



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGÍA Y SIFILOGRAFÍA  
HOSPITAL VARGAS, INSTITUTO DE BIOMEDICINA

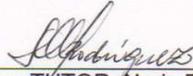
DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN POR PCR-RFLP DE ESPECIES DE  
*LEISHMANIA* AISLADAS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS  
TEGUMENTARIA EN VENEZUELA

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al título de Especialista en  
Dermatología y Sifilografía

Andreina Armand Mijares  
Paula Andrea Soto Toledo

Tutor: Noris Rodríguez

Caracas, noviembre 2012



---

TUTOR: Noris Rodríguez



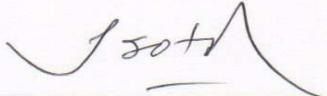
---

DIRECTOR DEL CURSO: Ricardo Pérez Alfonzo



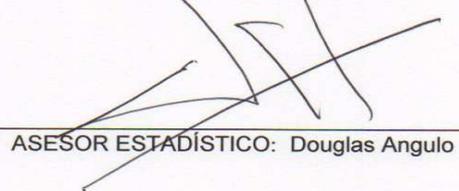
---

COORDINADORA DEL CURSO: Elsy Cavallera



---

ASESOR: Jaime Soto Mancipe



---

ASESOR ESTADÍSTICO: Douglas Angulo

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradecer a la Sección de Leishmaniasis, en especial a Doris Belizario, José Gregorio García y María Eugenia Ortega; quienes nos acompañaron durante siete meses en el trabajo diario con los pacientes y los procedimientos de la consulta, que definitivamente sin su apoyo hubiese sido imposible llegar a nuestro objetivo.

Queremos agradecer con profundo respeto y cariño a nuestros amigos y compañeros Lic. Miguel Angel Barrios y Andrea Orue; que compartieron con nosotros nuestro trabajo en el laboratorio de Ingeniería Genética, por introducirnos en este mundo tan complejo y fascinante de la investigación, y por su paciencia, confianza y gran apoyo brindado en nuestro recorrido.

De igual forma nuestro agradecimiento a la Dra. Noris Rodríguez por su tenacidad y constancia; y por habernos transmitido su conocimiento que nos ayudó a con feliz término concluir nuestra investigación que también es su logro.

Y por último y no en menor importancia, a nuestros padres que sin su apoyo nunca hubiésemos hecho posibles nuestros sueños.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Agradecimiento.....	3
Índice de contenido.....	4
Resumen.....	5
Introducción	
Planteamiento del problema.....	7
Justificación.....	9
Antecedentes .....	11
Delimitaciones .....	16
Variables .....	17
Marco teórico.....	17
Objetivos .....	50
Métodos .....	51
Resultados .....	62
Discusión.....	87
Conclusiones.....	94
Recomendaciones.....	97
Referencias.....	98
Apéndices.....	110

## RESUMEN

La leishmaniasis es una de las seis enfermedades tropicales más importantes mundialmente, con pleomorfismo clínico y epidemiológico relacionado con las especies. La identificación de especies de *Leishmania* orienta al tratamiento y la sensibilidad del parásito a medicamentos. La amplificación de fragmentos por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguido del análisis del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) permite la identificación y la caracterización de especies de este género. El objetivo del estudio fue diagnosticar especies de *Leishmania* y su variabilidad genética, en biopsias de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, implementando la técnica molecular PCR-RFLP. Se realizó estudio prospectivo, descriptivo y experimental; en pacientes de la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, mayo a noviembre 2009. Incluidos 53 pacientes, se solicitó la firma del consentimiento informado y autorización para fotografías clínicas. Leishmanina, frotis por escarificado, biopsia de piel, cultivo, PCR y PCR-RFLP fueron realizados a todos los pacientes. Obtuvimos que 38/53 (72%) fueron positivos para *Leishmania spp*, 29/53 (76%) positivos para *Leishmania (V.) braziliensis* y 9/53 (24%) para *Leishmania (L.) mexicana*. Demostramos variabilidad genética en 21% en *Leishmania (V.) braziliensis*. No se estableció relación entre manifestaciones clínicas y respuesta terapéutica con variabilidad genética entre especies. Deben realizarse estudios con mayor número de muestras. Concluimos que la combinación de técnicas moleculares no solo es útil para el diagnóstico de la enfermedad, sino que permite la identificación de las especies que producen la enfermedad, así como las variaciones genéticas dentro de la misma especie.

Palabras claves: *Leishmania*, Reacción en Cadena de Polimerasa, Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis representa una de las seis enfermedades tropicales más importantes mundialmente, observándose actualmente un aumento en su incidencia en países endémicos. Debido a la gran variedad de especies causantes de esta enfermedad y que dentro de estas mismas se ha podido observar una variabilidad a nivel genético, se han utilizado procedimientos diagnósticos con una alta sensibilidad y especificidad para su identificación.

Esta enfermedad es endémica en 88 países y de estos, 22 son del Nuevo Mundo y 66 del Viejo Mundo con una incidencia de 1-1.5 millones de casos de leishmaniasis cutánea y 500.000 casos de leishmaniasis visceral. <sup>1</sup>

La leishmaniasis cutánea permanece como una de las enfermedades parasitarias más frecuentes con una prevalencia de 12 a 14 millones de pacientes. Estas cifras son de difícil evaluación debido a que en la leishmaniasis existen grandes variaciones en corto tiempo, por ser su distribución focal en zonas alejadas y dispersas, existiendo casos no diagnosticados y casos asintomáticos que no se registran en los sistemas de salud donde la enfermedad no es de declaración obligatoria. <sup>2</sup>

En Venezuela, han sido notificados 47.762 casos de leishmaniasis cutánea en los últimos 20 años (1988-2007), con un promedio de 2.388 casos por año. *Leishmania braziliensis* es considerado el parásito más importante desde el punto de vista epidemiológico. Este parásito ha sido identificado en humanos y en

animales domésticos en varios estados.<sup>3</sup> En los últimos años, los avances en técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de herramientas diagnósticas específicas.

La leishmaniasis se caracteriza por un considerable pleomorfismo clínico y epidemiológico, muy relacionado con la diversidad de especies involucradas y sus vectores, además de los factores ligados al huésped.<sup>4</sup>

#### Planteamiento del problema

La temprana identificación de las especies de *Leishmania* tiene grandes beneficios que permiten una mejor orientación en el tratamiento médico y el seguimiento de los pacientes, ya que la sensibilidad del parásito a los diferentes medicamentos depende de la especie. La identificación de una especie en particular de *Leishmania* en un área endémica es también esencial para realizar actividades de control y entender el comportamiento epidemiológico de ésta enfermedad.

Las técnicas moleculares tienen varias ventajas comparadas con las tradicionales, como la habilidad de detectar los parásitos en presencia de poco número de éstos y la posibilidad de realizarlo con una amplia gama de muestras clínicas.<sup>5</sup>

Se tienen diferentes métodos para la identificación de las especies de *Leishmania*, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con oligonucleóticos específicos (PCR por su siglas en inglés), el análisis del Polimorfismo de la

longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la hibridación molecular, la electroforesis de isoenzimas, el análisis del ADN del kinetoplasto (ADNk), la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y el cariotipo molecular.

La PCR, desarrollada por Mullis y col. (1987), ha sido la técnica más ampliamente usada. Consiste en la amplificación in vitro de un fragmento específico de ADN debido a la extensión simultánea de las dos cadenas por la acción de sondas complementarias. Los requerimientos de esta reacción son muy simples: deoxinucleótidos para proveer tanto la energía como los nucleósidos para la síntesis de sondas de ADN, ADN como blanco y molde; y solución amortiguadora conteniendo magnesio para garantizar la actividad de la enzima.<sup>6</sup>

La amplificación de fragmentos por PCR seguido del análisis del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción, se ha convertido en una herramienta importante, no sólo para la identificación, sino para la caracterización de especies de este género en diferentes zonas geográficas.<sup>7</sup>

En el presente trabajo decidimos en primer lugar realizar el diagnóstico de la leishmaniasis en pacientes de la consulta en el Instituto de Biomedicina, por diferentes métodos, incluyendo PCR, a fin de evaluar la sensibilidad de los métodos empleados. Así mismo, nos propusimos la identificación de las distintas especies y las posibles variantes del parásito mediante técnicas moleculares.

## Justificación

En los últimos años se ha observado el incremento en la incidencia de la leishmaniasis a nivel mundial, tanto que se ha convertido en un problema de salud pública en varios países. Esto puede explicarse en parte por el control inadecuado de vectores o de reservorios, la urbanización del vector, la deforestación, la resistencia a los medicamentos, los conflictos armados y el turismo.<sup>5</sup> Estos factores hacen que sea mandatorio el buscar métodos más eficaces y rápidos para hacer el diagnóstico y brindar un tratamiento oportuno.

En Venezuela, durante el período 1970-2007, se observó un incremento continuo interanual de nuevos casos de leishmaniasis. La incidencia de la leishmaniasis cutánea es de 10 casos por cada 100.000 habitantes; y la leishmaniasis cutánea localizada representa el 98,8% de todos los pacientes.<sup>8</sup>

La gran diversidad fenotípica de la *Leishmania* han llevado al desarrollo de una compleja taxonomía con más de 20 especies descritas, la mayoría en América Latina. Así mismo, la complejidad epidemiológica de algunas regiones, la distribución heterogénea de parásitos, los ciclos de transmisión de las diferentes especies; pueden superponerse y variar entre especies.<sup>9</sup> Lo mencionado anteriormente justifica la necesidad de tipificar las especies infectantes para un mayor control.

El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea tradicionalmente se hace por medio de la identificación directa de amastigotes de *Leishmania* en los tejidos, asociado a pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada e identificación

directa del parásito por microscopía. Estos métodos son rápidos, económicos y fáciles de realizar pero no pueden hacer una discriminación entre las especies.

Implementar un método diagnóstico que identifique las diferentes especies de *Leishmania* va a permitir hacer un tratamiento oportuno y adecuado, teniendo en cuenta que el espectro de la enfermedad y la respuesta al tratamiento varía de acuerdo con la especie.<sup>9,10</sup> En los últimos años se ha reportado resistencia a los diversos medicamentos anti-leishmania en distintas regiones de Latinoamérica, aunque sin llegar aún al extremo de algunas regiones en India, en donde la *L. donovani* se ha tornado resistente a los antimoniales pentavalentes en más del 60% de los casos.<sup>11,12</sup>

Los avances en la tecnología molecular han brindado información importante sobre las fuentes de infección, los parámetros de transmisión, la respuesta al tratamiento y la importancia de la inmunidad para prevenir la reinfección.

Mediante técnicas moleculares se han identificado casos de leishmaniasis cutánea en las distintas áreas endémicas de Venezuela como: los valles del sistema montañoso de la Costa, la depresión de Yaracuy, algunas regiones de los llanos y de los Andes, el sur del Orinoco, la zona montañosa y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre, además de los Estados Carabobo y Aragua.<sup>8</sup>

En este Trabajo Especial de Grado decidimos utilizar los métodos moleculares PCR-RFLP para realizar el diagnóstico y la identificación de las

principales especies de *Leishmania* que afectan a los pacientes que consultan al Instituto de Biomedicina que, por ser el centro de referencia nacional puede dar una buena idea sobre las especies más prevalentes en Venezuela. Este método es fácil, rápido y permite la utilización de tejido del huésped sin necesidad del aislamiento del parásito o de realizar un cultivo.

Los resultados nos permitirán observar si existe la presencia de variabilidad genética intra-especies y si ésta se relaciona con las manifestaciones clínicas de los pacientes. Así mismo nos orientará para administrar el tratamiento más apropiado para la especie de *Leishmania* de una manera oportuna.

#### Antecedentes

En un estudio realizado en Brasil en el 2003, utilizaron las técnicas moleculares de electroforesis enzimática de multilocus (MLEE) o electroforesis de isoenzimas y RFLP con el fin de evaluar el polimorfismo genético y la epidemiología molecular de la *Leishmania (Viannia) braziliensis* en diferentes huéspedes y en varias zonas geográficas de ese país. Ellos detectaron diferentes genotipos de esta especie, aislada de un paciente con leishmaniasis cutáneo mucosa. Observaron que esta diversidad molecular se relacionaba con el tipo de vector, el reservorio y la susceptibilidad inmunológica del paciente. Concluyeron que estos tipos de técnicas moleculares permiten determinar la diversidad genética de varios parásitos de *Leishmania* que circulan en la naturaleza y que conociendo esto, se puede lograr la disminución de la transmisión, la virulencia y mejorar el control epidemiológico de la enfermedad.<sup>13</sup>

Se realizó un estudio en la Universidad de Ciencias Médicas de Isfahan, Irán en el 2005, en donde se plantean si la heterogenicidad genética puede producir diferentes fenotipos que podrían estar asociados con la diversidad de manifestaciones clínicas. Utilizan los métodos moleculares PCR-RFLP con el fin de investigar la variabilidad genética en *Leishmania major* y correlacionar los hallazgos con las manifestaciones clínicas. Se incluyeron tres pacientes con lesiones úlcero-vegetantes, tres con úlceras tipo crateriforme y tres con lesiones papulosas. Se cultivaron promastigotes de todos los casos, a los que se les hizo la extracción de ADN y su amplificación. Los productos fueron digeridos con enzimas de restricción (BstU1 y Cfo1). Posteriormente fueron separados en un gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz ultravioleta. Como resultados observaron que al utilizar cualquiera de las enzimas, los patrones de las bandas se podían clasificar en 3 grupos en función del número y localización de las bandas; ésta clasificación también correspondió a la forma de las lesiones cutáneas. Los resultados de este estudio revelaron notables variaciones entre los patrones de bandas en el RFLP realizado a las muestras de *L. major* aisladas de pacientes con diferentes formas clínicas en un área geográfica. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se han atribuido tanto a las diferencias en la respuesta del huésped y la heterogeneidad genómica de los parásitos. Este estudio estuvo a favor del importante papel de la variabilidad genética de la *L. major* en la determinación de las características clínicas, resultados que sugieren que hay un alto polimorfismo genético entre especies y que existía una relación estrecha entre la variabilidad genética y las diferentes manifestaciones clínicas.<sup>14</sup>

