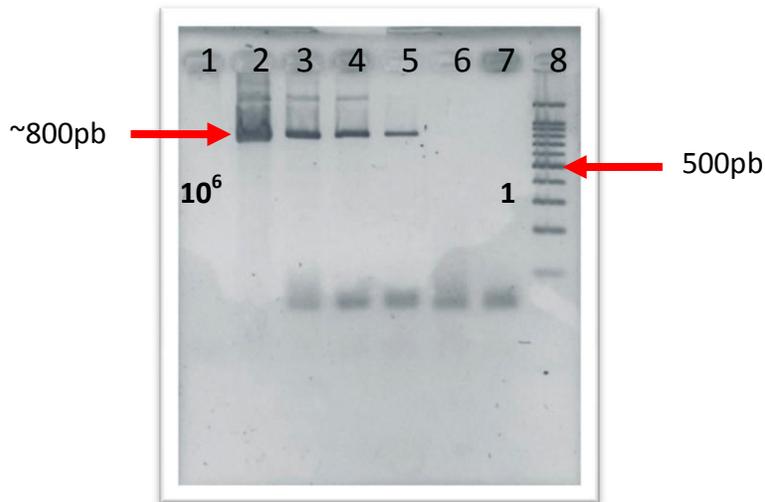


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la sensibilidad de la PCR directa. Para lo cual se empleó diluciones seriadas de un cultivo *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75. Carriles del 1 al 7, diluciones de ADN que corresponden al rango de 10^6 a 1 parásito, equivalentes a valores de 100ng a 100fg de ADN. Carril 8, marcador de peso Molecular de 100pb (BIORON, Alemania)

4.2.2 Sensibilidad de la PCR semianidada

La combinación de los 3 cebadores LINR4, LIN17 y LIN19 diseñados en las áreas conservadas del ADN del minicírculos del kinetoplasto, fueron testados para determinar su capacidad de aumentar la sensibilidad de la PCR estándar. En la figura 11 se observa el gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde fue determinada la sensibilidad con diferentes concentraciones de la cepa de *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75 que van desde 10^6 a 1 parásito que corresponde a valores de 100ng a 100fg de ADN. Se observa una mejora en la detección ya que con esta técnica es posible detectar la presencia de un solo parásito por reacción.

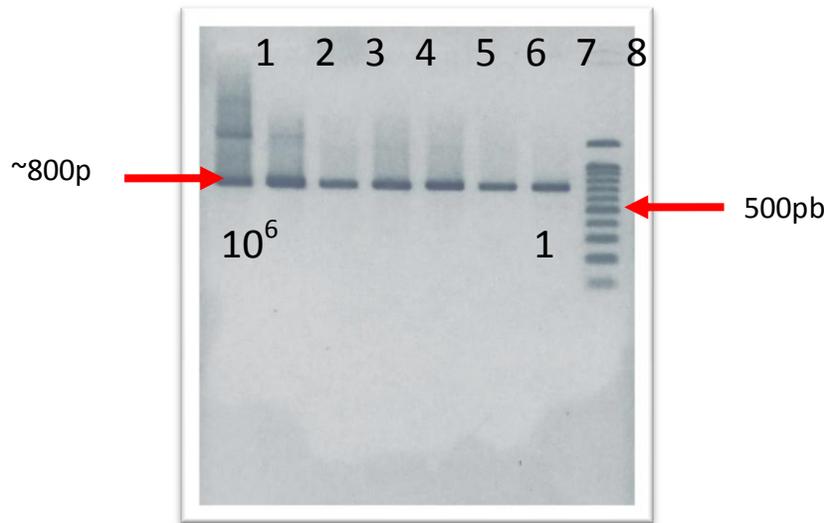


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la sensibilidad de la PCR semianidada. Para lo cual se empleó diluciones seriadas de un cultivo de *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75. Carriles del 1 al 7, diluciones de ADN que corresponden al rango de 10^6 a 1 parásito, equivalentes a valores de 100ng a 100fg de ADN. Carril 8, marcador de peso Molecular de 100pb (BIORON, Alemania)

4.3 Especificidad de las reacciones de PCR

La especificidad de las técnicas fue evaluada mediante la amplificación del ADN del kinetoplasto de 5 cepas de referencia que corresponden a distintas especies del género *Leishmania* y una cepa de referencia que corresponde a un género diferente el *Trypanosoma cruzi*.

4.3.1 Especificidad de las reacciones de PCR directa

Solo se observa el producto deseado en los carriles 1 y 2 que pertenecen a *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75 y *Leishmania donovani* MHOM/ET/1967/HU3, no encontrándose amplificación alguna con la cepa de *Trypanosoma cruzi* CL Brener.

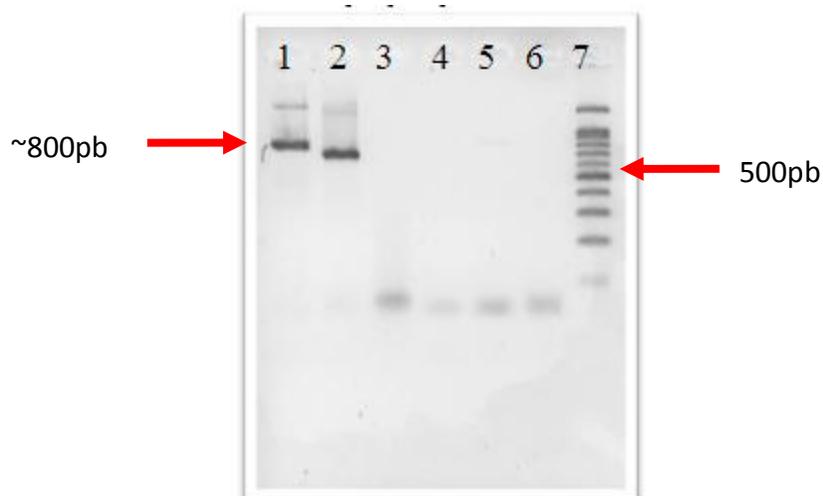


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la especificidad de la PCR directa. Carril 1 *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75, *Leishmania donovani* MHOM/ET/1967/HU3, *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8, *Leishmania mexicana* MHOM/BZ/1982/BEL21, *Trypanosoma cruzi* CL Brener Carril 7, marcador de peso Molecular de 100pb (BIORON, Alemania)

4.3.2 Especificidad de las reacciones de PCR semianidada

Se observa el producto deseado en las 5 especies de *Leishmania* analizadas: *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75, *Leishmania donovani* MHOM/ET/1967/HU3, *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8, *Leishmania mexicana* MHOM/BZ/1982/BEL21, y no encontrándose amplificación alguna con la cepa de *Trypanosoma cruzi* CL Brener.



Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la especificidad de la PCR semianidada. Carriles del 1 *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75, *Leishmania donovani* MHOM/ET/1967/HU3, *Leishmania brasiliensis* MHOM/BR/1975/M2903, *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8, *Leishmania mexicana* MHOM/BZ/1982/BEL21, *Trypanosoma cruzi* CL Brener. Carril 7, marcador de peso Molecular de 100pb (BIORON, Alemania)

4.4 Reacciones de PCR

4.4.1 PCR directa

La amplificación de los minicírculos del ADNk de *Leishmania* por PCR mediante los cebadores AJS31 y DBY, utilizando ADN obtenido a partir de cultivos o partir de muestras clínicas del huésped vertebrado. En total se obtuvo el producto deseado de aproximadamente 800pb en 35 muestras, las cuales corresponden a los 20 aislados en cultivo y 15 muestras biológicas de caninos.

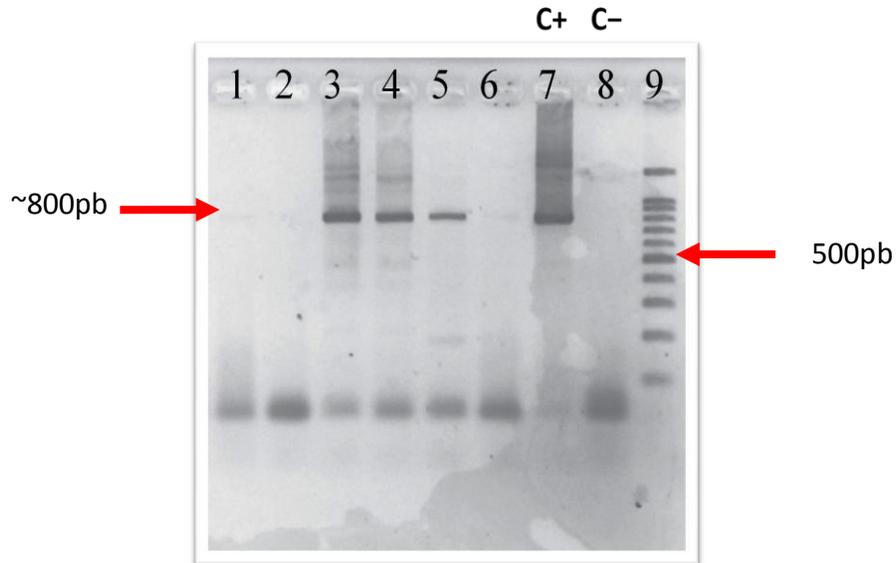


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR directa para la amplificación del minicirculos del ADNk de *Leishmania* con los cebadores AJS31 y DBY en muestras biológicas. Carriles 1,2,6, muestras donde no se obtuvo el producto de amplificación por falta de sensibilidad. Carriles 3,4,5, muestras biológicas donde se amplificó el producto esperado. Carril 7 Control positivo. Carril 8 Control negativo Carril 9 marcador de peso molecular de 100pb (BIORON, Alemania).