Otro estudio realizado en el Hospital General de México (Distrito Federal), utilizaron el método de PCR para hacer la diferenciación entre especies de *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis*. Mencionan que en los casos de pacientes con enfermedad crónica que no responden bien a los tratamientos de rutina y que tienen muy pocos parásitos, realizar el diagnóstico por medio de la PCR es una estrategia con alta sensibilidad y especificidad. Además, permite realizar estudios epidemiológicos moleculares, tanto de los pacientes infectados con distintas especies, como de los vectores infectados y de los reservorios de las distintas especies de *Leishmania*. Otro punto importante es que permite optimizar el tratamiento de los pacientes.<sup>15</sup>

En el Departamento de Medicina Experimental y el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de México, se realizó un estudio que tuvo como objetivo demostrar la heterogenicidad genética en la especie *L. mexicana*. Se evaluaron muestras cutáneas de 23 pacientes, quienes presentaban formas clínicas de leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea difusa y una forma de leishmaniasis cutánea atípica "pseudodifusa". La técnica de RFLP del ADN de Kinetoplasto se realizó con nueve endonucleasas diferentes. Observaron que las 23 muestras debían ser divididas en 6 grupos dependiendo de los patrones de digestión obtenidos. Las lesiones cutáneas localizadas podían tener cualquiera de los 6 patrones, mientras que las lesiones difusas sólo demostraban 2 y la forma atípica solo demostraba un patrón. Como conclusiones encontraron heterogenicidad genética intra-especie y su relación directa con las manifestaciones clínicas y con el comportamiento de crecimiento de los parásitos,

sugiriendo que un patrón de restricción distintivo puede tener implicaciones biológicas importantes.<sup>16</sup>

En el Departamento de Dermatología del Hospital Saudí en Yemen en asociación con el Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en Roma, realizaron un estudio en donde se identificó la especie de *Leishmania* responsable de la leishmaniasis cutánea en la región del Noroeste de Yemen por medio de la técnica PCR-RFLP. Se obtuvieron 265 casos de leishmaniasis cutánea. Se realizó la técnica de PCR, encontrándose 198 casos con muestras positivas para *Leishmania spp.* Posteriormente, se realizó la RFLP que fue positiva en 155 muestras para la identificación de la especie: *L. tropica* 133 casos (85.80%), *L. infantum* en 17 casos (10.97%) y *L. donovani* en 5 casos (3.23%). El estudio concluye que la leishmaniasis cutánea es endémica en el nor-occidente de Yemen. Clínicamente se presenta como una lesión única (97.36%), de curso crónico. Es causada principalmente por *L. tropica* y en ocasiones por *L. infantum* y *L. donovani*. Aun así, plantean que se debe realizar un estudio multicéntrico con el fin de evaluar la extensión de la enfermedad y la especie de *Leishmania* responsable de la misma.<sup>17</sup>

En el Instituto de Biomedicina en Caracas, se han realizado proyectos similares al nuestro. Rodríguez y col. (1994)<sup>18</sup>, realizaron un estudio utilizando la técnica PCR-hibridización para hacer el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y la discriminación de especies. Los objetivos del estudio fueron evaluar la eficacia de la PCR para establecer el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y compararlo con otros métodos diagnósticos. También hacer la discriminación taxonómica entre

especies en áreas endémicas de Venezuela. Se analizaron 233 muestras de biopsias de úlceras sugestivas de leishmaniasis por medio de PCR y los productos obtenidos fueron hibridizados. La PCR fue positiva para *Leishmania spp.* en 226 muestras de las 233 (97%) y mediante la hibridización se logró observar variabilidad genética entre especies y subespecies. Determinaron que el uso de PCR asociado a la hibridización es altamente sensible y útil, no sólo para el diagnóstico de la enfermedad, sino también para obtener la identificación taxonómica, la cual es esencial para estudios epidemiológicos y el tratamiento.

Se han realizado otros estudios utilizando la técnica PCR-RFLP para la evaluación de la resistencia a algunos tratamientos anti-leishmaniasis. En el Departamento de Parasitología y Micología de la Universidad Médica de Shiraz, Irán, se realizó un estudio implementando el uso de PCR-RFLP, con el fin de evaluar la relación entre el genoma del parásito y la resistencia a los medicamentos. Tomaron un total de 102 láminas con diferente cantidad de parásitos, 19 de estas láminas, fueron de pacientes tratados y curados con glucantime y 28 fueron de pacientes que no curaron con el antimonial pentavalente. Se extrajo el material genético y se realizó PCR. Los fragmentos amplificados fueron digeridos por medio de enzimas de restricción y posteriormente se realizó la electroforesis para su análisis. Como resultados de las 19 muestras de los pacientes que se curaron, 6 fueron positivas para *L. tropica* y 13 para *L. major*. De las 28 muestras de los que no se curaron, 14 fueron positivas para *L. tropica* y 14 para *L. major*. Analizando los resultados, se observa que la *L. tropica* tiene mayor resistencia y que la *L. major* es más sensible al tratamiento

con glucantime en esta región. Se observó también una alta diversidad genómica en la *L. tropica* comparado con la *L. major*. Como conclusión se pudo establecer la relación entre la diversidad genética y la incidencia de la resistencia a medicamentos por parte de la *L. tropica* en la región de Shiraz. <sup>19</sup>

## Delimitaciones

En el presente Trabajo Especial de Grado decidimos utilizar dos métodos de biología molecular (PCR-RFLP), con el fin de realizar el diagnóstico y la identificación de las principales especies de *Leishmania*, así como la existencia de la variabilidad genética intra-especie, en parásitos aislados de pacientes que asistieron por primera vez a la consulta de leishmaniasis del Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas de Caracas, con diagnóstico presuntivo de leishmaniasis cutánea localizada, en el periodo comprendido entre mayo a noviembre del 2009. Todas estas muestras fueron procesadas en el laboratorio de Ingeniería genética de esta misma institución.

La búsqueda de información para sustentar nuestro trabajo, lo realizamos utilizando artículos de revistas científicas de la biblioteca del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y artículos de bibliotecas virtuales en internet (Medline, PubMed, HINARI).

## Variables

VARIABLES	TIPO	INDICADOR
Edad	Continua	Edad del paciente en años
Localización	Nominal	Cuello, manos, brazos, piernas
Forma clínica	Nominal	Úlcera, pápula, placa, nódulo
Tiempo de evolución	Continua	Meses con enfermedad
Frotis	Nominal	Positivo, Negativo
Cultivo	Nominal	Positivo, Negativo
PCR	Nominal	Positivo, Negativo

## Marco teórico

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas y antroponóticas crónicas, de baja patogenicidad y morbilidad relativa, producidas por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania* de la familia *Trypanosomatidae*. Se transmite por la picadura de las hembras de insectos dípteros hematófagos, que corresponden a diferentes especies de flebotomíneos (*Lutzomyia sp*) cuyos reservorios son mamíferos silvestres y domésticos.<sup>20</sup> Según la especie de *Leishmania* implicada y la respuesta inmune del huésped se puede comprometer la piel, las mucosas o las vísceras.

## Filogenia y taxonomía

Reino: PROTISTA

Subreino: PROTOZOA

Filo: SARCOMASTIGOPHORA

Subfilo: MASTIGOPHORA

Clase: ZOOMASTIGOPHOREA

Orden: KINETOPLASTIDA

Suborden: TRYPANOSOMATINA

Familia: TRYPANOSOMATIDAE

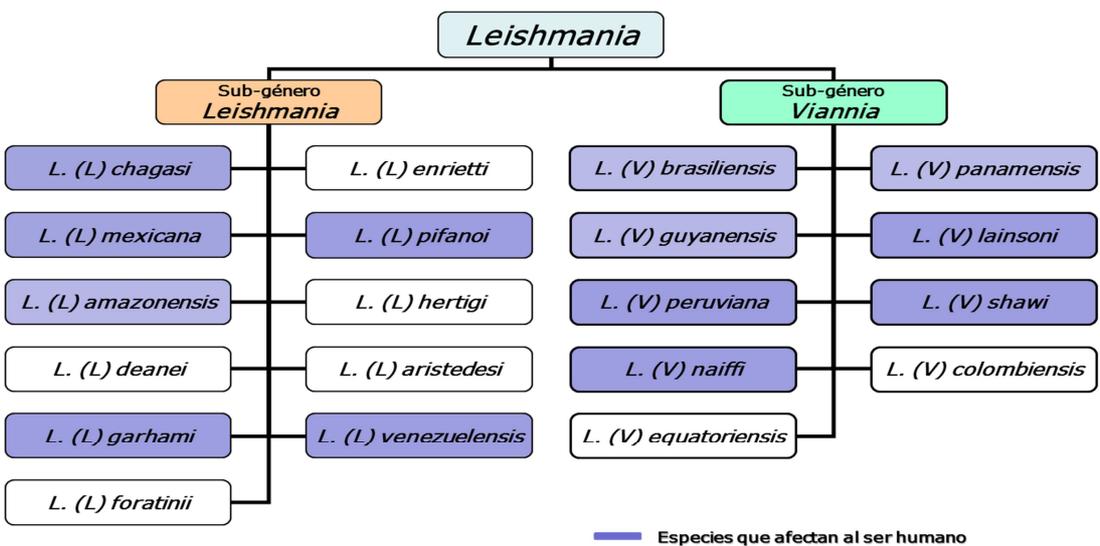
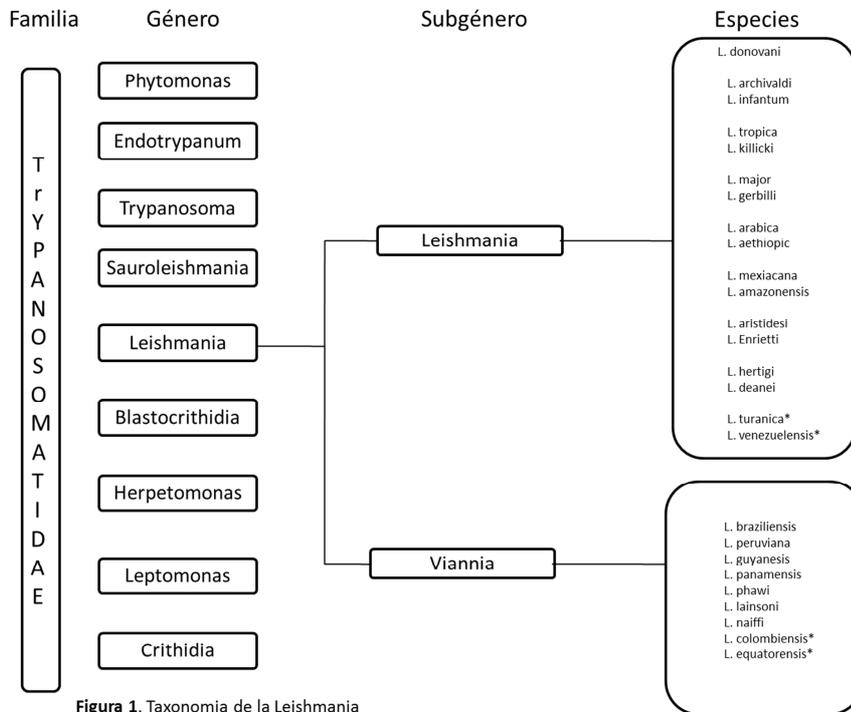
Género: LEISHMANIA

Subgénero: LEISHMANIA y VIANNIA

Dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector: subgénero *Leishmania* con desarrollo suprapilórico de los flagelados y subgénero *Viannia* de multiplicación peripilórica.<sup>21</sup> En las Figuras 1 y 2, se muestra un esquema con la taxonomía del género *Leishmania* y las especies.

## Ciclo biológico

La *Leishmania* es un parásito digénico, es decir, realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedero invertebrado (numerosas especies del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) en forma flagelar o promastigote, y otra parte en el hospedero vertebrado (gran variedad de

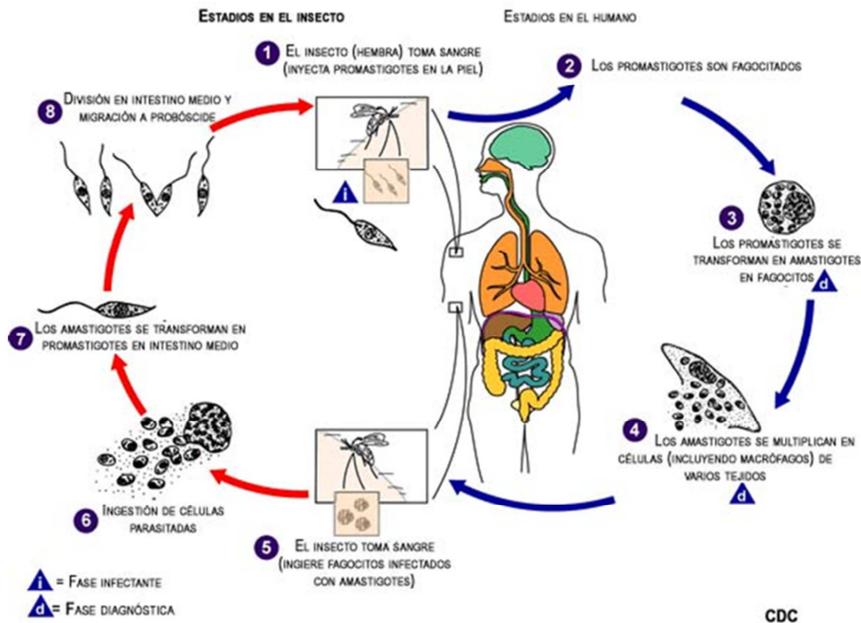


géneros) principalmente en los macrófagos, en forma aflagelar o amastigote. Cuando el flebótomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado, inocula acompañado con su saliva los promastigotes existentes en la probóscide. Una vez que el parásito se encuentra en los capilares cutáneos del hospedero vertebrado, se produce una fagocitosis por parte del macrófago que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo, mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, entre otros el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas lisosomales vertidas en el interior de la vacuola parasitófora. La *Leishmania* evade estas reacciones inespecíficas del macrófago para sobrevivir y multiplicarse en su interior. La progresión de la enfermedad dependerá de si los amastigotes sobreviven a estas reacciones por parte de los macrófagos, de la virulencia del protozoo y de la eficacia de la respuesta inmune.