4.4.2 PCR semianidada

Gracias a la mejora en la sensibilidad con la PCR semianidada se logró la amplificación de los minicirculos ADNk de *Leishmania infamtun* de las 18 muestras biológicas restantes.

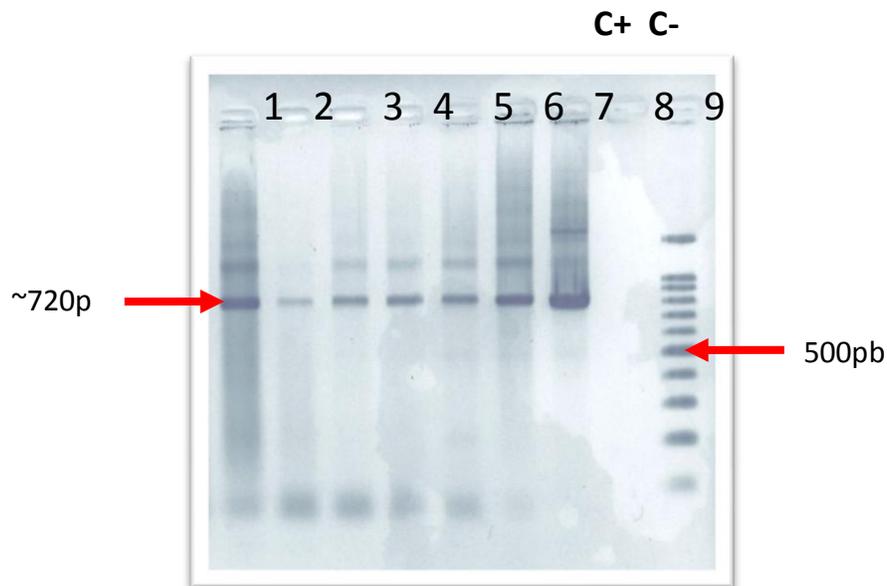


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra la PCR semianidada para la amplificación de los minicírculos del ADNk de *Leishmania infamtun* con los cebadores LINR4, LIN17 y LIN19 en muestras biológicas. Carriles 1,2,3,4,5,6, muestras donde se observa el producto esperado, Carril 7 control positivo, carril 8 control negativo, carril 9 marcador de peso molecular de 100pb (BIORON, Alemania)

4.5 Corte con la endonucleasa de restricción *RsaI*

Cada patrón de restricción resultante de las hidrólisis de los productos de los minicírculos del ADNk con la endonucleasa de restricción *RsaI*, permitió la determinación de un perfil que fue interpretado a través de un análisis cualitativo. En la tabla 7 se observan los perfiles encontrados.

4.6 Análisis de los geles con el programa *UN-SCAN-IT*

Cada perfil fue analizado con el programa *UN-SCAN-IT* con el fin de determinar del número de pares de base los fragmentos obtenidos en la digestión enzimática con *RsaI* de las diferentes muestras.

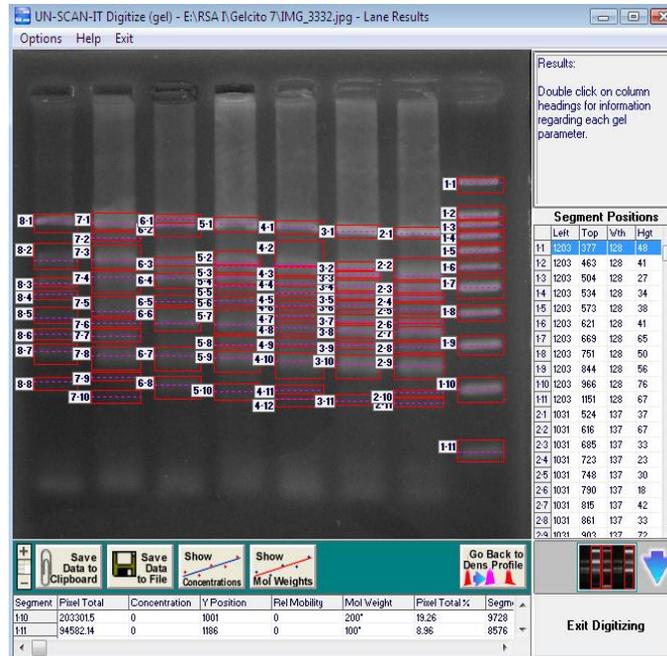


Figura 18. Análisis de un gel de agarosa al 3% con el programa UN-SCAN-IT que permite determinar el tamaño de las bandas obtenidas luego de la digestión del producto de PCR con *RsaI*.

4.7 Elaboración del dendograma

Un total de 12 bandas fueron puntuadas. Se puntuaron las bandas entre 200 y 700 pb. Bandas menores a 200pb son difíciles de distinguir, y pueden confundirse con dímeros de cebadores, y bandas superiores a 700pb, pueden confundirse con productos no digeridos. Un total de 19 perfiles fueron encontrados en las 53 muestras analizadas, observándose heterogeneidad genética en los patrones de restricción del minicírculos del ADNk de *L. infantum* tanto de muestras biológicas, en donde el parásito se encuentra en la forma amastigote, como en las formas promastigotes de los parásitos aislados en cultivo. Dos muestras no presentaron patrones de restricción por lo que no fueron empleados en la elaboración del dendograma.

Figura 19. Dendograma UPGMA construido con los datos de la tecnica PCR-RFLP del minicirculo del ADNk. Se muestra la distribución de los 19 perfiles encontrados en 53 muestras de *Leishmania infantum* estudiadas. Las muestras provenientes de caninos se muestran en rojo, las de humanos en verde y las de parásitos en cultivo azul.

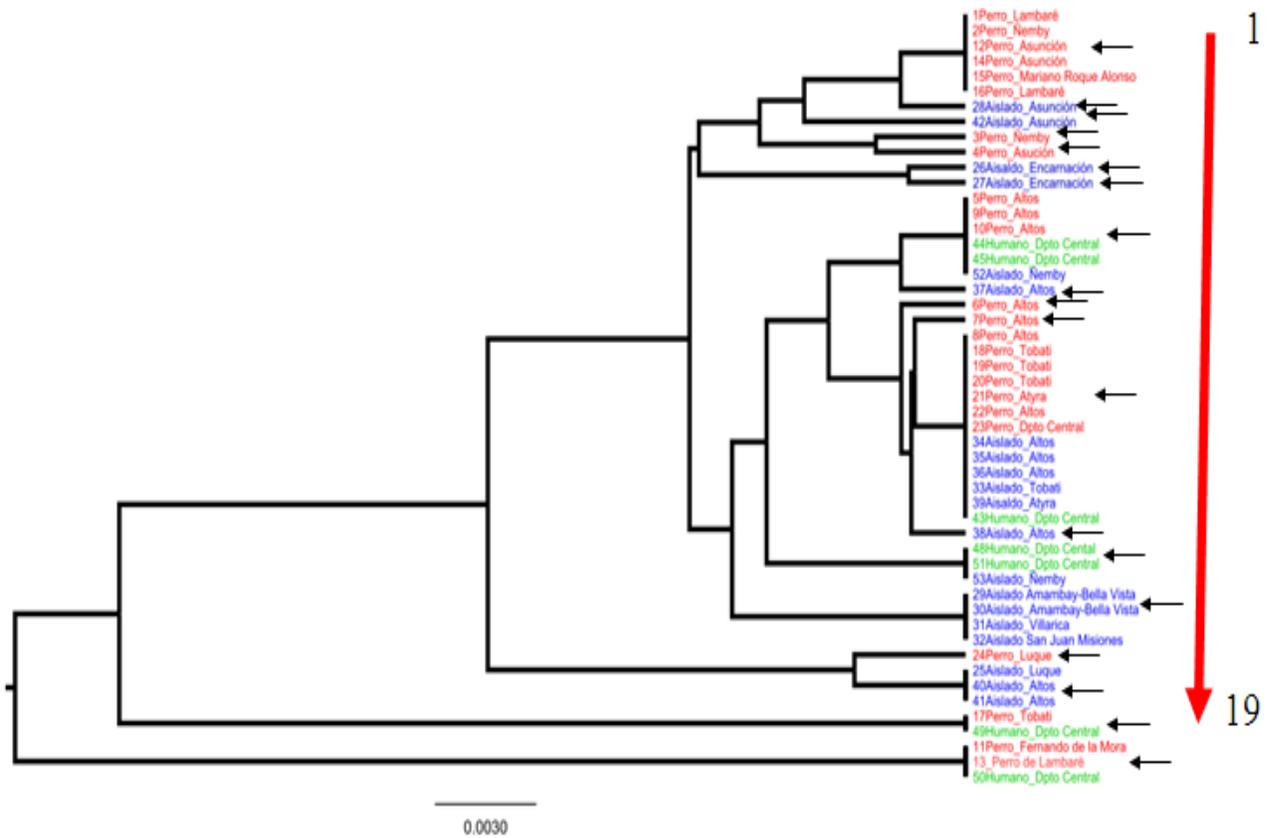
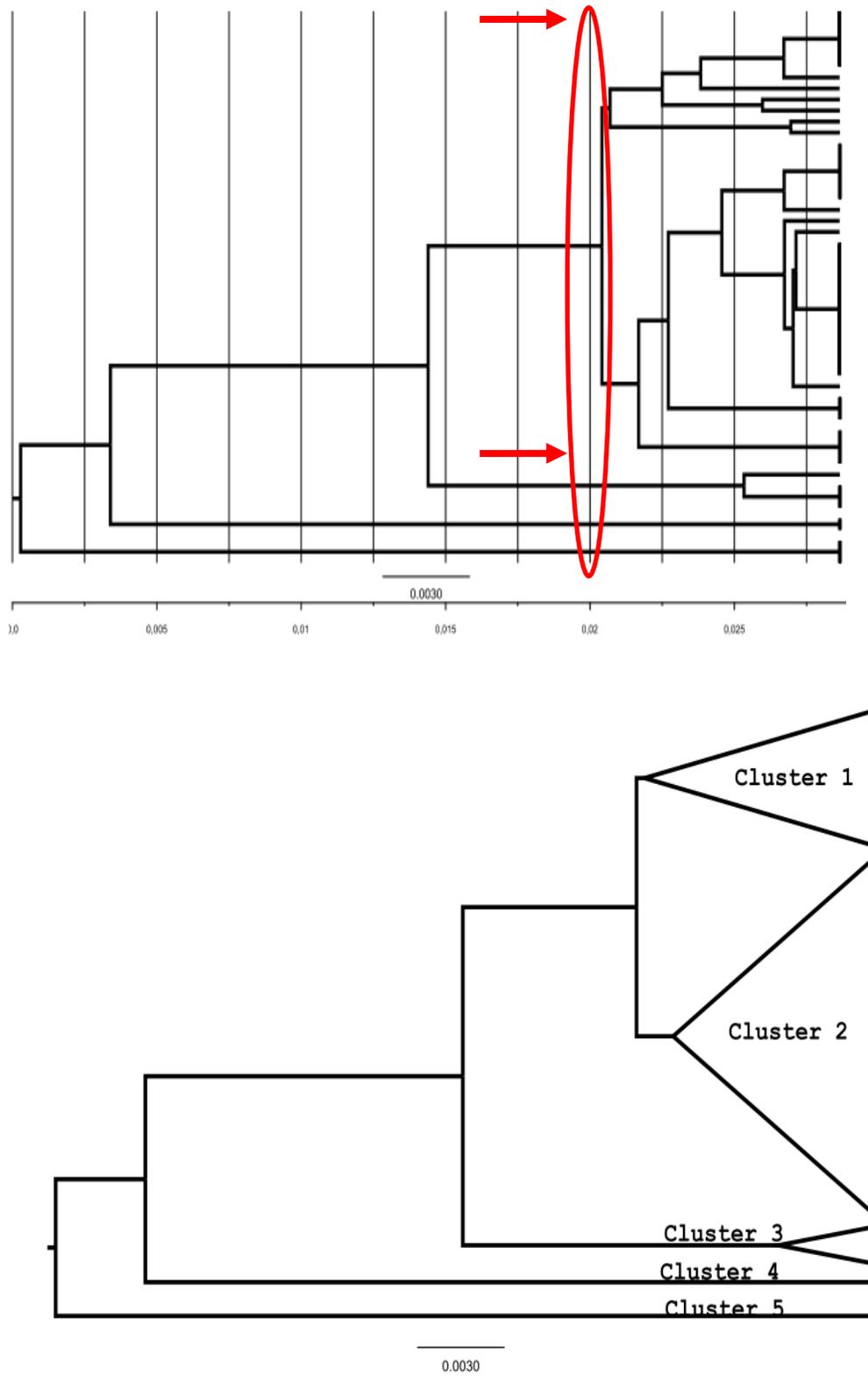


Figura 20. Dendograma *UPGMA* construido con los datos la técnica PCR-RFLP del ADNk, que muestra la línea vertical que señala el cambio de distancia más brusco y la resultante distribución en 5 *clusters* de las muestras de *Leishmania infantum* estudiadas.



Enzima	R50I																			Fragmentos puntuados		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX			
Fragmentos	700	700	700	700	700	700	700	-	-	-	-	-	700	700	-	-	700	-	-	700	700	
de Restricción	630	630	-	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630	-	-	630	-	630	630
	550	550	550	-	550	-	550	550	550	550	550	550	550	-	-	-	-	-	-	-	-	550
	520	520	520	520	520	-	-	520	520	520	520	520	520	520	520	520	520	-	-	520	-	520
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	490	490	490	490	-	-	490	-	-	-	-	-	490
	-	-	-	-	-	-	-	430	430	430	430	430	430	-	-	-	-	-	-	-	-	430
	390	390	-	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	-	-	-	-	-	-	-	-	390
	350	350	-	-	-	-	-	350	350	350	350	350	350	350	-	-	-	-	-	-	-	350
	310	-	310	310	310	310	-	-	310	310	310	310	310	-	-	-	-	-	-	-	-	310
	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	-	-	-	-	-	-	-	250
	220	-	220	-	-	-	-	-	-	220	-	-	-	-	-	220	-	-	-	-	-	220
	-	-	-	-	-	-	-	-	200	200	200	-	-	-	-	200	200	-	-	-	-	200

Tabla 5. Perfiles observados luego de la digestión con RcaI

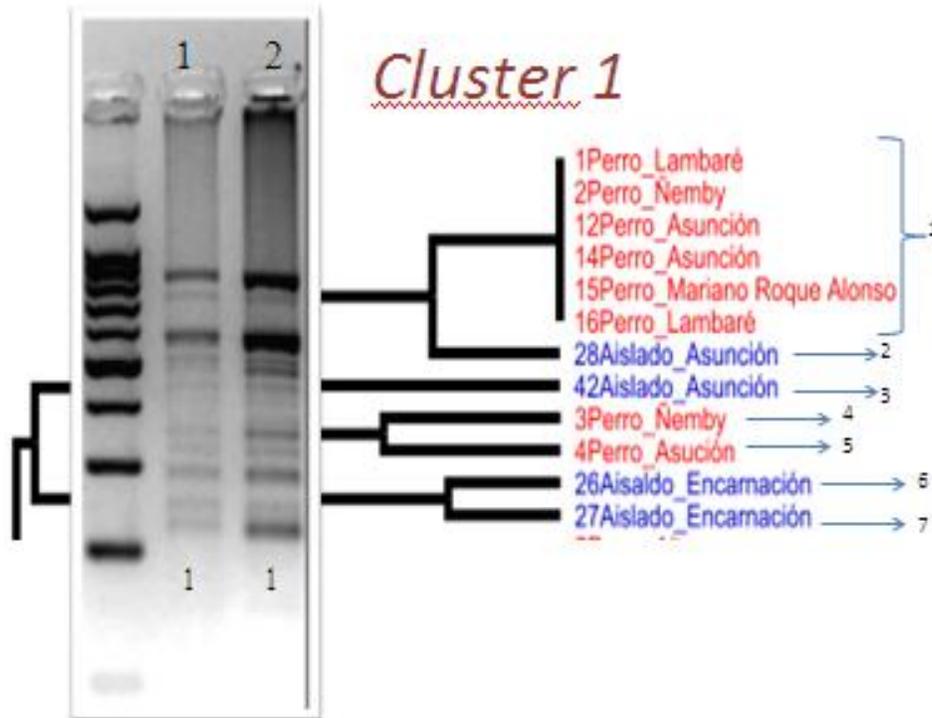


Figura 21. Fragmentos de restricción del ADNk digeridos con *RsaI* y separados en gel de agarosa al 3%. Carril 1 marcador de peso molecular de 100pb (BIORON, Alemania), carril 2 muestra 1, carril 3 muestra 2, que muestran el perfil 1. Este perfil fue el más observado en el *cluster* 1, que fue observado solo en muestras biológicas de caninos provenientes de Asunción y sus alrededores.