Las células parasitadas circulantes pueden ser ingurgitadas por otros flebótomos, en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes para transformarse posteriormente en promastigotes. Pasados varios días alcanzan la capacidad infectiva (metaciclogénesis); en este momento las leishmanias se encuentran ya en la probóscide del flebótomo, pudiendo ser inoculadas a otro hospedero vertebrado cerrándose así el ciclo. La Figura 3 muestra el esquema del ciclo biológico de la *Leishmania*.

## Morfología

La *Leishmania* fue descrita en 1903 por Leishman, Donovan y Wright; y en el ciclo biológico pasa por una serie de etapas con diferente morfología. En el



**Figura 3.** Ciclo biológico de la *Leishmania*.

1- Promastigotes en capilares sanguíneos después de la picadura del flebótomo. 2 - Fijación y fagocitación de los promastigotes en un macrófago. 3 - Fusión del fagosoma y lisosoma. 4 - Diferenciación del promastigote en amastigote, multiplicación intravacuolar de amastigotes, ruptura del macrófago y liberación de amastigotes. Fagocitosis de amastigotes libres por otros macrófagos. 5 -Ingestión de macrófagos parasitados cuando el flebótomo ingurgita sangre. Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes en el tracto digestivo del flebótomo. 6 - Multiplicación de amastigotes y diferenciación en promastigotes. 7- Multiplicación de promastigotes e inserción de flagelos entre los microvilli del endotelio digestivo. 8 - Promastigotes infectivos libres en la probóscide.

Fuente: Centers for Diseases Control and Prevention National Center for Infectious Diseases. Division of Parasitic Diseases. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

hospedero vertebrado, se encuentra la forma de amastigote, caracterizada por su forma oval, con un tamaño de 2-3  $\mu\text{m}$  y carente de flagelo. En el vector invertebrado se localiza la forma promastigote, con un tamaño de 15-24  $\mu\text{m}$  x 2-4  $\mu\text{m}$  y un único flagelo. Cuando el promastigote se encuentra anclado en las vellosidades del tubo digestivo del flebótomo se le denomina promastigote nectomona. Según va progresando hacia porciones anteriores del estómago el cuerpo se hace más redondeado y el flagelo se engrosa y acorta. En esta etapa carece de capacidad infectiva y se le conoce con el nombre de promastigote haptomona. Aproximadamente diez días después de haber entrado en el insecto, el promastigote pierde la adherencia y el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo. El promastigote ya no se multiplica pero recupera el

poder infectivo y está situado en la hipofaringe del díptero, libre y en condiciones de poder ser inoculado; en este momento se le conoce con el nombre de promastigote metacíclico. Una vez que el promastigote ha sido inoculado en el hospedador vertebrado el cuerpo se ovala; en esta fase al parásito se le denomina paramastigote. Una vez en el macrófago, el amastigote adquiere la forma típica durante las primeras 24 horas.<sup>22</sup>

Tanto el promastigote como el amastigote son células bien organizadas. La membrana plasmática es una bicapa lipídica y se encuentra tapizada por un glucocálix formado por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI)<sup>23</sup> y relacionado con la capacidad invasiva del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocálix son una glicoproteína de 63 kDa (gp63), otra de 46 kDa (gp46) y el lipofosfoglicano (LPG). La glicoproteína de 63 kDa (gp63) es una metaloproteínasa polimórfica y conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. Está presente en las dos formas del parásito, alcanzando las 500.000 copias por célula en el promastigote.<sup>24</sup> En los amastigotes aparece en menor número y localizada en el interior de lisosomas. La glicoproteína de 46 kDa (gp 46) presenta unas 400.000 copias por promastigote. Está presente en el subgénero *Leishmania*, pero no así en *Viannia*, siendo su principal característica la resistencia a la proteólisis.<sup>25</sup>

Por último, el lipofosfoglicano (LPG) es otro glicoconjugado, implicado en el anclaje del parásito al macrófago y a las microvellosidades intestinales del insecto, y en la inhibición de la respuesta oxidativa y la producción de óxido nítrico por parte del macrófago.<sup>26</sup> En el promastigote está presente en un

número muy alto de copias, entre 1 y 1.5 millones por célula, sin embargo, en el amastigote es muy poco abundante.

Se acepta de forma general que la multiplicación de *Leishmania* es asexual (agamogonia). Se realiza por bipartición longitudinal de los promastigotes, excepto en las formas metacíclicas que no se dividen. Primero lo hace el núcleo, luego el corpúsculo basal, a continuación se forma el flagelo para finalmente dividirse el citoplasma. Los amastigotes se dividen bien por bipartición o bien por división múltiple.

#### Organización genómica

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida, poseen un ADN genómico (ADNg) localizado en tres compartimentos: en el núcleo, como ADN cromosómico, en la mitocondria o kinetoplasto formando una red de maxi- y minicírculos (ADNk) <sup>27</sup> que se replica independientemente y es inusual en la naturaleza, y en el citoplasma como ADN extracromosómico. El ADNk es rico en Adenina+Timina (72-73%) a diferencia del ADN cromosómico, rico en Guanina+Citosina (>60%). <sup>28</sup>

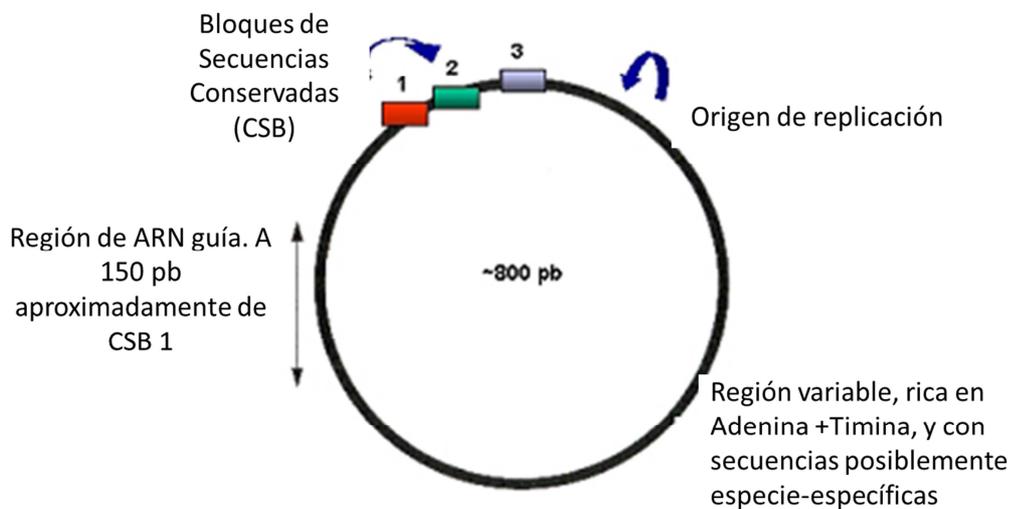
El material genético de los protozoos del orden Kinetoplastida está organizado en cromosomas que al no condensarse en ninguna fase del ciclo mitótico no pueden ser visualizados con el microscopio óptico, lo que impide su análisis citogenético convencional. La introducción de la técnica de electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE) ha permitido obtener un patrón del cariotipo de la *Leishmania*, pero es extremadamente polimórfico y complejo. En general, se

acepta que la *Leishmania* posee un genoma constituido por 20-36 cromosomas con un tamaño de 150 kilobases en los minicromosomas y de 4 megabases en los de mayor tamaño. Aunque no ha sido posible determinar con certeza el carácter diploide del genoma de *Leishmania*, en general existe un consenso sobre ello, además de aceptar que es funcionalmente asexual.<sup>29</sup>

El kinetoplasto se encuentra dentro de la membrana mitocondrial y está presente en todos los protozoos del orden Kinetoplastida. Es un disco visible al microscopio óptico con un diámetro de 1-2  $\mu\text{m}$ . Contiene aproximadamente 107 pares de bases. Está situado dentro de la membrana mitocondrial en la base del flagelo y aparece en todos los kinetoplastidos. Representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red de moléculas circulares (maxicírculos y minicírculos) concatenadas covalentemente. (Figura 4) El ADNk contiene unos 50 maxicírculos (30-40 kilobases), con genes que codifican el ARN ribosomal y algunas proteínas mitocondriales y de 10.000 a 20.000 minicírculos con un tamaño que oscila entre 400 y 2500 pares de bases dependiendo de la especie. En cada minicírculo existe una región muy conservada de unos 120 pares de bases y una región variable de unos 700 pares de bases. Poseen los ARN guías y forman parte de la estructura y la división del kinetoplasto.<sup>30</sup>

En *Leishmania* existen entre 8 y 20 familias de minicírculos que presentan una serie de secuencias con un tamaño que oscila entre las 300 y las 600 pares de bases y que están altamente repetidas (Bloques de Secuencias Conservadas-CSB), conocidas como CSB1, 2 y 3. Las *Leishmanias* presentan un número limitado de familias de secuencias cuyo número entre 10 y 80, depende de la

especie <sup>31</sup> y algunas de las familias, entre 4 ó 5, acaparan casi el 80% de los minicírculos. Esto significa que una gran cantidad de copias (más de 3.000) de unas pocas secuencias de entre 300-600 pares de bases estarán disponibles para estudios de secuenciación y diseño de sondas. <sup>32</sup> Las secuencias de los minicírculos pueden variar por mutación o recombinación con otras cadenas de minicírculos ya existentes, lo que se traduce en una variabilidad relativamente alta. Sin embargo, se ha comprobado la homogeneidad y estabilidad de ciertas secuencias de minicírculos pertenecientes a un mismo subgénero de *Leishmania* geográficamente muy distantes, así como dentro de la misma especie. <sup>33,34</sup>



**Figura 4.** Organización del minicírculo de ADN del kinetoplasto dentro de la membrana mitocondrial

Ciertos fármacos como la pentamidina interactúan directamente con el ADNk, interfiriendo en su replicación y transcripción, además de modificar su conformación estructural, es decir, la red concatenada sufre modificaciones

apreciables.<sup>35</sup> El significado de estos cambios no está claro, pero se ha propuesto el término “transkinetoplastidia”, para explicar cómo ante la presencia de ciertos fármacos (pentamidina, arsénicos y tunicamicina), se produce un cambio en la replicación de los minicírculos que conduce a que las familias minoritarias tras varios ciclos de replicación sean las mayoritarias.<sup>36</sup>

#### Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad

Últimamente se ha sugerido la posibilidad de que durante el ciclo biológico de muchos protozoos parásitos, puede tener lugar un intercambio genético. Las dos consecuencias genéticas fundamentales de la reproducción sexual son segregación y recombinación; su ausencia en poblaciones naturales indicaría la inexistencia por tanto de este tipo de reproducción. Se ha podido demostrar que *Leishmania* sufre recombinación genética en el laboratorio y en poblaciones naturales.<sup>37,38</sup> Sin embargo todos los intentos de cruzamiento experimental en el vector han fracasado. A principios de los 90 se propuso una teoría general de reproducción clonal para los protozoos parásitos. Se postula que una especie es clonal cuando sus descendientes son idénticos a los progenitores. Esta teoría 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. 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.<sup>39</sup>

## Inmunopatogenia

La evolución de la infección leishmánica depende de una compleja interacción entre el parásito, el hospedador, el ambiente e inclusive la especie del insecto transmisor.

La respuesta inmunológica que se presenta durante una infección por *Leishmania* es mediada por células y las manifestaciones clínicas dependen de la respuesta mediada por los Linfocitos T helper (Th1 o Th2). La respuesta Th1 mediada por el interferón (INF)- $\gamma$ , el TNF y la IL-12 se asocia con la resolución de la enfermedad y la resistencia, y la respuesta Th2 mediada por IL-4 se relaciona con la susceptibilidad y progresión de la enfermedad.

Estas respuestas se relacionan con el amplio espectro clínico de la leishmaniasis cutánea. Las formas localizadas tienen predominantemente citoquinas tipo Th1, mientras que en las formas difusas se encuentran citoquinas tipo Th2. Las formas mucosas tienen una combinación de citoquinas Th1 y Th2, por lo que se relaciona con el comportamiento inflamatorio agresivo y la cronicidad de ésta forma. Por lo tanto, las respuestas inmunes del huésped determinan el pronóstico, sugiriendo el potencial de las intervenciones inmunoterapéuticas.<sup>40</sup>

## Clínica y Epidemiología

Los protozoos del género *Leishmania* causan las leishmaniasis, un grupo de enfermedades que cursan como úlceras cutáneas o graves afectaciones viscerales. Entre estos dos polos hay una amplia gama de posibilidades clínicas.

Unas 30 especies de flebótomos pueden ser infectados por el parásito cuando ingurgitan sangre de un hospedador que a su vez es reservorio. Éstos pueden ser humanos, animales de vida salvaje como roedores, o animales domésticos como el perro. La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis rurales o periurbanas, infectándose el humano de manera esporádica, mientras que las formas antroponóticas son de transmisión fundamentalmente urbana.

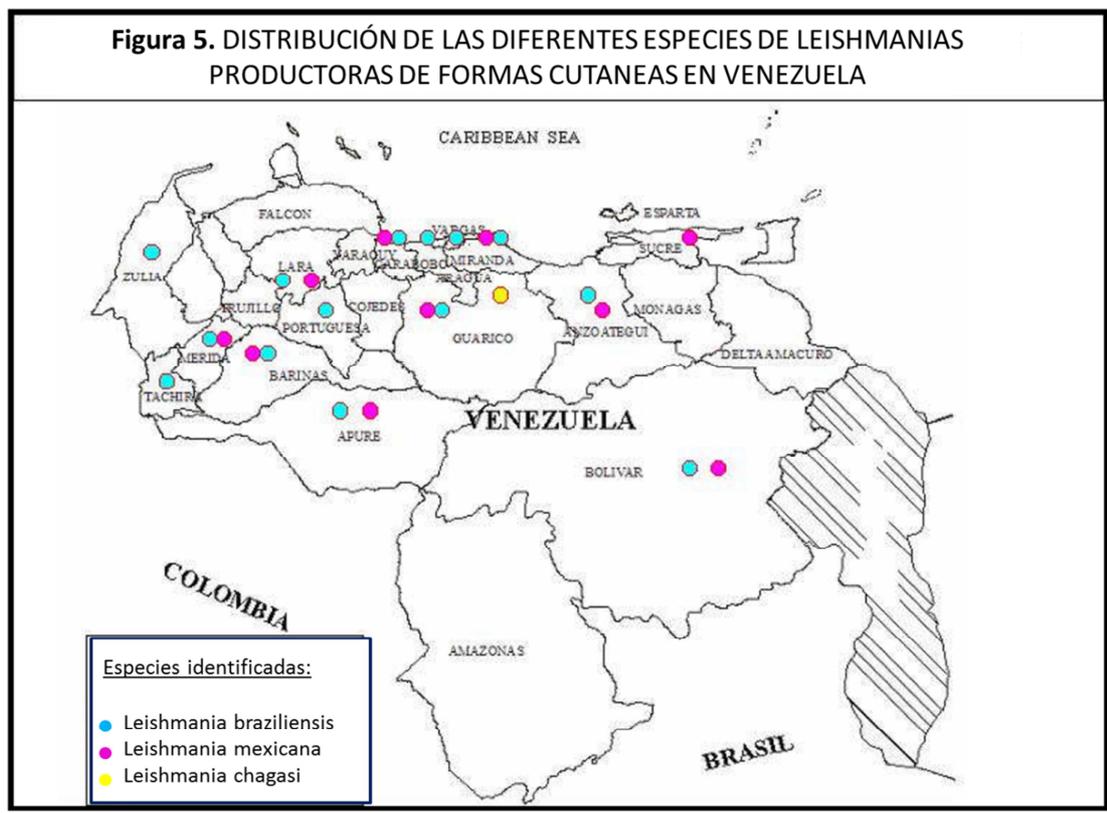
En Venezuela han sido notificados 47.762 casos de leishmaniasis cutánea en los últimos 20 años (1988-2007), con un promedio de 2.388 casos por año, de ese total 98,5% corresponde a la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), 0,84% de leishmaniasis mucosa (LM), 0,50% leishmaniasis cutánea intermedia (LCI) y 0,16% leishmaniasis cutáneo difusa (LCD).<sup>41</sup> Se han reportado casos en las 23 entidades federales y el Distrito Capital siendo las zonas más afectadas aquellas asociadas a las cordilleras, en especial la de los Andes (Estado Táchira, Mérida, Trujillo y Lara) (Figura 5).

Las zonas más afectadas del Distrito Capital y municipios aledaños son la urbanización Miranda, Turgua, El Hatillo, El Ingenio, Guatire, Guarenas y Parque Caiza.<sup>42</sup>

Se han identificado en el territorio venezolano varias especies de *Leishmania*: *L. (L.) mexicana*, *L.(L.) amazonensis*, *L.(L.) garhami*, *L. (L.) pifanoi*, *L.(L.) venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) colombiensis*.

Las distintas manifestaciones de la leishmaniasis cutánea pueden presentar apariencia clínica similar, pero diferir en el curso de la infección. Las úlceras

causadas por el subgénero *Viannia* son más agresivas que aquellas que son causadas por el subgénero *Leishmania*.<sup>17</sup> Las especies de *Leishmania* del subgénero *Leishmania* son responsables de la enfermedad cutánea localizada o difusa. Las *Leishmanias* del subgénero *Viannia* son causantes de leishmaniasis cutánea o cutáneo mucosa en el Nuevo Mundo.



Las formas clínicas son:

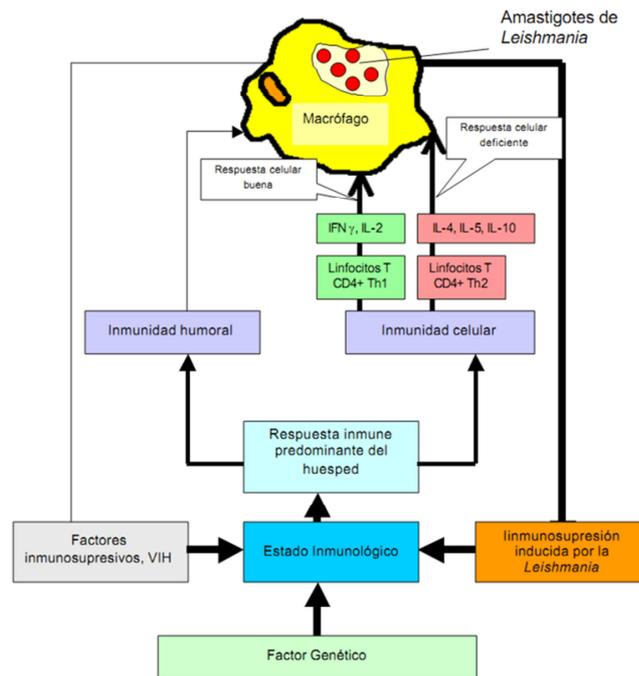
- Leishmaniasis cutánea localizada (LCL): Producida por *Leishmania* del subgénero *Viannia* y *Leishmania*. Esta forma clínica representa el 99,13% de los casos y usualmente afecta áreas del cuerpo que son expuestas a las picaduras de insectos como la cara, el cuello y las extremidades. Se

representa como una lesión primaria, solitaria. Después de un periodo de incubación de 1 semana a 3 meses, aparece una pápula eritematosa, la cual crece hasta convertirse en un nódulo o una placa, que evoluciona a una úlcera bien circunscrita, con bordes infiltrados, eritemato-violáceos levemente elevados. La base de la úlcera es granulomatosa, con costras y los márgenes son hipertróficos. También se manifiesta con eritema e infiltración de los trayectos linfáticos y adenopatías satélites regionales. La intradermorreacción es positiva y los títulos de anticuerpos en sangre periférica son elevados.<sup>43.44</sup>

- Leishmaniasis cutáneo mucosa (LCM): Después de una lesión cutánea en cualquier parte del cuerpo, las leishmanias por vía linfática se dirigen a la oronasofaringe produciendo perforación del tabique llegando a afectar al paladar, dorso nasal, labio superior y mejillas. Los agentes causales son: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* (sólo causa LCM por contigüidad con la lesión inicial). De 3 a 5% de los pacientes con leishmaniasis cutánea pueden desarrollar lesiones mucosas<sup>45</sup>. Cerca del 50% de los casos se manifiesta durante los dos primeros años posteriores a la aparición de la úlcera cutánea inicial. Una cicatriz antigua se encuentra en 90% de los casos de leishmaniasis mucosa. La sintomatología inicial está dada por hiperemia nasal, nodulaciones, rinorrea y posterior úlcera. El sitio más frecuente de las lesiones es la mucosa del tabique nasal. Como complicaciones se pueden observar las lesiones crónicas,

progresivas y deformantes que por falta de un diagnóstico oportuno producen graves malformaciones.

- Leishmaniasis cutánea difusa (LCD): La leishmaniasis cutánea difusa es una forma rara de esta enfermedad que representa el 0.06% de todos los casos de leishmaniasis en Venezuela. En la mayoría de los pacientes la enfermedad se inicia en la infancia con lesiones localizadas en un área de la superficie corporal que luego se generalizan, presentando pápulas, placas o nódulos; además se presentan recaídas muy frecuentes después de tratamiento con medicamentos anti-*Leishmania*. Esta forma de enfermedad presenta una ausencia de respuesta inmune celular específica frente al parásito *Leishmania*. Desde 1946 hasta el 2009 se han registrado 45 casos de LCD en Venezuela. Se ha identificado a la *Leishmania amazonensis* y la *Leishmania mexicana* como agentes etiológicos responsables. Desde el punto de vista inmunológico, todos los pacientes presentan leishmanina negativa, una respuesta inmune celular tipo Th2 con predominio de IL-4 e IL-10 sobre INF- $\gamma$  e IL-12, escasa producción de óxido nítrico sintetasa y una elevada producción de TGF- $\beta$  (Figura 6). La respuesta al tratamiento es muy pobre y la mayoría de los pacientes presenta recaídas posteriores a la mejoría clínica luego del uso de antimoniales pentavalentes, anfotericina B, inmunoterapia o miltefosina.<sup>46</sup>



**Figura 6.** Respuesta inmunológica del huésped frente a una infección por *Leishmania*  
Fuente: [http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud\\_publica/mod\\_tec/8.pdf](http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/mod_tec/8.pdf)

- Leishmaniasis cutánea intermedia (LCI): Forma caracterizada por placas verrugosas, úlceras crónicas, pobre respuesta al tratamiento y recaídas con lesiones extensas. Es producida tanto por parásitos del género *Leishmania* como *Viannia*. La histología es similar a la forma cutánea localizada, siendo menos intensa la diferenciación epitelioide y más frecuentes las alteraciones epidérmicas como la proliferación epitelial, hiperqueratosis, paraqueratosis y escamo-costras. Los parásitos son observados en número variable y deben ser buscados en el interior de los macrófagos. Estos pacientes presentan una disminución en la participación de las células de Langerhans epidérmicas y un granuloma con patrón mixto en la producción de citoquinas tipo Th1 y Th2. La leishmanina es positiva y en la mayoría de

los casos es hiperreactiva. El diagnóstico diferencial debe hacerse con piodermatitis, esporotricosis, cromomicosis, cáncer de piel y tuberculosis cutánea.<sup>47</sup>

- Leishmaniasis visceral (LV): Es la forma más severa de la enfermedad. Es producida *L. chagasi* en América. El periodo de incubación suele ser de 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 el 90%.<sup>48</sup>

**Tabla 1.** Especies de *Leishmania* en Venezuela y sus características epidemiológicas y clínicas

ESPECIE	LOCALIZACIÓN DEMOGRAFICA	TIPO DE INFECCIÓN	LOCALIZACIÓN ANATOMICA	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
<i>L. (L.) mexicana/L. (L.) pifanoi</i>	América Central Sudeste México, Venezuela (Edo. Yaracuy, Lara y Miranda)	Benigna 1 sola úlcera o múltiples (úlcera del chiclero)  Lesiones cutáneas difusas semejantes a lepra lepromatosa	Pabellón auricular, cara, tronco, extremidades	Pápula eritematosa que luego se ulcera (crónicas) Otras áreas cura espontáneamente . Disfunción sistema inmunológico . Paciente con anergia (leishmanina (-))
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cuenca amazónica (Brasil y países vecinos)	Lesiones únicas o múltiples para curación espontánea	Cara y piernas Generalizadas	30% pacientes con lesiones difusas (placas, pápulas o nódulos)
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Venezuela (región centro Oriental)	Lesiones ulcerosas cutáneas	Cara y extremidades	Úlceras, en forma nodular, ulceronodular
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Brasil, Colombia, Bolivia, Venezuela (Zona Andina y pie montaña costa)	Lesión papular que evoluciona a úlcera indolora, sin cura espontánea	Cara y extremidades	Tendencia metastásica hacia áreas mucocutáneas, con destrucción de tejidos afectados
<i>L. (V.) panamensis</i>	A. Central, Colombia, Perú, Venezuela, Ecuador, Panamá	Úlcera de piel y mucosas	Cara y extremidades	Lesiones sin curación espontánea y afecta vasos linfáticos
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Guyanas, norte Brasil y Surinam	Lesiones en piel que se difunden a lo largo de vasos linfáticos, mucosas	Generalizado	Úlceras en todo el cuerpo denominadas pian bois

## Diagnóstico

Las distintas especies de *Leishmania* no se pueden identificar morfológicamente por lo que para lograr su clasificación se deben considerar ciertas características:

- a) Biológicas: tipo de desarrollo en el flebótomo vector, crecimiento en los medios de cultivo, desarrollo en el hospedador vertebrado.
- b) Bioquímicas: electroforesis de isoenzimas, análisis del ADN del núcleo y del kinetoplasto.
- c) Inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales y serotipificación del factor de excreción.
- d) Taxonomía numérica: para definir mejor la evolución molecular y la relación filogenética de los parásitos del género *Leishmania*.

La demostración directa o indirecta de *Leishmanias* en las muestras patológicas continúa siendo un importante desafío en el diagnóstico parasitológico de esta protozoonosis. A pesar de los avances significativos surgidos en investigaciones de biología molecular, muchas de sus técnicas con potencial aplicación diagnóstica, continúan siendo solamente herramientas de los laboratorios de investigación científica. Pocas de ellas se encuentran en fase de evaluación clínica y epidemiológica en áreas endémicas, y quizás, de manera optimista, muy pocas estarían a disposición de los laboratorios de diagnóstico de salud pública en la próxima década.<sup>49</sup> Mientras tanto seguiremos contando con el auxilio de los llamados métodos clásicos de la parasitología básica que todavía en

las manos de individuos experimentados diagnostican la gran mayoría de los casos.