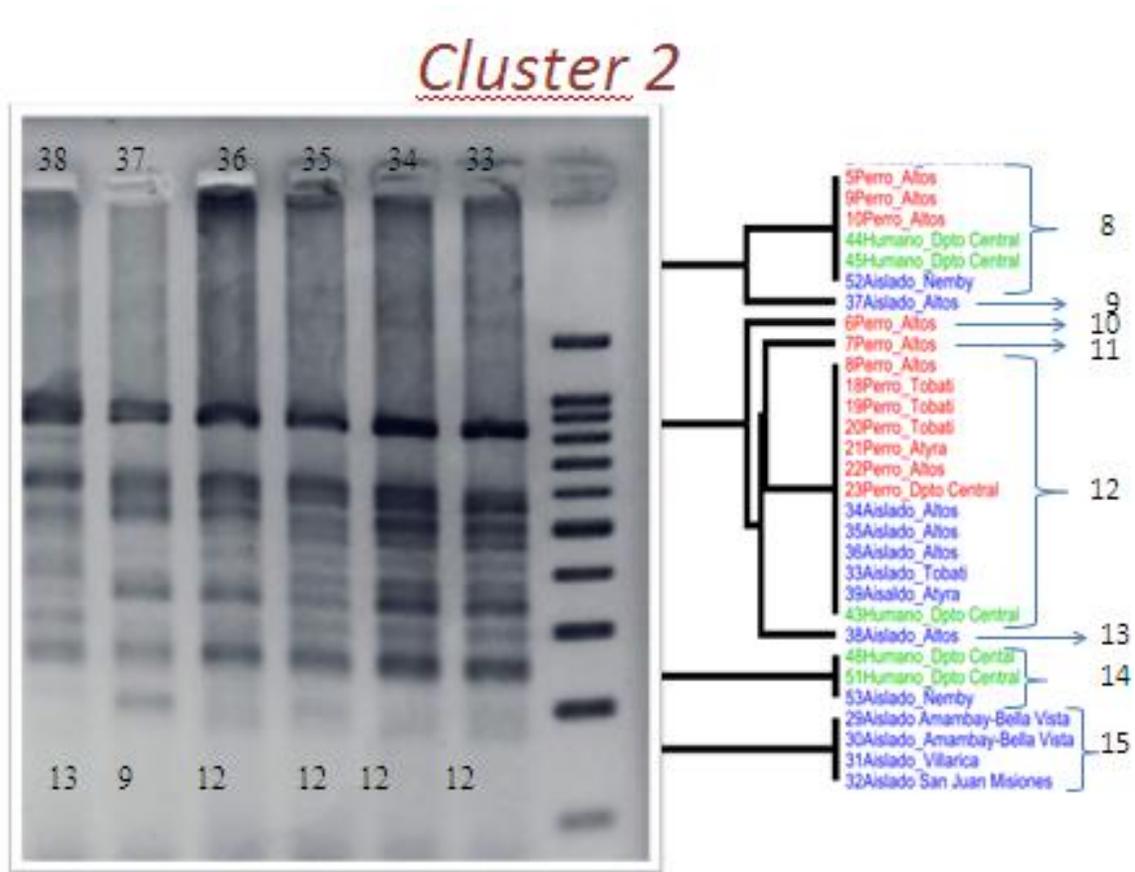


Figura 22. Fragmentos de restricción del ADNk digeridos con *RsaI* y separados en gel de agarosa al 3%. Carril 1 muestra 38 (perfil 13), carril 2 muestra 37 (perfil 9), carril 3 muestra 36 (perfil 12), carril 4 muestra 35 (perfil 12), carril 5 muestra 34 (perfil 12), carril 6 muestra 33 (perfil 12), carril 7 marcador de peso molecular de 100pb (BIORON, Alemania). Se observa los diferentes perfiles obtenidos en parásitos aislados en cultivo provenientes de la ciudad de Altos, demostrándose diversidad genética en los promastigotes de *Leishmania*.

Cluster 3,4,5

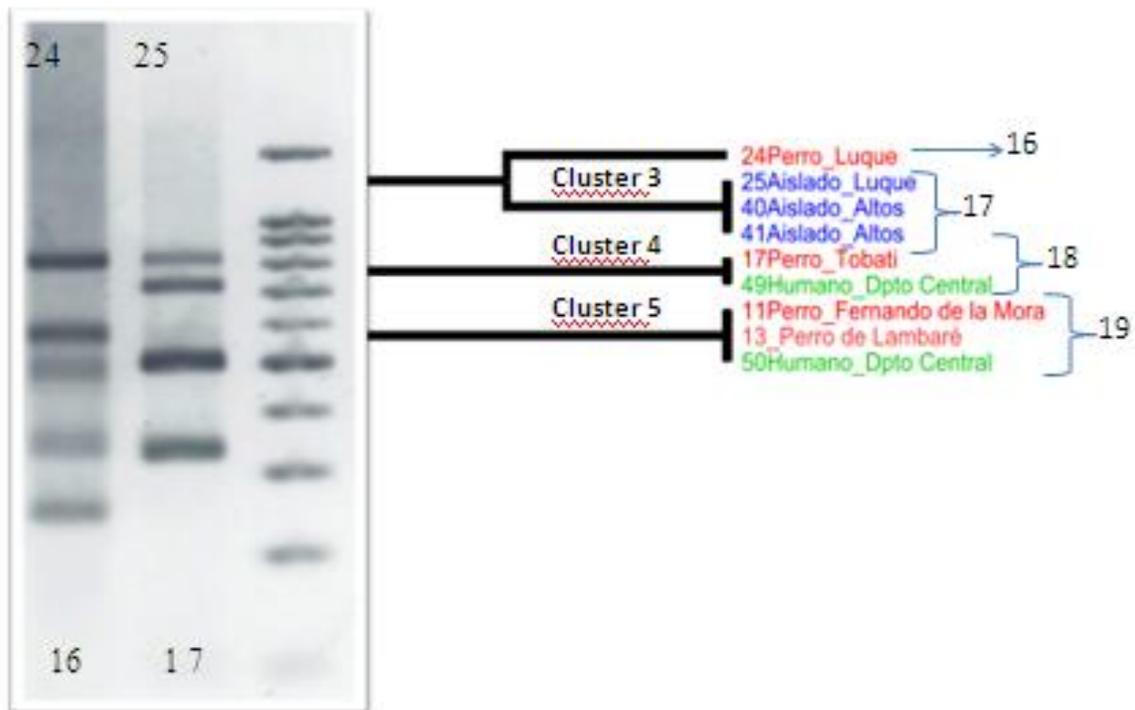


Figura 23. Fragmentos de restricción del ADNk de *Leishmania* digeridos con *RsaI* y separados en gel de agarosa al 3%. Carril 1 muestra 24 (perfil 16), carril 2 muestra 25 (perfil 17) carril 3 marcador de peso molecular de 100pb. BIORON, Alemania). La muestra 24 corresponde a una muestras biológica de perro proveniente de la ciudad de Luque, la muestras 25 es su correspondiente aislado de parasito en cultivo. Podemos observar claramente que la forma amastigote presente en la muestra biológica tiene un perfil diferente a la forma promastigote presente en el cultivo.

4.8 Frecuencias de los diferentes perfiles encontrados

Se calcularon las frecuencias relativas y absolutas de los 19 perfiles encontrados. Las dos muestras que no presentaron patrones de corte no se encuentran en la tabla.

Perfil	Frecuencias	
	F	f(%)
I	6	11,30%
II	1	1,90%
III	1	1,90%
IV	1	1,90%
V	1	1,90%
VI	1	1,90%
VII	1	1,90%
VIII	6	11,30%
IX	1	1,90%
X	1	1,90%
XI	1	1,90%
XII	13	24,50%
XIII	1	1,90%
XIV	3	5,70%
XV	4	7,50%
XVI	1	1,90%
XVII	3	5,70%
XVIII	2	3,80%
XIX	3	5,70%

Tabla 6. Frecuencia absoluta (F) y relativa (f%) de los perfiles genotípicos encontrados en la población de parásitos analizados

5. DISCUSSION

5. DISCUSION

La transmisión de la leishmaniosis es endémica en 98 países, tanto en el viejo mundo (Oriente y el Norte de África, Oriente Medio, Asia y Europa del Sur) como en el nuevo mundo (América del Sur y Central). Sólo para la LV la prevalencia mundial es de aproximadamente 13 millones de personas infectadas con una incidencia de al menos 500.000 nuevos casos por año(69,70,73,82–84). La LV por ser considerada entre las más graves de las leishmaniosis, con una alta tasa de mortalidad, despierta un gran interés entre los taxonomistas el desarrollo de métodos no solo de tipificación para la diferenciación de las distintas especies, sino también para estudiar la variabilidad genética, que podrían permitir hasta la identificación de nuevas especies (85).

En América Latina, el principal agente etiológico de la LV es *L. infantum*, la transmisión se produce fundamentalmente a través de un ciclo zoonótico, los perros domésticos son el reservorio principal y el hombre como huésped accidental (2,29,63,65,83,86).

Está demostrado que la LV producida por *L. infantum* es endémica en nuestro país especialmente en Asunción, departamento Central y Cordillera, en donde se observa una elevada seroprevalencia en el reservorio principal, el perro doméstico (16,18,65). Surge entonces la necesidad de aumentar los conocimientos sobre las diferentes poblaciones de parásitos que circulan en nuestra región, para comprender con más profundidad su comportamiento biológico y sobre todo su patrón epidemiológico. Las técnicas basadas en PCR son las que a diferencia de otras metodologías moleculares, permiten la aplicación de enfoques más sensibles aportando una mejor evaluación de la diversidad genética de los microorganismos, y en nuestro caso *Leishmania*.

MON-1 es el zimodema de *L. infantum* más prevalente, y representa aproximadamente al 70% de las cepas de *Leishmania* identificadas. Estudios epidemiológicos sobre la LV causada por *L. infantum* requieren el uso de técnicas que son capaces de diferenciar las cepas MON-1. Los primeros indicios de heterogeneidad en cepas MON-1 fueron sobre la base de los análisis RAPD, el análisis de tres marcadores de microsatélites, PCR-RFLP de las regiones intergénica *cpb* y intragénica *gp63* y el análisis de RFLP de ADNk del minicírculo (19).

En el presente trabajo se estandarizó una técnica de caracterización molecular del parásito, ya que los métodos de diagnóstico no permiten determinar diferencias entre los parásitos encontrados, y si bien la caracterización enzimática es el método estándar para este fin, las técnicas basadas en biología molecular que tienen como blanco el ADN del microorganismo son muy utilizadas, y permiten una caracterización del parásito más rápida y con menos costo. Además en nuestro país existen muy pocos estudios de caracterización isoenzimática de las cepas de *Leishmania*, puesto que es necesario cultivar el parásito y no es posible su aplicación de manera rutinaria en nuestro país, además ya se ha demostrado la heterogeneidad genética dentro de un mismo zimodema(19,51,69).

Se analizaron 24 muestras de perros, 9 muestras de humanos y 20 aislados de parásitos en cultivo provenientes de casos de LVC, con el fin de buscar heterogeneidad genética utilizando como blanco molecular el ADN de los minicírculos del kinetoplasto y por medio de la técnica PCR-RFLP, con el fin de comparar entre sí los perfiles encontrados en los humanos, considerado el huésped, y en los perros, considerado como el reservorio, en los cuales el parásito se encuentra en su forma amastigote; de los perfiles encontrados en los parásitos aislados en cultivo donde lo encontramos en su forma promastigote. El ADNk ha

sido utilizado como blanco molecular en técnicas de diagnóstico, identificación (54,60,75,87–90) y genotipificación (3,11,23,29,50,51,73–75,91) en las diferentes especies de *Leishmania*, gracias a sus grandes ventajas: alta sensibilidad debido a que existen aproximadamente 10.000 copias de los minicírculos del ADNk en un solo parásito, presenta un elevado poder discriminatorio, es rápido, no es muy costoso y permite que la genotipificación se realice directamente del material biológico sin la necesidad de cultivar el parásito (6,28,29,73,75,87).

Se utilizó una PCR directa para amplificar la región variable de los minicírculos del ADNk de los parásitos aislados en cultivo empleando los cebadores AJS31 y DBY con los cuales se obtiene un producto de amplificación de aproximadamente 800pb. Con el mismo fin se emplearon estos cebadores para amplificar la región variable del ADNk del minicírculo de *Leishmania* en muestras biológicas, pero no se logró amplificar el producto deseado en todas las muestras, por lo que se procedió a utilizar una variante de la PCR con el objeto de mejorar la sensibilidad, una PCR semianidada empleando 3 cebadores LINR4, LIN17 y LIN19 y una reacción en un solo tubo, que también permite la amplificación de la región variable del ADNk del minicírculo de *Leishmania* (60). Con la sensibilidad de la PCR semianidada fuimos capaces de detectar el ADN correspondiente a un parásito equivalente (100fg de ADN). En la práctica al tratar con muestras biológicas, esta mejora en sensibilidad se puede ver afectada por la presencia de ADN exógeno, ya sea humano, de perro o de flebótomo, cuando trabajamos directamente con muestras clínicas (3). Debido a la alta sensibilidad encontrada en esta variante de la PCR se propone su utilización de rutina para la detección del género *Leishmania* en muestras biológicas de huésped,

reservorios, y también en vectores, como ya viene siendo propuesto por varios autores (15,60).

También se determinó la especificidad de la técnica, encontrándose que los cebadores AJS31 y DBY solo amplifican el minicírculo del ADNk del complejo *L. donovani*, pues solo hubo amplificación con las especies pertenecientes al complejo *L. donovani* (especies *L. donovani* MHOM/ET/1967/HU3 y *L. chagasi* MHOM/BR/1974/PP75). En cambio con los cebadores LINR4, LIN17 y LIN19 se logró amplificar ADN del kinetoplasto de cinco especies de *Leishmania*, pertenecientes a diferentes complejos; del complejo *L. donovani* (especies *L. donovani* MHOM/ET/1967/HU3 y *L. chagasi* MHOM/BR/1974/PP75), del complejo *L. mexicana* (especies *L. mexicana* MHOM/BZ/1982/BEL21 y *L. amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8) y del complejo *L. braziliensis* (especie *L. braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903). Las pruebas de especificidad de género se realizaron empleando ADN de *Trypanosoma cruzi* CL Brener no observándose producto de amplificación alguno. En algunas muestras biológicas se observa una banda inespecífica mayor a 800pb, pero se trataba de una banda muy débil por lo que no represento un problema en el análisis de los diferentes perfiles.

La caracterización molecular mediante la amplificación de los minicírculos del ADNk y su posterior digestión con *RsaI* reveló la presencia de 19 perfiles distintos en las muestras analizadas, separándose las mismas en 5 *clusters*. Algunos de los patrones observados son muy complejos observándose hasta 11 fragmentos y otros bastantes más sencillos con solo 2 fragmentos. Unos perfiles se observaron con mayor frecuencia en muestras biológicas y otros en aislados de parásitos, pero se encontraron perfiles que eran compartidos por ambos tipos de muestras.

En el *cluster* 1 se encuentran 7 perfiles diferentes, donde se agruparon 12/53 muestras, de las cuales 4 corresponden al parásito aislado en cultivo y los 8 restantes correspondieron a muestras de perros. Cabe destacar que el perfil 1 fue el más observado dentro de este *cluster* siendo también uno de los más frecuentes (frecuencia relativa del 11,3%), ya que incluyó a 6 de las 12 muestras, además de agrupar solo a parásitos encontrados en muestras de caninos, provenientes tanto de Asunción y como de sus alrededores: Lambaré, Mariano Roque Alonso, Ñemby. Los perfiles 2 y 3 corresponden a parásitos aislados de Asunción. En este *cluster* se observa algo peculiar, pues también se analizaron los parásitos en cultivo pertenecientes a dos muestras de perros, la muestra 2 (perfil 1) y la muestra 3 (perfil 4), que corresponden a los aislados 52 (perfil 8) y 53 (perfil 14) respectivamente, el perfil observado en estos aislados cayeron en el *cluster* 2, un *cluster* diferente a las muestras que le dieron origen, indicando que podría existir una selección clonal en los cultivos, pues no presentan el mismo patrón de restricción al comparar los patrones de la forma amastigote con la forma promastigote. El perfil 6 y 7 corresponde a 2 aislados de Encarnación, que se agrupó en este *cluster* a pesar de que provienen de una región distante a la de las demás muestras del mismo *cluster*. Pero es común que, el perro doméstico, sea trasladado de un lugar a otro en el país, por lo que además es factible la dispersión de las variantes genéticas en diferentes regiones del país.

En el *cluster* 2 se incluye a la mayoría de las muestras analizadas 23/53, que incluye tanto a muestras de humanos, perros y aislados en cultivo, con 8 perfiles distintos. El perfil 8 agrupa a muestras de perros provenientes de la zona de Altos, departamento de Cordillera y humanos del departamento Central, lo que sugiere la confirmación del patrón de transmisión ya conocido, debido a que estas dos regiones no son muy distantes

geográficamente, este hallazgo también se ha encontrado en otros trabajos, este hallazgo ya ha sido visto en trabajos como el de Lopes et al en 1984, donde se comparan los perfiles de esquizodermos de un foco de *L. infantum* en Brasil y se encuentran que la cepa de parásito que circulaba tanto en humano como en el perro presentaban el mismo perfil (54). Segatto et al en 2012, en donde otras técnicas moleculares como el RADP, que permiten comparar perfiles en parásitos de humanos y caninos, obtienen así patrones indistinguibles procedentes de ambos tipos de muestra, lo que ponen en evidencia la importancia del canino el ciclo biológico de *Leishmania* (11).

El perfil 9 corresponde a un aislado del parásito en cultivo de la ciudad de Altos. Los perfiles 10 y 11 corresponden también a parásitos de muestras de perros de la zona de Altos. El perfil 12 es el más frecuente, en general 13/53 con una frecuencia relativa de 24,5% agrupando a muestras provenientes en su mayoría de la zona de Altos y Tobatí ambas ciudades localizadas en el mismo departamento. El perfil 13 corresponde a un aislado proveniente de Altos. El perfil 14 corresponde a dos parásitos aislados de humanos y el perfil 15 perteneciente a este *cluster* solo se observó en parásitos aislados en cultivo pero lo interesante es que estos provenían de regiones diferentes a la del departamento Central.