A los antecedentes epidemiológicos y a los hallazgos clínicos se debe sumar la visualización del parásito para confirmar el diagnóstico. Exámenes adicionales como la intradermorreacción de Montenegro o leishmanina, la inmunofluorescencia indirecta y diversas pruebas serológicas son complementarias.

Métodos directos:

- Frotis por escarificado y/o aposición: Mediante la tinción del parásito con coloración de Giemsa. Utilizando material obtenido por biopsia cutánea o por escarificado de la lesión sospechosa. Los amastigotes se pueden observar de forma intra o extracelular.
- Cultivo: Es utilizado cuando se desea aislar una cepa para fines diagnóstico o clasificación taxonómica. La muestra se coloca en un medio de agar sangre de conejo al 15% medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) y los promastigotes de *Leishmania* crecen en varios días. Las diferentes especies de *Leishmania* no tienen la misma facilidad para ser cultivadas. La contaminación de la muestra es un problema constante y la eficacia para que crezcan en diferentes medios de cultivo es variable.
- Inoculación en animales de experimentación: Se reserva para obtener parásitos en casos que es imposible demostrarlo por otros métodos.

Pruebas de inmunodiagnóstico:

- Serología: Utilizada para medir el nivel de anticuerpos anti-leishmanias en sangre. Las técnicas utilizadas son:

a) Inmunofluorescencia indirecta: Es uno de los métodos serológicos más utilizados, cuya cuantificación se correlaciona bien con el grado de extensión de la infección, aunque los títulos de anticuerpos no suelen ser altos. No existe hasta el momento un consenso sobre la utilidad de este método como diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. Los estudios de sensibilidad de esta técnica revelan resultados que van desde el 66,6% hasta el 82%.<sup>50</sup>

b) Inmunoensayo enzimático (ELISA): Utiliza como antígenos extractos crudos de promastigotes o promastigotes completos. Como segundo anticuerpo se utiliza anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, obteniéndose una reacción de color que se puede cuantificar con un espectrofotómetro. Es una técnica altamente sensible y específica. Tiene como ventaja que pueden procesarse muchos sueros simultáneamente, pero como desventaja la inestabilidad de las enzimas.

Estos dos métodos tienen poca utilidad en las formas cutáneas localizadas y resultan más útiles en el seguimiento que en el diagnóstico de la enfermedad.

- c) La intradermoreacción de Montenegro o leishmanina se basa en la inyección intradérmica de 0,1 ml de una mezcla de promastigotes de diferentes especies ó promastigotes de una sola especie, muertos por calor, induce una reacción de hipersensibilidad retardada visible a las 48 - 72 horas de aplicada como una pápula eritematosa, indurada, mayor de 5 mm. La positividad indica contacto previo con el parásito sin que se pueda discernir si hay ó nó infección activa en el momento de la aplicación, no es diagnóstica por sí sola y tiene más valor en estudios epidemiológicos. Ante un paciente con leishmanina positiva hay que revisar los demás parámetros para definir la importancia de esa positividad en ese determinado momento.<sup>1</sup>

#### Caracterización de la *Leishmania*

Existe una necesidad real de diferenciar y caracterizar las poblaciones de los parásitos para mejorar el diagnóstico y tratamiento, evaluar las recaídas y reinfecciones, y establecer el pronóstico y control. Además, la taxonomía del género no está definitivamente cerrada, por los límites que impone la multiplicación clonal. En general se utilizan métodos extrínsecos (procedencia del sujeto infectado, lesión) métodos basados en el fenotipo; frente a métodos de caracterización intrínsecos que analizan el genoma del parásito y que son más sensibles y específicos en taxonomía.

## Técnicas fenotípicas de caracterización

La caracterización mediante isoenzimas ha sido la técnica de caracterización fenotípica más ampliamente utilizada. Son enzimas con la misma función pero que presentan diferente movilidad cuando se someten a un campo eléctrico. La caracterización enzimática se lleva a cabo en diferentes soportes, como son el acetato de celulosa, poliacrilamida y almidón, siendo este último el más utilizado y el que tiene mejor rendimiento.<sup>51</sup>

## Técnicas genotípicas de caracterización

Son técnicas basadas en el análisis del genoma que en principio permanece invariable durante toda la vida del parásito; incluso cuando ocurren cambios morfológicos a lo largo de su ciclo biológico, y aún bajo presión del sistema inmune del hospedador no se modifica. Los métodos genotípicos de caracterización se pueden encuadrar en dos grandes grupos:

- a) Análisis del Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos de Restricción. (RFLP)
- b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes.

El análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), fue una de las primeras técnicas que se usó ampliamente para detectar variaciones a nivel de la secuencia del ADN. Esta tecnología se basa en el principio de que es posible comparar patrones de bandas generados a partir de moléculas de ADN de diferentes individuos que han sido sometidas a

digestión con enzimas de restricción. Las diversas mutaciones que afectan a las moléculas de ADN de muchas maneras producen fragmentos de longitud variable. Estas diferencias de longitud de los fragmentos pueden observarse una vez realizadas la electroforesis, la hibridación y la visualización.

Las endonucleasas de restricción son capaces de encontrar dianas específicas en la secuencia de ADN (de 4 a 6 nucleótidos), y cortar en tantos fragmentos como dianas existan. Estos fragmentos se separan mediante electroforesis y se visualizan en geles de agarosa, lo que se conoce como fingerprinting. En los tripanosomátideos en general y en *Leishmania* en particular, la técnica de RFLP se ha venido realizando digiriendo el ADNk previamente separado del ADNg mediante gradiente de densidad en Cloruro de cesio (CsCl)/Bromuro de etidio (EtBr), y los fragmentos obtenidos se denominan de manera particular esquizodemas, los cuales presentan unos patrones útiles en estudios de caracterización del parásito.<sup>52,53,54</sup>

Fundamento: se basa en la detección de variaciones de la secuencia de ADN (codificante ó nó) que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción.<sup>55</sup>

En Abril de 1983, Kary Mullis dió a conocer la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR que es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de ADN.<sup>56</sup>

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5´-> 3´ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan sondas (primers). Estas son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3´ del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. Desnaturalización del ADN doble cadena.
2. Hibridación de los iniciadores a la zona 3´ específica de cada una de las hebras.
3. Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3´ complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la disminución de la temperatura (50-65°C).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

Al comienzo se usaba una *Taq* DNA polimerasa, enzima termoestable aislada de una bacteria termófila *Thermus aquaticus*, con la que es posible amplificar un fragmento de ADN hasta obtener millones de copias del mismo. Actualmente, también se emplean otras polimerasas como la Tth, aislada de *Thermus thermophilus*. En la reacción de PCR, se repiten unos 30 a 35 ciclos con la siguiente secuencia: a) desnaturalización de la doble hebra de ADN a 94°C; b) unión de oligonucleótidos específicos (cebadores) y diseñados complementariamente en los extremos del fragmento de ADN que queremos amplificar. La temperatura a la que ocurre este paso (50-70°C, en general) es crítica para el éxito de la reacción y depende en gran medida de las propiedades físico-químicas de los cebadores. La especificidad de la PCR reside tanto en una buena elección de los cebadores como de las temperaturas a la cual se van a unir a las cadenas sencillas de ADN; c) síntesis de cadenas de ADN a 72°C, catalizado por la *Taq* polimerasa, y con la adición de nucleótidos presentes en exceso en la reacción. (Figura 7) Es una técnica sencilla, sensible y específica; y permite la detección del parásito en todo tipo de muestras biológicas, en flebotomos y en cultivos.

Los ensayos de PCR basados en la amplificación de ADNk son los más sensibles para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea o visceral; sin

embargo, sólo identifican los parásitos hasta el nivel de género o sub-género. Por el contrario, los PCR dirigidos a amplificar regiones intergénicas en el ADN nuclear, son mejores para la identificación rápida y confiable de la especie de *Leishmania*.<sup>57</sup>

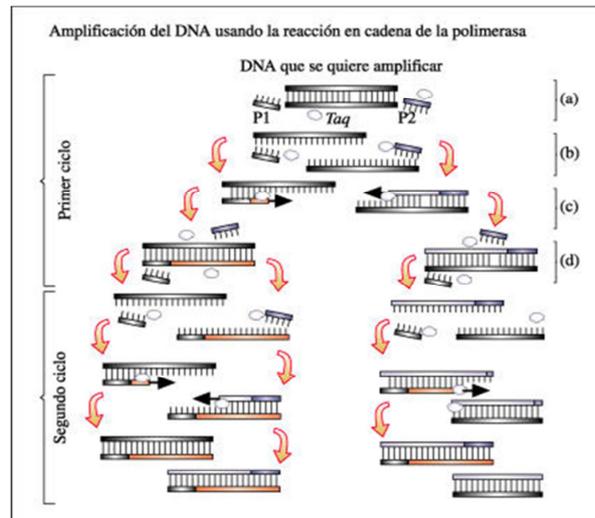


Figura 7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

a. La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como sondas, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato –dATP, dGTP, dCTP y dTTP–.  
b. La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación y una de elongación. Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95 °C, se separan las dos cadenas del DNA molde.  
c. Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.  
d. Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72 °C, temperatura a la cual la DNA polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.  
Fuente: <http://preujct.cl/biologia/curtis/libro/c16b.htm>

La PCR-RFLP en general, detecta pequeñas variaciones en un gen concreto, ya que el producto amplificado es digerido con diferentes enzimas de restricción que reconocerán ó nó su diana dependiendo de estas variaciones nucleotídicas. El patrón de bandas que se visualiza tras la electroforesis es útil para distinguir especies del subgénero *Viannia*, usando como diana el gen gp63.<sup>58</sup> Este gen que codifica la metaloenzima con acción proteasa del mismo nombre y las regiones intergénicas adyacentes, ha sido el más empleado para técnicas de PCR-RFLP en *Leishmania*, tanto para caracterización como para filogenia.<sup>59,60</sup>

También se entiende por PCR-RFLP la digestión de cualquier producto amplificado y que al digerirlo ofrece un patrón distinguible y diferente para cada especie o individuo, como pueden ser los minicírculos de ADNk. Esta aproximación ha sido útil para la detección de *L. tropica* y posteriores estudios epidemiológicos.<sup>61</sup>

## Tratamiento

El tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis 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 difieren según los casos. La toxicidad asociada a estos fármacos junto con la aparición de fenómenos de resistencia a los mismos, ha originado la necesidad de obtener nuevos fármacos de diverso origen como alternativa terapéutica.

- Antimoniales pentavalentes: Son los compuestos de primera elección y los más extensamente usados en la terapéutica de la enfermedad desde hace 75 años. El grupo consta de dos formas comerciales: Pentostam® (estibogluconato sódico) y Glucantime® (antimoniato de meglumina). El principal efecto es un descenso en los niveles de ATP del parásito, debido a la alteración de la glucólisis y de la oxidación de ácidos grasos. La dosis de fármaco empleada depende del contenido en antimonio (Sb) de éste. Actualmente la O.M.S. (2010) ha recomendado la administración 20 mg/Kg de peso/día durante 20 días en LC y 28 días en LCM y LV, sin dosis límite,

lo que garantiza un 90% a 95% de curación <sup>62</sup>. Su vía de administración es intramuscular o intravenosa. Las reacciones adversas más comunes son: dolor en el sitio de aplicación IM, náuseas, mialgias, artralgias, fatiga, cefalea, hiporexia, elevación de transaminasas y amilasas. En menor frecuencia pueden presentarse reacciones de hipersensibilidad, hepatitis tóxica, pancreatitis, arritmias cardíacas y nefrotoxicidad. Son frecuentes las alteraciones electrocardiográficas. En algunas series de pacientes la inversión o aplanamiento de la onda T y la elevación del segmento ST se han reportado entre un 4 y un 56%, el alargamiento del QT y la presencia de arritmias supraventriculares hasta en un 5%, e inclusive falla cardíaca, Torsade de pointes y muerte pueden producirse.

- Isotianato de Pentamidina: Se utiliza en caso de recidiva de las lesiones, por fracaso terapéutico de las sales antimoniales pentavalentes, o en aquellos casos de contraindicación médica para su uso (reacciones de tipo alérgico). Inhibe la síntesis de proteínas y fosfolípidos, <sup>63</sup> se une a regiones del ADN ricas en adenina- timina de forma reversible, produce un descenso en los niveles de ornitina, arginina y putrescina, siendo uno de sus blancos terapéuticos la síntesis de poliaminas; y produce el colapso del potencial de membrana mitocondrial. La dosis que se utiliza es de 4 mg/Kg/día por 4 dosis, cada tercer día, con una duración de 8 a 14 días del tratamiento. Se aplica intramuscular, de forma muy lenta y la persona debe guardar reposo después de la inyección. Su eficacia está entre 85 y 92%. Sus efectos secundarios son: mialgias moderadas, náuseas, malestar general, sabor metálico, dolor o calor en el sitio de aplicación, hipoglicemia e hipotensión.