El *cluster* 3 presenta 2 perfiles distintos y agrupa solo a 4/53 muestras. En el perfil 16 encontramos a un parásito proveniente de un perro de Luque y en el perfil 17 se agrupó al parásito aislado en cultivo de este perro, lo que confirma una vez más que existen diferencias entre en las secuencias del ADNk de los micicirculos de *Leishmania* encontrados en el huésped de los encontrados en cultivo, esta cercanía permitiría sugerir una vez más la selección clonal del parásito en el cultivo. Aunque para asegurar esto son

necesarios más estudios, es necesario conocer la estabilidad temporal de los clones, diversos experimentos del parásito cultivado in vitro y mantenido en animales o en materiales del paciente sugieren que los patrones de restricción son estables por lo menos por varios años (3,27,54).

El *cluster* 4 agrupa al perfil 18 con dos muestras de parásitos, una correspondiente a un perro de la ciudad de Tobatí y el otro a un humano del departamento Central. El *cluster* 5 agrupa al perfil 19 con tres muestras, dos correspondientes a perro, uno de Fernando de la Mora y el otro de de la ciudad de Lambaré, y el otro a un humano del departamento Central. En ambos casos son perfiles observados en perros y humanos lo que permite sugerir una vez más la relación epidemiológica entre estos dos tipos de huésped.

A pesar de que esta observación no es muy estricta se puede decir que hay una tendencia a la agrupación de los parásitos con respecto a la región geográfica de origen, probablemente se podría realizar una mejor agrupación de los perfiles, analizando estas muestras con otras enzimas de restricción que permitan verificar las agrupaciones observadas con la enzima *RsaI*. Esta observación también es resaltada en otros trabajos, donde las muestras se agrupan de acuerdo a su origen geográfico como el del Segatto et al 2012 que agruparon a cepas de *L infantum* (11), y Cupolillo et al. 2003 utilizaron PCR-RFLP en *L. braziliensis* y observaron que la mayoría de los genotipos se asociaron con áreas geográficas específicas (92).

La técnica de PCR-RFLP ha revelado una gran variabilidad entre las cepas estudiadas, tanto de muestras biológicas de perro, como humanas y aislados de parásitos en cultivo. A diferencia del estudio de Alonso et al 2010 en Teresita (Brasil) (29), en el cual, los aislados de parásitos en cultivo mostraron una fuerte tendencia de agrupamiento hacia un perfil

específico, nosotros observamos que los aislados de parásitos en cultivo se hallan distribuidos en 3 de los 5 *clusters* encontrados, con perfiles diferentes.

Con respecto a los perfiles predichos con las 51 secuencias obtenidas de la base de datos del *Genbank* al comparar con los perfiles resultantes de este estudio, se puede ver con facilidad que los patrones resultantes son mucho más complejos y hay un número mayor de sitios de corte. Esto es debido a que en la muestra tenemos una población de parásitos, cada uno con 10.000 copias de los minicírculos de ADNk con secuencias similares pero no idénticas (23,28,75,93) donde podrían estar amplificándose más de una secuencia, al menos las secuencias más predominantes; el número pronosticado de clases de minicírculo es de más de 60 para el género *Leishmania* (28). Esta suposición queda comprobada, cuando se purifica el producto de amplificación de los minicírculos del ADNk y se somete a un proceso de secuenciación, los electroferogramas resultantes presentaron un alto grado de nucleótidos indeterminados, debido a lo mencionado anteriormente que no todas las aproximadamente 10000 copias del minicírculo no presentan exactamente las mismas secuencias, para solucionar este problema lo que se sugiere es un proceso de clonación previo a la secuenciación, lo que permitiría seleccionar la secuencia del minicírculo predominante (3,27,94–96).

Otra razón importante por la que los perfiles resultantes fueron muy diferentes a los predichos es que, las 51 secuencias de la base de datos del *Genbank* pertenecen a cepas encontradas en regiones diferentes, a la nuestra, como Europa y lo que se espera es encontrar perfiles diferentes. A pesar de estas diferencias, hubieron fragmentos que coincidieron con los encontrados en Paraguay como los fragmentos de 520pb, 490pb, 430pb y 250pb, además de dos muestras de humanos (46 y 47) que no fueron incluidas en

la construcción del dendograma, pues no presentaron ningún patrón de corte de manera similar a la muestra de referencia *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1974/PP75, pero esto si concuerda con el análisis de los sitios de corte de secuencias completas del ADN del minicírculo de *Leishmania* encontradas en el *GenBan*; algunas de ellas tampoco presentaban sitios de corte para esta enzima en particular.

Otra de las técnicas más prometedoras para la caracterización molecular es la utilización de marcadores microsatélites. Según otros trabajos, al aplicar la técnica del ADNk-PCR-RFLP junto con la de microsatélites en la misma población se obtienen resultados comparables o incluso mejores, o una mejor agrupación de las diferentes cepas. En un estudio con 25 cepas de *L. infantum* obtenidas de perros y humanos de tres focos de transmisión de la LV en España, las dos técnicas que permitieron una mejor diferenciación de las cepas estudiadas fueron las mencionadas anteriormente (69). La PCR-RFLP del minicírculo del ADNk fue la más discriminatoria mostrando 21 patrones diferentes para las 25 cepas analizadas con una sola enzima (*RsaI*). Para los 15 marcadores microsatélites evaluados se observaron diferencias entre uno y siete alelos para cada marcador, y 20 diferentes perfiles entre las 25 cepas analizadas (69). En el trabajo en Teresita (Brasil)(29) al aplicar la PCR-RFLP del ADNk a 40 muestras y un panel de 17 marcadores microsatélites, se observó en este último, una variabilidad muy baja con un solo marcador polimórfico, en el cual solo se identificaron dos alelos mientras que en la PCR-RFLP se diferenciaron 12 perfiles. La baja diversidad genotípica encontrada en estos estudios con marcadores de microsatélites, sobre todo en el Brasil, como los de Ferreira et al 2012 (97) donde fue analizada la estructura poblacional a través de 14 marcadores microsatélite de cepas de *L. infantum* aisladas de humanos y perros en su mayoría de estados endémicos del Brasil y del Paraguay, en este

estudio encontraron una baja diversidad genética, tres poblaciones fueron identificadas en el análisis de *cluster* la población POP1 fue la más observada en Brasil y fue la única población que se encontró en las cepas estudiadas del Paraguay. Esto se explica a través de diversos factores como ser que las muestras provienen de regiones geográficas no muy distantes, lo que podría presentarse en nuestro país por ser pequeño, y los trabajos que hablan de gran variabilidad genotípica y heterogeneidad genética por microsatélite utilizan muestras originarias de África, Europa y Asia, donde se cree que los parásitos surgieron mucho antes, millones de años atrás que en América donde se cree que el parásito fue introducido hace unos 500 años con la colonización europea (8,10,83), esta distancia cronológica podría limitar la utilización de marcadores moleculares con blancos en el ADN genómico, pero la PCR-RFLP del kinetoplasto parece extremadamente útil y eficaz para distinguir linajes de *Leishmania* muy próximos entre sí.

Estudios revelan que la PCR-RFLP del ADNk permite diferenciar entre recidivas y re infecciones (3,27), esto sobre todo es importante en pacientes con algún tipo de patología de base como en el caso de los pacientes con VIH. La co-infección *Leishmania*/VIH es un problema de salud pública que afecta sobre todo a países del continente Europeo, este cambio en el patrón epidemiológico lo convierte a *Leishmania* en un parásito oportunista en la población con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, población que por su estado inmunológico pueden adquirir con mayor facilidad la LV; entonces la reactivación de una infección anterior, estaría causado por el mismo parásito, mientras que una re-infección estaría causado por parásitos diferentes, lo que podría llevar a la adquisición de cepas más agresivas en esta nueva infección, lo cual afectaría en el tratamiento, por lo tanto puede ser importante detectar una diferencia entre recidiva y re-infección. (3,27,35,71)

Con esta técnica se han realizado estudios para diferenciar a cepas resistentes al tratamiento con antimoniales, que representa la primera línea de tratamiento para la leishmaniosis, junto a cepas de parásitos sensibles, debido a que el fenómeno de resistencia a las drogas de tratamiento es uno de los factores que más preocupa a nivel mundial por la emergencia que podría causar en esta enfermedad, además de ser todavía un fenómeno poco entendido y principalmente debido a la limitación en el número de drogas eficaces contra esta enfermedad (71,84).

Ya se describen casos de coinfección VIH/*Leishmania* en nuestro país (42,43) y aunque todavía no se ha demostrado resistencia a drogas de primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis, las cifras de pacientes con VIH y el tratamiento indiscriminado de perros por parte de los veterinarios, que emplean las mismas drogas utilizadas para el tratamiento en humanos, podría desencadenar en cualquier momento fenómenos de resistencia a drogas. Esta herramienta puede ser útil para desarrollar un monitoreo de casos futuros, permitiendo detectar un cambio en el perfil genético de los parásitos circulantes en un brote.

En próximos estudios se podrían incluir muestras de flebótomos o aislados de flebótomos, para determinar cuáles son los perfiles del minicírculo del ADNk que se observa en los mismos, para así completar el ciclo biológico.