- Miltefosina: Esta hexadecil-fosfocolina es un medicamento empleado inicialmente en más de 5.000 pacientes con diversos tumores epiteliales (cáncer de mama), al que se le demostró en el laboratorio importante actividad leishmanicida. Su acción se basa en la estimulación tanto de los linfocitos T como de la acción microbicida de los macrófagos, pero a diferencia de los antimoniales, su actividad no es T-dependiente. En la India se había mostrado en 1998 una alta eficacia en pacientes afectados por leishmaniasis visceral. La dosis recomendada es de 2,5 mg/kg peso/día por 28 días <sup>64</sup> por vía oral, dividida en tres dosis diarias y administrada con alimentos para reducir efectos gastrointestinales frecuentes como náusea, vómito y diarrea, que aunque leves, se presentan en 30 a 50% de los pacientes. En pacientes procedentes de áreas endémicas de *L. panamensis* se obtiene un 91% de curaciones. En Guatemala pacientes infectados con *L. braziliensis* y *L. mexicana* tuvieron tasas de curación de 53% mientras que en Bolivia tratando pacientes con formas severas de leishmaniasis mucosa por *L. braziliensis* se obtuvieron tasas de curación/mejoría superiores al 90%.
- Anfotericina B: Es el fármaco de segunda elección después de los antimoniales pentavalentes. Se trata de un antibiótico macrocíclico de bajo espectro y antifúngico, derivado de *Streptomyces nodosus*, cuyo modo de acción se basa en su unión al ergosterol de la membrana del parásito, produciendo alteraciones en la permeabilidad de la misma con pérdida de metabolitos. Sus efectos colaterales adversos en el paciente han hecho de la anfotericina B un fármaco empleado principalmente en casos de

leishmaniasis visceral recidivante y en áreas de alta resistencia a antimoniales.<sup>65</sup> No obstante, en los últimos años se han desarrollado nuevas formulaciones del compuesto conjugado con lípidos, lo que ha mejorado su índice terapéutico además de una disminución significativa de los efectos tóxicos en humanos. Estas moléculas lipídicas engloban medicamentos y liberan su contenido de manera retardada. El sistema utilizado más básico es el ABLC (Amphotericin B lipid complex), formado por complejos lipídicos de 1600 a 6000 nm unidos a la anfotericina B en forma de madejas. Los liposomas son los sistemas de dispersión más utilizados. Son vesículas de un diámetro menor de 100 nm, con una gran estabilidad, una vida media larga y sus efectos colaterales son mínimos.

- Inmunoterapia: En ratones resistentes a la enfermedad se ha comprobado el desarrollo de una respuesta Th1, con producción de IFN- $\gamma$  e IL-2. La respuesta Th2 conduce a la supresión de respuesta Th1 y a la activación de linfocitos B con producción de anticuerpos que son incapaces de eliminar al parásito intracelular. De esta forma, se ha observado que la administración conjunta de antimoniales pentavalentes e IFN- $\gamma$  acelera la eliminación de los parásitos, reduciendo por tanto los períodos de tratamiento. No obstante, se ha comprobado que la mejora en los sujetos tratados con antimoniales e IFN- $\gamma$  vá acompañada de un aumento en los niveles de IL-12. La combinación de Pentostam® e IL-12 ha dado buenos resultados en ratones infectados con *L. major*, observándose un cambio de una respuesta Th2 a una Th1 más efectiva.<sup>66</sup> Se ha creado en el Instituto de Biomedicina, una terapia inmunológica en base a promastigotes de *Leishmania*

mezclados con Bacilos de Calmette-Guerin (BCG), que con el tiempo ha demostrado ser de alta eficiencia, mínimos efectos colaterales y bajo costo. En la actualidad este constituye el tratamiento de primera elección del programa nacional de control para los pacientes con la forma clínica de leishmaniasis cutánea localizada.<sup>67</sup>

- Criocirugía: Todas las especies de *Leishmania* son termosensibles y la crioterapia ha mostrado sus ventajas en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada. A pesar de que este procedimiento es algo doloroso, no tiene ningún efecto secundario sistémico. Es un método sencillo, que no requiere el uso de anestesia local, produce una rápida destrucción de los parásitos de *Leishmania*. Como desventajas, se necesitan múltiples sesiones, con porcentajes de fallas terapéuticas mayores al 50 % y tasas de recaídas del 8%.<sup>68</sup> Se deben tener en cuenta algunos factores que influyen en la respuesta terapéutica como: tipo de leishmaniasis cutánea, especie, tamaño, duración y localización de las lesiones, el régimen terapéutico y su cumplimiento. Esquema de tratamiento: técnica abierta o con aplicador, con rangos de congelación entre 10-25 segundos.
- Antimoniales pentavalentes intralesional: La administración intralesional de antimoniales pentavalentes pueden ser muy efectiva y tiene muchas ventajas: alcanza una alta concentración del fármaco en el lugar de la infección y se reduce la toxicidad sistémica y los costos derivados del tratamiento. Es el tratamiento de elección de la leishmaniasis cutánea localizada. La dosis es de 0.2-1 ml inyectándolos en varios puntos de la

lesión y se repite la administración cada 1-3 semanas, con un número de dosis variable según la evolución.<sup>69</sup>

- Imiquimod: Pertenece a la familia de las imidazoquinolinas. Modifica la respuesta inmune, estimulando las vías de la inmunidad innata y adaptativa. Tiene propiedades antivirales, antitumorales e inmunoreguladoras. También induce la producción de citoquinas, principalmente las que se relacionan con la vía de activación del receptor Toll-like 7 (TLR7). El imiquimod ha demostrado tener actividad leishmanicida<sup>70</sup> induciendo la expresión de genes de la enzima óxido nítrico sintetasa y liberando el óxido nítrico. También estimula el interferón (IFN). Este producto es bien tolerado, presentando solo reacciones adversas a nivel local. Dosis: se aplica sobre la lesión 3 veces por semana.
- Terapia Fotodinámica: Se utiliza un compuesto fotosensibilizador que en presencia de luz y oxígeno molecular se activa produciendo especies reactivas de oxígeno induciendo la muerte de la célula blanco por apoptosis o necrosis. Estudios in vitro han mostrado que la ftalocianina de aluminio clorada o ftalocianina de zinc son fototóxicas para *Leishmania spp.*<sup>71</sup> Posterior a la aplicación, se realiza la irradiación con luz visible a 670 nm. Este proceso ha demostrado la inhibición del crecimiento in vitro de promastigotes de *Leishmania*.
- La nitazoxanida, la tizoxanida y el análogo sintético 4-nitro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-benzamida (NTB) son otras alternativas.<sup>72</sup> Se siguen realizando estudios para nuevas terapias: poliproteínas recombinantes, terapias génicas, entre otras.

El desarrollo en los últimos años de líneas de investigación orientadas a la obtención de nuevos compuestos con valor terapéutico frente a la leishmaniasis, se ve justificado ante la creciente aparición de problemas asociados al tratamiento clásico de la enfermedad. Entre éstos destaca la aparición de fenómenos de resistencia frente a los medicamentos tradicionales seguido de la toxicidad asociada a los fármacos, la tolerancia a los mismos por parte del paciente dependiendo de su estado físico, la falta de un diagnóstico precoz que impida el aumento de la carga parasitaria y el aumento del número de casos asociados a estados de inmunosupresión.<sup>73,74,75,76</sup>

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar e identificar especies de *Leishmania* y su variabilidad genética, a partir de biopsias de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y su posible relación con las manifestaciones clínicas implementando la técnica molecular PCR-RFLP.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar la técnica de PCR para el diagnóstico molecular de la leishmaniasis cutánea localizada y las especies de *Leishmania* involucradas, en pacientes que asistieron a la consulta de leishmaniasis del Instituto de Biomedicina en Caracas.
2. Identificar la variabilidad genética dentro de una misma especie de *Leishmania* con la técnica molecular PCR-RFLP.

## MÉTODOS

### Tipo de Estudio:

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo y experimental; en pacientes de la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, adscrito a la Universidad Central de Venezuela y al Ministerio del Poder Popular para la Salud, en el período de mayo a noviembre del año 2009.

### Población y muestra:

#### Pacientes:

Se incluyeron 53 pacientes de ambos sexos, quienes asistían por primera vez a la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina y presentaban lesiones sospechosas de leishmaniasis cutánea localizada. Para la selección de los pacientes se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

#### Criterios de Inclusión:

1. Pacientes que asistían por primera vez a la consulta de Leishmaniasis, con sospecha de leishmaniasis cutánea localizada.
2. Mayores de 5 años.
3. Pacientes que presenten lesiones de menos de 3 meses de evolución.
4. Pacientes quienes hayan firmado el consentimiento informado.

#### Criterios de Exclusión:

1. Pacientes con lesiones en pabellones auriculares.
2. Pacientes recibiendo tratamiento anti-*Leishmania* o que recibieron en los últimos 6 meses.
3. Pacientes embarazadas

El protocolo para realizar este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas de Caracas y los pacientes y/o familiares que participaron dieron su consentimiento.

Instrumentos de recolección de datos:

A cada paciente incluido en el estudio, se le realizó una historia clínica detallada que incluía: datos epidemiológicos (edad, sexo, sitio de infección), examen físico, descripción clínica de las lesiones (localización, tamaño, número de lesiones, tiempo de evolución, forma clínica), realización de frotis por escarificado, aplicación de prueba intradérmica (leishmanina), cultivo, tratamiento, fotografías de las lesiones y firma de consentimiento informado (Anexo 1 y 2).

Posteriormente se realizó toma de biopsia de piel para realizar el diagnóstico parasitológico, histológico y molecular de la leishmaniasis cutánea localizada.

Materiales y métodos:

Materiales

La obtención de la población del estudio se realizó con la colaboración del personal de salud de la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina (inspectores y médicos). Una vez tomadas las biopsias de piel se llevaron al laboratorio de Ingeniería genética del Instituto y se utilizaron materiales de éste laboratorio para realizar la extracción del ADN de las biopsias.

Biopsia de piel:

Materiales: Guantes de cirugía, agua destilada o solución salina fisiológica estéril, jabón quirúrgico o solución yodada, alcohol al 70%, agujas estériles, gasas estériles, jeringas de 1cc, xilocaína al 2% sin epinefrina, punch de 3 a 4 mm, mango y hojas de bisturí No. 11 y 15, tubos Eppendorf con medio líquido (NaCl 8.5g + Glucosa 15g en 1 L), adhesivo, marcadores.

1. Procesamiento de biopsia de piel y extracción de ADN:

Materiales: Biopsia de piel, tubos Eppendorf, medio líquido con antibiótico, macerador de plástico, buffer de lisis TAE (10 mM tris-HCl + 10 mM EDTA), Proteinasa K, incubadora ó bloque térmico (Standard Heatblock), termómetro, centrifuga (Centrifuge 5415D eppendorf), pipetas de 100 µl y 200 µl, puntas descartables, vaso de precipitado, fenol/cloroformo, etanol, buffer TE.

2. Reacción de la cadena de la Polimerasa (PCR):

Materiales: oligonucleótidos (5 µl), mezcla de nucleótidos (dNTPs) (5 µl), Buffer de reacción 10 x (2.5 µl), agua estéril (10 µl), MgCl<sub>2</sub> (1 µl), *Taq* polimerasa (0.5 µl), ADN de las muestras (3-5 µl), pipetas de 10 µl, 20 µl,

100 µl; tubos Eppendorf, aceite mineral, marcadores de controles positivos y negativos para *Leishmania*, marcador molecular, termociclador.

3. Electroforesis: agarosa 1%, TBE 1x, Bromuro de Etidio, cámara de electroforesis, azul de bromofenol, transiluminador UV, película polaroid.

4. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP):

Materiales: ADN reamplificado, agarosa al 1%, isopropanol, centrífuga, enzima Hae III (Gibco-BRL), buffer de enzima de restricción, agua estéril.

## Métodos

1. Biopsia de piel:

### Técnica:

- Previa colocación de guantes, se realizó la limpieza de la lesión con solución salina fisiológica estéril y jabón quirúrgico (solución yodada). Posteriormente se hizo la limpieza con alcohol al 70%. Si había costra ésta se retiró.
- Se infiltró el borde de la úlcera con 1 ml de xilocaína al 2% sin epinefrina.
- Sobre el borde de la úlcera se practicó una incisión elipsoidal para obtener un bloque de tejido de 3-4mm que llegue hasta la hipodermis. Se evitó que sea muy superficial o que solamente incluya la costra en la muestra. Al tomar la muestra con punch nos cercioramos que comprometía tejido celular subcutáneo.
- Se tomó el fragmento de tejido con la punta de la aguja. No se usaron pinzas que pudiesen dañar el tejido por compresión.

- Se introdujo la muestra en el tubo de Eppendorf con medio líquido, se tapó y se selló con adhesivo. Se verificó que el tejido no quedó adherido a las paredes del tubo.
- Se marcó debidamente el frasco con el nombre del paciente, la fecha de la toma de la muestra y se llevó al laboratorio de ingeniería genética para su procesamiento.

## 2. Procesamiento de biopsias y extracción del ADN:

### Técnica:

Después de ser tomada la biopsia, se llevó al laboratorio de ingeniería genética en donde se realizó la extracción del material genético.

- En la cámara de flujo laminar (NUAIRE, Biological Safety Cabinets), se realizó la maceración de la biopsia en el tubo de Eppendorf con ayuda de un macerador. Se tomaron 25  $\mu$ l de ésta solución + 10  $\mu$ l de medio líquido con antibiótico para realizar el cultivo en medio de agar sangre.
- Se le agregó a cada muestra 2  $\mu$ L de Proteinasa K. Se calentó a 56°C por 3 horas en un bloque térmico. Posteriormente se dejó la muestra a -86°C ó se procedió con los siguientes pasos.
- Se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo de Eppendorf nuevo.
- Se realizó la extracción con fenol/cloroformo (100  $\mu$ l) y se mezcló por inversión.

- Se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm. Se tomó la fase acuosa y se pasó otro tubo Eppendorf nuevo.
- Se precipitó el ADN con 2 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> volúmenes de etanol frío al 100%. Se almacenó a -80°C 1 hora o a -20 °C toda la noche.
- Se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento. Se resuspendió en 30 µl de Buffer TE y se guardó a 4°C hasta que se utilizó para realizar la PCR. (Fotos 1-5)



**Foto 1.** Tubos Eppendorf con biopsias maceradas y proteinasa K



**Foto 2.** Bloque térmico. Las muestras son llevadas a 56°C por 3 horas.



**Foto 3.** Extracción con fenol/cloroformo.



**Foto 4.** Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.



**Foto 5.** Posterior a realizar la centrifugación, se observan dos fases. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el sedimento. Se agregan 30  $\mu$ L de buffer TE y se lleva a una temperatura de 4°C hasta ser usado para la técnica de PCR.

### 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Técnica:

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su ADN molde y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo ADN entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo.

- Para la PCR se utilizó el ADN extraído de la biopsia.
- Se realizó con 2  $\mu$ l de este ADN en una mezcla de reacción que contenía 5  $\mu$ L (200 ng) de cada primer, LB1 y LB2 (5` GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3` y 5`CTA ATT GTG CAG GGG GAG G 3`) ó LM1 y LM2 (5`GAG GCC CCG AGC TTT GAC C3` y 5`GGT GTA AAA TAG GGG CGG ATG CTG TG 3`),

respectivamente; 5 $\mu$ l (2,5 mM) de deoxinucleótidos (dNTPs), 0.5 $\mu$ l (2,5 U) de *Taq* Polimerasa (Promega), 2.5 $\mu$ l de buffer 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,1% gelatina), 1 $\mu$ l (20 mM) MgCl y 10 $\mu$ l H<sub>2</sub>O por cada reacción. Se multiplicó cada uno de estos reactivos con el número de muestras que se estudiaron. Posteriormente se dividió el volumen total de esta mezcla por el número de muestras. Se tuvo en cuenta que debe haber un control positivo y otro control negativo que se suma a las otras muestras.

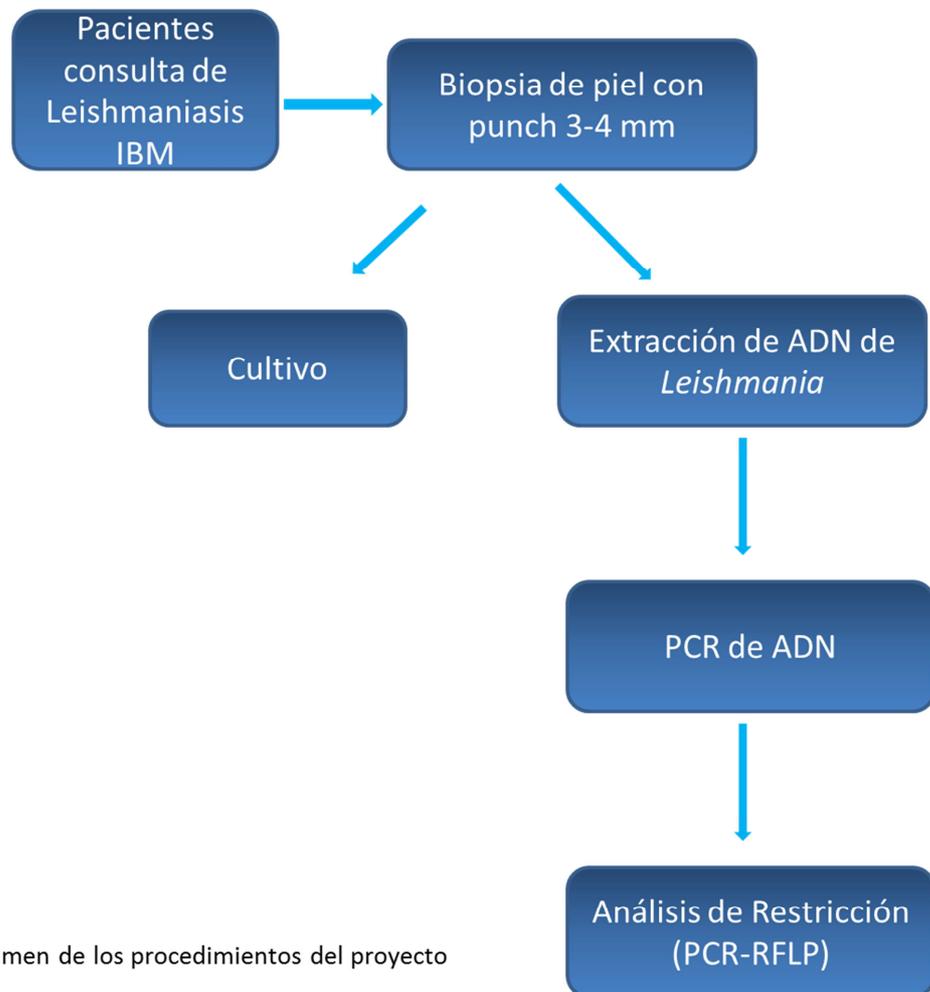
- La mezcla se cubrió con 5 $\mu$ l aceite mineral y se colocó en termociclador (PT 100, MJ Research) para llevar a cabo la reacción, la cual se realizó durante 35 ciclos de amplificación; cada ciclo consistió de 1 minuto a 94°C para desnaturalizar el ADN, 1 min a 60°C para la alineación de los primers a su secuencia complementaria y finalmente 1 min a 72°C para la extensión del fragmento deseado.
- Se preparó un gel de agarosa al 1% (1g de agarosa + 100 mL TBE 1x). Se agregó 1  $\mu$ l de Bromuro de Etidio de 10mg/mL para colorear la agarosa.
- La agarosa se colocó en un molde para electroforesis hasta que polimerizó y posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis (Horizon® 11-14 Gel electroforesis apparatus) con buffer TBE (90mM tris, 89mM ácido bórico, 2,5 M EDTA, pH 8,3).
- En cada uno de los pozos se colocó 8 a 10  $\mu$ L del producto amplificado + 3  $\mu$ L de colorante (azul de bromofenol). También se colocó un control positivo y otro negativo, así como un control de corrido electroforético, se utilizó el marcador de peso molecular.
- Se aplicó un voltaje de 60 a 100 V dependiendo del tamaño del gel.

- Los fragmentos de ácidos nucleicos se visualizaron con luz ultravioleta por medio de un transiluminador (TFX-35M Transiluminator) y se fotografiaron con una película Polaroid (Polaroid gel cam DS 34) y por el Multi Doc-it (Digital Imaging System UVP).
- El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó empleando el marcador de ADN (PM  $\phi$  X174 rango 72-1353 pb).

#### 4. Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP):

- De los productos de PCR se tomaron 2  $\mu$ l para reamplificar en 50  $\mu$ l utilizando el doble de cada reactivo.
- Posteriormente se tomaron 5  $\mu$ l para realizar una electroforesis en agarosa al 1.5%. Los 45  $\mu$ L restantes se precipitaron en 90  $\mu$ l de isopropanol a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 hora.
- Luego de la precipitación, se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm, se descartó el sobrenadante, se secó el sedimento (probablemente no visible), y se resuspendió en 10  $\mu$ l de TE.
- Se utilizaron 5  $\mu$ l del ADN del producto precipitado para hacer la digestión con la enzima de restricción Hae III.
- Para la digestión se utilizaron: 5  $\mu$ l de ADN, 2  $\mu$ l de buffer de la enzima de restricción, 1  $\mu$ l de la enzima de restricción Hae III y 10  $\mu$ L de agua, para un total de 17  $\mu$ l con los cuales se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1%.

- El análisis del tamaño de los fragmentos nos permitió establecer los patrones de bandas característicos para cada especie o grupo de especies, registrando la presencia o ausencia de bandas en cada caso.
- Los resultados obtenidos son comparados con los patrones de referencia internacionales para cada especie de *Leishmania* de la OMS.



**Figura 8.** Resumen de los procedimientos del proyecto

Tratamiento estadístico:

Se calcularon frecuencias y porcentajes de las variables nominales; a su vez, los resultados se presentaron en tablas de una y de dos entradas de acuerdo a las variables analizadas; por otro lado, se representaron estadísticamente dichos datos en gráficos de barras y de sectores. Se empleó la aplicación de office Microsoft Excel en la realización de gráficos estadísticos.

## RESULTADOS

### Muestra Total.

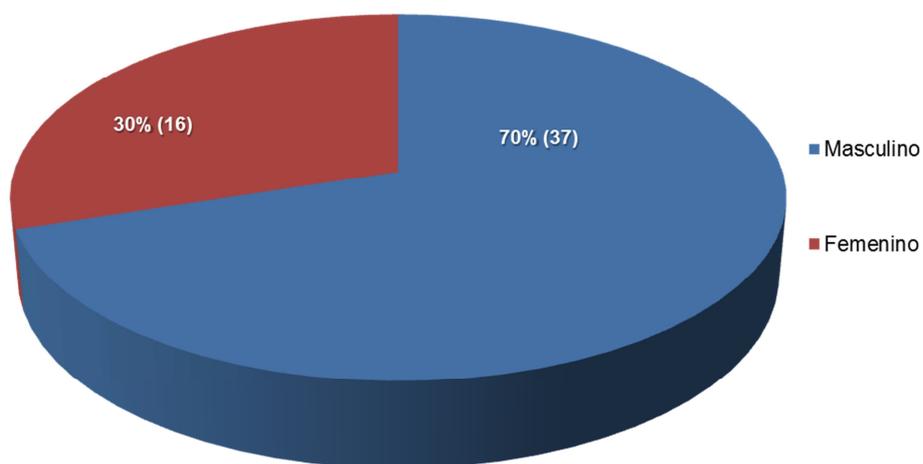
Se evaluaron 53 pacientes de la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, adscrito a la Universidad Central de Venezuela y al Ministerio del Poder Popular para la Salud, en el período mayo a noviembre del año 2009, que asistieron por primera vez a la consulta y presentaron lesiones sospechosas de LCL.

Como hallazgos epidemiológicos encontramos que 70% de los pacientes fueron del género masculino (37/53) y el 30% del género femenino (16/53) (Figura 9); con edades comprendidas entre los 11 y 86 años (Figura 10). El promedio de edad de los pacientes fue de 36 años. El número de lesiones clínicas fueron desde una única lesión hasta 4 lesiones, con un promedio de 1.5 lesiones (Foto 6, Figura 11), y su tamaño fue desde 12 hasta 2500 mm<sup>2</sup> de diámetro.(Foto 7)

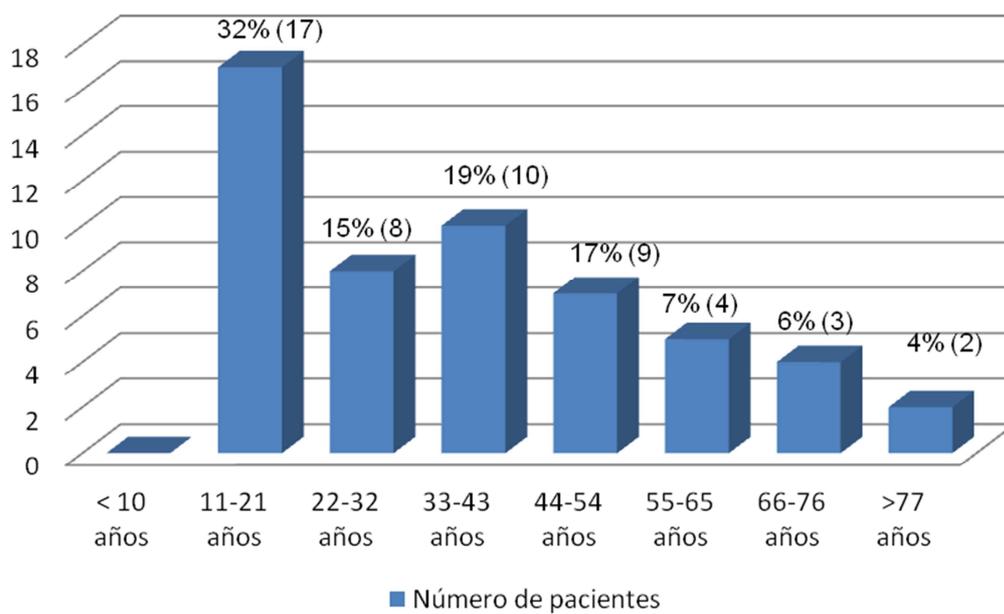
En las extremidades inferiores se localizaron la mayoría de lesiones (35 lesiones), en comparación con las extremidades superiores (32 lesiones). (Figura 12; Foto 8)

El área demográfica en donde la mayoría de pacientes adquirió la infección fue en el Estado Miranda en un 49% (26 pacientes), seguido del Estado Vargas con 34% de los casos (18 pacientes), 11% Distrito Capital, y 2% respectivamente en el Estado Aragua, Guárico y Táchira. (Figura 13) En el Estado Miranda el