La literatura habla además de infecciones asintomáticas y se reporta que la evolución de infección a enfermedad dependería de múltiples factores tales como la susceptibilidad del huésped, características genéticas y el estado nutricional (88). Detectar el parásito por técnicas moleculares en estos huéspedes asintomáticos, y posteriormente reproducir los perfiles de los minicírculos del ADNk de los mismos, tendría implicancias muy importantes en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se tiene como perspectivas futuras, confirmar los perfiles encontrados realizando la secuenciación del minicírculo del ADNk para lo cual es necesaria una clonación previa. Además es fundamental seguir comparando los perfiles encontrados cuando el parásito está presente en la muestra biológica con su correspondiente aislado en cultivo, para confirmar la selección clonal.

La otra especie de *Leishmania* de importancia epidemiológica en nuestro país es *L. braziliensis* que es el responsable de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea, a diferencia de *L. infantum*, el cual se caracteriza por producir casos esporádicos, *L. braziliensis* se caracteriza por producir brotes, utilizar la técnica ADNk-PCR-RFLP para evaluar el comportamiento de la variabilidad genética sería de gran ayuda para establecer la relación epidemiológica entre las cepas que producen el brote. Esta técnica podría utilizarse para monitorear nuevos brotes, diferenciar recidivas de reinfecciones y estudiar los parásitos detectados en co-infecciones principalmente con VIH.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. Se demostró que existe una variabilidad genética en las cepas de *L. infantum* circulantes en nuestro país.
2. Los diferentes perfiles encontrados permitió el cálculo de las distancias genéticas entre los parásitos estudiados, lo que permitió la elaboración del dendograma correspondiente.
3. Esta técnica permitió agrupar variantes genéticas de *L. infantum*
4. Si bien el número de muestras fue pequeño, se encontraron perfiles en muestras de humanos y caninos que indica que existe una relación epidemiológica entre los mismos.
5. Se observaron perfiles diferentes entre muestras biológicas y sus aislados en cultivo, lo que demuestra que las formas amastigotes presentan perfiles diferentes a las promastigotes y sugiere estudiar al parásito presente en la muestra biológica.

7. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Atias A. Parasitología, Médica. 1ra ed. Santiago, Chile: Mediterráneo; 1998.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004;27(5):305–18.
3. Morales Hernández MÁ. Epidemiología molecular de la coinfección por *Leishmania*-VIH [Tesis doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid; 2004.
4. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 2000;30(12-13):1269–81.
5. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE.* 2012 may 31;7(5):e35671.
6. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology.* Academic Press; 2007. p. 1–458.
7. Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, Classification and Geographical Distribution.* Academic Press; 1987.
8. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 jun;5(6):e1155.
9. Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today (Regul. Ed.).* 2000 may;16(5):188–9.
10. Leblois R, Kuhls K, François O, Schönian G, Wirth T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infect. Genet. Evol.* 2011;11(5):1091–5.

11. Segatto M, Ribeiro LS, Costa DL, Costa CHN, Oliveira MR de, Carvalho SFG, et al. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2012;107(1):39–47.
12. Leishrisk, Bridging Research and Leishmanianis Control [Internet]. Available a partir de: <http://www.leishrisk.net/>
13. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors. 2009;2.
14. Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. Vet. Parasitol. 2011;176(2-3):101–11.
15. Rassi Y, Azizi K, Motazedian MH, Javadian E, Rafizadeh S, Fakhar M, et al. The Seminested PCR Based Detection of *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in a New Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Iran. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2007;1(1):38–42.
16. Canese Krivoshein AP, Morel Ayala ZR, Martínez Gamba JD, Tonina Senes AJ, Torres Heisecke R, Sanchez Zarza S, et al. Prevalencia de leishmaniasis visceral Humana y canina en la ciudad de Lambaré, Paraguay; Humana and canine visceral leishmaniasis in Lambaré city, Paraguay. An. Fac. Cienc. Méd. (Asunción). 1999;32(1/2):42–74.
17. Fernandes J, Charry T, Bello F, Escobar J, Lozano C, Ayala M et al. Prevalencia de Leishmaniosis Visceral Canina en Municipios de Huila – Colombia 1. Rev de Salud pública. 2002;4(3):278–85.
18. Canese A. Leishmaniosis visceral canina en el area metropoli- tana de la «Gran Asunción», Paraguay. Medicina. 2000;60(Supl III).
19. Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, et al.

Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(7).

20. Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1994;89(3):471–8.

21. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitol. Today (Regul. Ed.). 2000 abr;16(4):142–4.

22. Martines H. Actividad tóxica de Hidroxiurea en un modelo in vitro de infección por *Leishmania mexicana* [Tesis doctoral]. [Mexico, DF]: Inst. Nacional de Perinatología.; 2009.

23. Jiménez MI. Variabilidad de *Leishmania (Leishmania) infantum* en España. [Tesis doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid; 1994.

24. Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LR, Naiff MF, Pereira LO, Oliveira-Neto MP, et al. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmania parasites. Med. Microbiol. Immunol. 2001;190(1-2):57–60.

25. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. Genome Res. 2011 dic;21(12):2129–42.

26. Kazemi B. Genomic organization of *Leishmania* species. Iran J Parasitol. 2011;6(3):1–18.

27. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. J. Infect. Dis. 2002;185(10):1533–7.

28. Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. J. Clin. Microbiol. 1999;37(5):1656–7.
29. Peres D, Lamounier D, Lopez I, Nery C, Martins P,. Short Report:Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresita (Brazil). The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2010;82(5):819–21.
30. Rougeron V, De Meeûs T, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls A-L. «Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)» in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. PLoS Pathog. 2010;6(8):1–5.
31. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(7):2414–8.
32. Tibayrenc M. Clonality in *Leishmania*. Parasitol. Today (Regul. Ed.). 1993;9(2):58.
33. Jiménez M, Alvar J, Tibayrenc M. *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. AIDS. 1997 abr;11(5):569–73.
34. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science. 2009 abr 10;324(5924):265–8.
35. 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(2):298–319.
36. Canese J. Gran incremento de Leishmaniasis visceral humana en Paraguay.

Pediatr.(Asunción). 2010;37(3):167–8.

37. Torales MR 1 , Martínez NJ 2 , Franco L. Phlebotominae (diptera: psychodidae) y especies consideradas como vectores de leishmaniosis en Paraguay. Rev.parag.epidemiol. 2010;Vol. 1 (1):33–5.

38. Torales M 1 , Martínez N 2 , Franco L. 2. Variación estacional de *Lutzomyia longipalpis* B° Kennedy - Lambaré. Rev.parag.epidemiol. 2010;Vol. 1 (1):36–41.

39. Servicio Nacional de Erradicación de Enfermedades Vectoriales (SENEPA-MSP Y BS) Manual de diagnóstico y tratamiento de las Leishmaniosis. Asunción 2011.

40. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis Visceral en las Américas. Informe final de expertos de OPS/OMS. Sao Paulo 2005.

41. Servicio Nacional de Erradicación de Enfermedades Vectoriales (SENEPA-MSP y BS) Boletín Informativo Semanal. Semana Epidemiológica 47.Noviembre 2011.

42. Velazquez D, Taboada A, Benitez G, Samaniego S, Valdez R, Armoa A, Molas C. Hallazgos de *Leishmania* en Médula ósea con RK negativo en pacientes con VIH-SIDA. Rev. Inst. Med. Trop. Vol 6 (Suplemento);Noviembre 2011.

43. Isfran I, Penayo A, Taboada A, Benítez G. Leishmaniosis visceral en pacientes VIH positivo Instituto de Medicina Tropical, Servicio de Infectología Clínica, Asunción – Paraguay.VII Congreso Paraguayo de Infectología. Temas Libres.

44. Oddone Costanzo R. Leishmaniosis visceral: a 101 años del primer caso diagnosticado en las Américas. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2012;8(1):100–4.

45. Canese A.2004. Situación Epidemiológica de la Leishmaniosis visceral canina en Paraguay. Boletín Epidemiológico 10(31):1-2.

46. Miret J, Sosa L, Galeano E, Ocampos H, Martínez R, Ojeda J, et al.

Situación epidemiológica de la Leishmaniosis canina en el Paraguay (años 2005-2010). Rev Parag Epidemiol. 2010; 1(Suppl 1): 74-5.

47. Pinto MC, Rosa JA da, Fernandes ZMT, Graminha MAS, Mine JC, Allegretti SM, et al. Isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from a case of human cutaneous leishmaniasis in northeast centre of the state of São Paulo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2005;100(7):733-4.

48. Miles MA, Póvoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980;74(2):243-52.

49. Lumsden WH. Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. Ann Soc Belg Med Trop. 1977;57(4-5):361-8.

50. Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovão JM, Pratlong F, Dedet JP, et al. Applicatio of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. Parasitol. Int. 2006;55(4):277-83.

51. J U, Manuel SM, L O, Z L S, F O, José RL, María, et al. Canine Leishmaniosis □ :: new isolates in Madrid (Spain). Revista Ibero-latinoamericana de parasitología. 2009;68(2):108-16.

52. Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A, Alvar J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002;96 Suppl 1:S93-99.

53. Cannova DC. Técnicas de caracterización de *Leishmania spp* y su aporte en la leishmaniasis. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.

2007;11(1):67–72.

54. Lopes UG, Momen H, Grimaldi G Jr, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol.* 1984;70(1):89–98.
55. Martinez E, Alonso V, Quispe A, Thomas MC, Alonso R, Piñero JE, et al. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology.* 2003;127(Pt 6):513–7.
56. Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M, et al. [PCR-RFLP and RAPD for typing neotropical *Leishmania*]. *Biomedica.* 2008;28(4):597–606.
57. Hanafi R, Barhoumi M, Ali SB, Guizani I. Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Exp. Parasitol.* 2001;98(2):90–9.
58. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(2):495–503.
59. Bulle B, Millon L, Bart J-M, Gállego M, Gambarelli F, Portús M, et al. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(9):3391–7.
60. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and environmental microbiology.* 2000;66(5):1933–8.
61. Cupolillo E, Grimaldi Júnior 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(1-2):145–55.

62. Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 1992;51(1):133–42.

63. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck H-P, 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. 2003;41(7):3147–53.

64. Saki J, Meamar A, Oormazdi H, Akhlaghi L, Maraghi S, Mohebbi M, et al. Mini-Exon Genotyping of *Leishmania* Species in Khuzestan Province, Southwest Iran. Iran J Parasitol. 2010;5(1):25–34.

65. NARA E; Chena L; ODDONE R; CANESE A; RUSSOMANDO G Identificación de la especie de *Leishmania* en un caso de Leishmaniasis Cutáneo Diseminada por medio de la PCR- RFLP de la región mini-exón (ME). In: VI Congreso Paraguayo de Infectología, 2007 Asuncion . 2007.

66. Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, et al. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? Parasitology. 2001;122 Pt 1:25–35.

67. Quispe Tintaya KW, Ying X, Dedet J-P, Rijal S, De Bolle X, Dujardin J-C. 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(6):1035–43.

68. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo 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(5):2294–7.

69. Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, et al. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect. Genet. Evol.* 2006;6(6):440–6.

70. Urbano J, Sanchez-Moreno M, Ovalle C.E E, Rosales MJ, Camargo YC, Ramón, Gutiérrez R, et al. Characterization of cutaneous isolates of *Leishmania* in Colombia by isoenzyme typing and kDNA restriction analysis. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología.* 2011;70(1):16–24.

71. Inocência da Luz R, Romero GAS, Dorval ME, Cruz I, Cañavate C, Dujardin J-C, et al. Drug susceptibility of *Leishmania infantum* (*syn. Leishmania chagasi*) isolates from Brazilian HIV-positive and HIV-negative patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(3):677–9.

72. Rodríguez NM, De Guglielmo Z, Barrios MA, Barrios RM, Zerpa O, Feliciangeli MD. Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relationship with the sandfly fauna distribution in endemic areas of Nueva Esparta State, Venezuela. *Parasitology.* 2005;130(Pt 6):611–9.

73. Nasereddin A, Azmi K, Jaffe CL, Ereqat S, Amro A, Sawalhah S, et al. Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. *Veterinary parasitology.* 2009;161(1-2):126–30.

74. Srivastava P, Singh T, Sundar S. Genetic Heterogeneity in Clinical Isolates of *Leishmania donovani* from India. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(10):3687–90.

75. Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. PNAS. 1987;84(2):565–9.
76. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp. Parasitol. 1990;71(3):267–75.
77. Manual de Procedimientos Moleculares. Curso de Entrenamiento en Epidemiología Molecular de Leishmaniosis. LeishEpiNetSA [Internet]. Biomed-Centro Nacional de Referencia de Flebotomos de Venezuela; Available a partir de: 2008
78. Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. Parasitology. 1992;105 (Pt 2):183–92.
79. Sambrook J. FE, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. . New York E.U.A.; Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 1994.
80. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sct. 1979;76(10):5269–73.
81. Chena L. Identificación de Potenciales vectores y reservorios de la leishmaniosis tegumentaria en zonas endémicas del Paraguay. [Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud]: Universidad Nacional de Asunción; 2011.
82. Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras M-C, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 2006;44(7):2343–7.
83. Lukeš J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. PNAS. 2007;104(22):9375–80.

84. Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S, et al. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Infection, Genetics and Evolution*. 2007;7(2):206–12.
85. Bispo Poubel S. Variabilidade Genetica de Isolados de *Leishmania infantum* x *L. chagasi* Procedentes de varias Regiones do Brasil [Tesis doctoral]. [Curitiba]: Universidad Federal de Paraná.; 2010.
86. Ferroglio E, Romano A, Trisciuglio A, Poggi M, Ghiggi E, Sacchi 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(7):636–41.
87. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36(10):2877–81.
88. Costa CHN, Stewart JM, Gomes RBB, Garcez LM, Ramos PKS, Bozza M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;66(4):334–7.
89. de Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009;103(12):1269–72.
90. Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. Identification and differentiation of Iranian *Leishmania* species by PCR amplification of kDNA. *Scand. J. Infect. Dis.* 2001;33(8):596–8.

91. Ferreira GA, Soares FCS, Vasconcellos SA, Rodrigues EHG, Werkhäuser RP, de Brito MEF, et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* Variants by kDNA Signatures Produced by LSSP-PCR. *Journal of Parasitology*. 2007;93(3):712–4.
92. Cupolillo E, Brahim Lr, Toaldo CB, de Oliveira-neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias naiff M, Grimaldi G Jr 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 41: 3126-3132.
93. Lambson B, Barker DC. Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002;96 Suppl 1:75–80.
94. Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001;95(1):104–7.
95. Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degraive WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1996;91(3):279–84.
96. Singh R, Dutta C, Majumder H. Analysis of sequences of two different classes of kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania spp.* *Journal of Biosciences*. 1994;19(2):171–82.
97. Ferreira GEM, dos Santos BN, Dorval MEC, Ramos TPB, Porrozzi R, Peixoto AA, et al. The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2012 may 11;7(5):e36242.

8. ANEXOS

Anexo I. Número de acceso de las secuencias en almacenadas en el GenBank

Nro	Nro. de Acceso	Especie
1	AF103736.1	<i>Leishmania donovani</i>
2	AF103737.1	<i>Leishmania donovani</i>
3	AF103742.1	<i>Leishmania donovani</i>
4	AF167712.1	<i>Leishmania donovani</i>
5	AF167713.1	<i>Leishmania donovani</i>
6	AF167714.1	<i>Leishmania donovani</i>
7	AF167715.1	<i>Leishmania donovani</i>
8	AF167716.1	<i>Leishmania infantum</i>
9	AF167717.1	<i>Leishmania donovani</i>
10	AF167718.1	<i>Leishmania donovani</i>
11	AF168356.1	<i>Leishmania donovani</i>
12	AF168357.1	<i>Leishmania donovani</i>
13	AF169135.1	<i>Leishmania donovani</i>
14	AF169136.1	<i>Leishmania donovani</i>
15	AF239702.1	<i>Leishmania donovani</i>
16	AF239703.1	<i>Leishmania donovani</i>
17	AF239704.1	<i>Leishmania donovani</i>
18	AJ010074.2	<i>Leishmania donovani</i>
19	AJ010075.2	<i>Leishmania donovani</i>
20	AJ010076.2	<i>Leishmania donovani</i>
21	AJ010077.2	<i>Leishmania donovani</i>
22	AJ010078.1	<i>Leishmania donovani</i>
23	AJ010080.2	<i>Leishmania donovani</i>
24	AJ010082.2	<i>Leishmania donovani</i>
25	AJ010083.2	<i>Leishmania donovani</i>
26	AF103738.1	<i>Leishmania chagasi</i>
27	AF103739.1	<i>Leishmania chagasi</i>
28	AF169132.1	<i>Leishmania chagasi</i>
29	AF169137.1	<i>Leishmania chagasi</i>
30	AF169138.1	<i>Leishmania chagasi</i>
31	AF103735.1	<i>Leishmania infantum</i>
32	AF103735.1	<i>Leishmania infantum</i>
33	AF103740.1	<i>Leishmania infantum</i>
34	AF103741.1	<i>Leishmania infantum</i>
35	AF169131.1	<i>Leishmania infantum</i>
36	AF169133.1	<i>Leishmania infantum</i>
37	AF169140.1	<i>Leishmania infantum</i>
38	AF184044.1	<i>Leishmania infantum</i>
39	AF184892.1	<i>Leishmania infantum</i>
40	AF188701.1	<i>Leishmania infantum</i>

41	AF190475.1	<i>Leishmania infantum</i>
42	AF190476.1	<i>Leishmania infantum</i>
43	AF190882.1	<i>Leishmania infantum</i>
44	AF190883.1	<i>Leishmania infantum</i>
45	AJ275321.1	<i>Leishmania infantum</i>
46	AJ275327.1	<i>Leishmania infantum</i>
47	AJ275329.1	<i>Leishmania infantum</i>
48	AJ275330.1	<i>Leishmania infantum</i>
49	AJ275333.1	<i>Leishmania infantum</i>
50	AJ275334.1	<i>Leishmania infantum</i>
51	AJ275335.1	<i>Leishmania infantum</i>