**Figura 9.** Distribución por género de los pacientes con LCL (N=53).

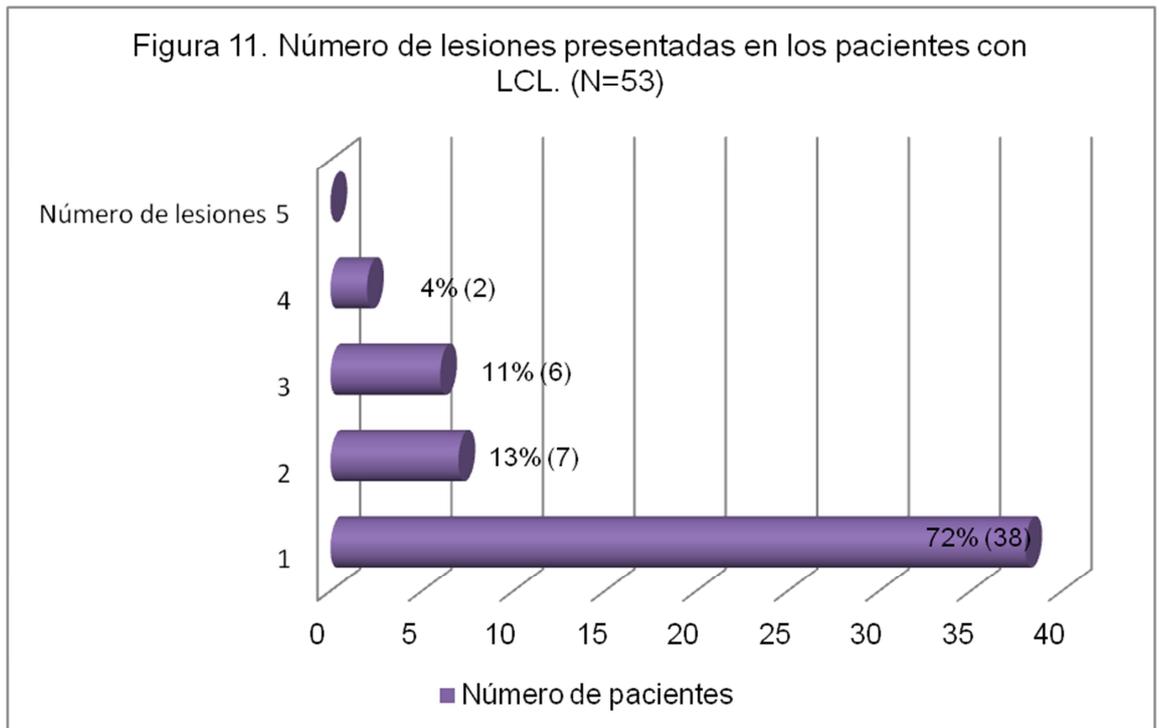


**Figura 10.** Distribución por grupos etáreos (N=53)





**Foto 6.** Foto clínica de un paciente incluido en el estudio. Presenta úlceras con bordes eritemato-violáceos, elevados, brillantes, con base granulomatosa y presencia de algunas costras sero-hemáticas en miembro inferior.



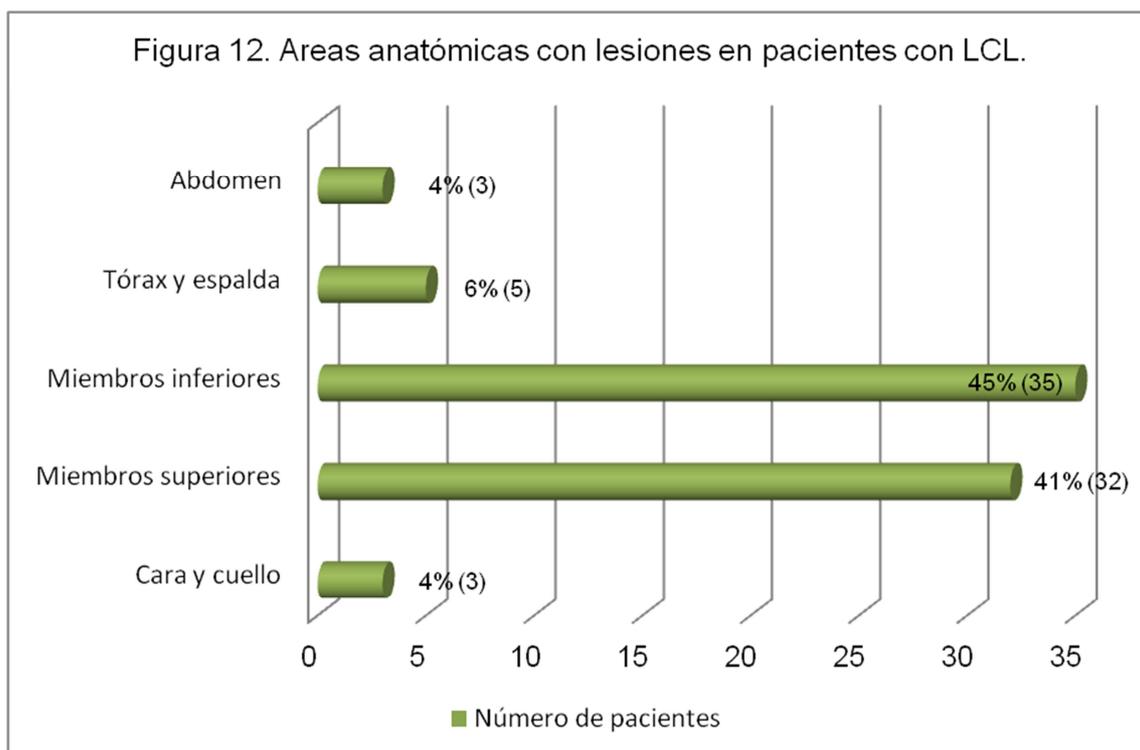


**Foto 7.** Fotografías clínicas que muestran los diferentes diámetros de las úlceras.

mayor porcentaje de los pacientes provenía de Turgua con un 27% (7 pacientes), seguido de Guatire con 19% (5 pacientes), y 15% respectivamente en Mariche y Guarenas. De Petare 12% (3 pacientes) y en 4% de Cúa y los Valles del Tuy. (Figura 14)

El tiempo de evolución antes del diagnóstico fue en promedio de 5.8 semanas aproximadamente con un rango de 2 a 12 semanas. (Figura 15)

El 98% (52/53) de los pacientes, se les confirmó parasitológicamente el diagnóstico de LCL a través de uno ó más procedimientos efectuados: leishmanina, frotis por escarificado, cultivos, biopsias cutáneas y/o PCR.



Los resultados de los métodos diagnósticos fueron: 96% de los pacientes (51/53) tuvieron una leishmanina positiva (Foto 9, Figura 16), 75% (40/53) tenían un frotis por escarificado positivo (Figura 17), 66% (35/53) con cultivo positivo y 47% (25/53) con presencia de amastigotes en las biopsias (Figura 18 y 19). Observamos que la leishmanina es el procedimiento más sensible, sin embargo no es un método específico para el diagnóstico de leishmaniasis activa. Esta prueba puede dar falsos positivos e incluso pruebas cruzadas, además de no

discriminar entre especies. (Tabla 2) También se encontró que el 36% (19/53) de los pacientes tenían positivos todos los métodos diagnósticos.



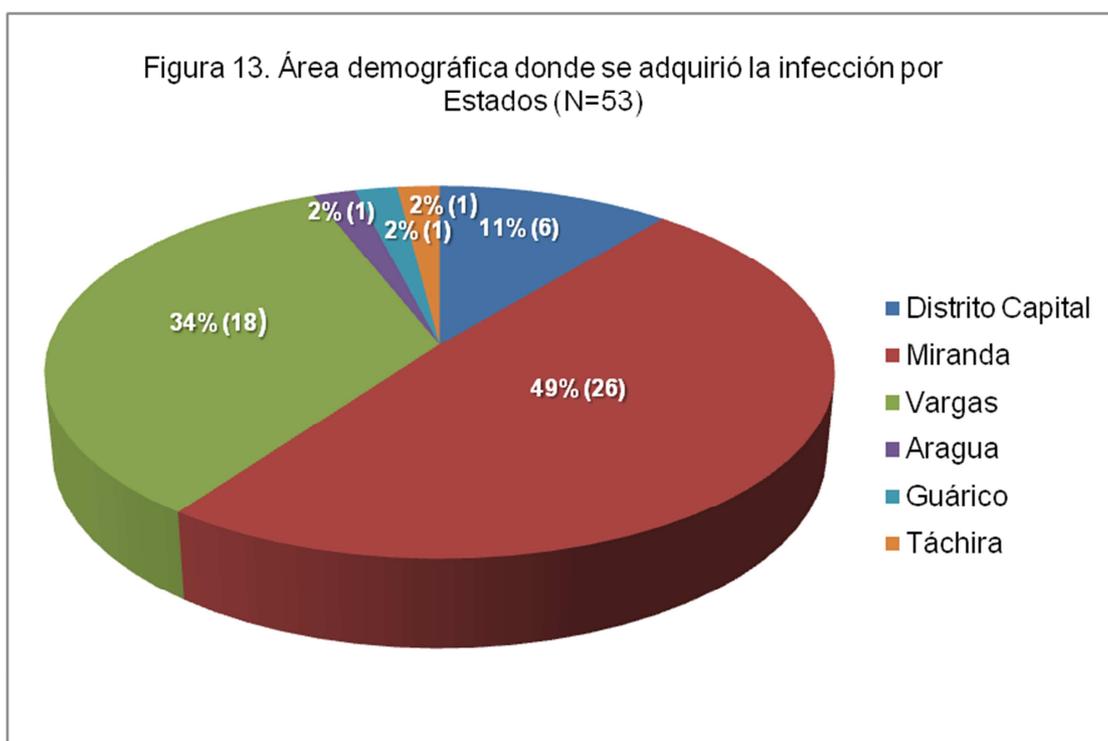
**Foto 8.** Fotos clínicas donde se observan las diferentes áreas anatómicas de las lesiones sugestivas de LCL

Con respecto al tratamiento, se observó que el 61% (32/52) de los pacientes recibió sólo inmunoterapia, seguido del 21% (11/52) que recibieron terapia combinada (inmunoterapia y Glucantime® intramuscular). Se utilizaron otras opciones terapéuticas como: Glucantime® intramuscular e infiltración intralesional, crioterapia, miltefosina y terapia fotodinámica (Tabla 3).

Un paciente solo presentó como prueba positiva la biopsia cutánea reportada como granuloma por agente vivo. El diagnóstico de LCL se estableció

por la clínica y por este resultado. Este paciente recibió como tratamiento dos dosis de inmunoterapia, con un tiempo de curación de 6 semanas.

El tiempo de resolución de las lesiones hasta reepitelización completa en un 100%, fue en un 28%, de 12 a 15 semanas con un promedio de 13.5 semanas. (Figura 20)



A un universo de 53 pacientes se les tomó biopsias cutáneas con úlceras sugestivas de LCL. Se realizó la extracción de ADN y se evidenciaron los productos de PCR a través de electroforesis con gel de agarosa al 1%, coloreado con bromuro de etidio, utilizando primers o sondas de secuencias repetitivas específicas para *L (V.) braziliensis* y *L (L.) mexicana*.

Figura 14. Distribución en el Estado Miranda de los pacientes con LCL (N=53)

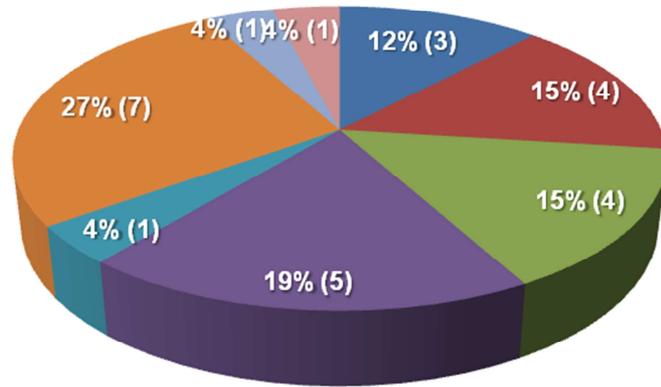
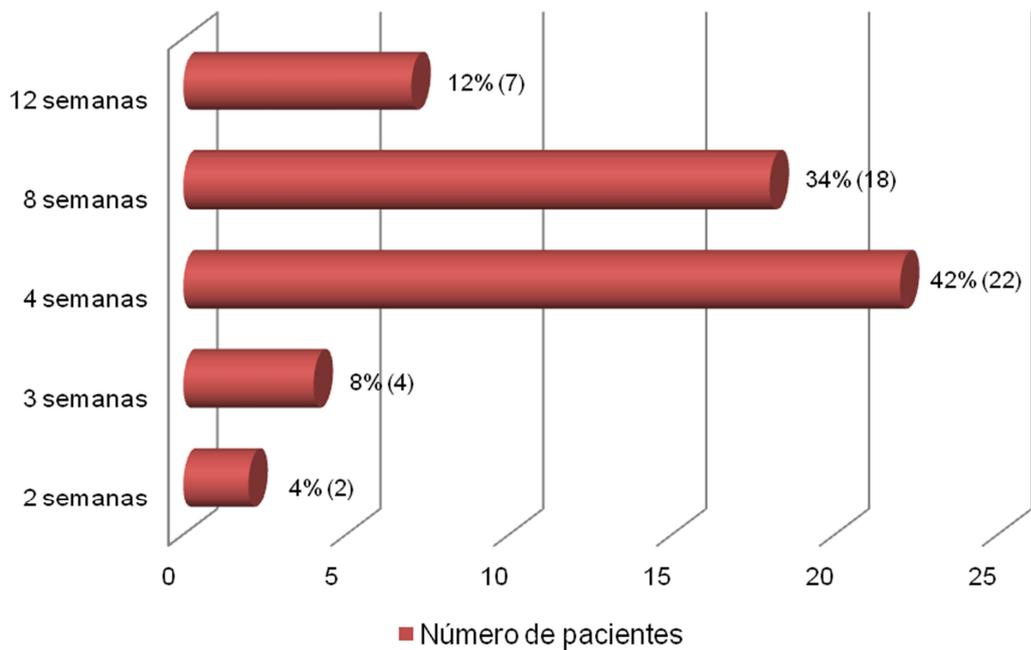


Figura 15. Tiempo de evolución antes del diagnóstico de LCL. (N=53)





**Foto 9.** Ejemplos de la reacción de hipersensibilidad a la prueba intradérmica (leishmanina positiva)

**Figura 16.** Leishmanina en los pacientes con LCL. (N=53)

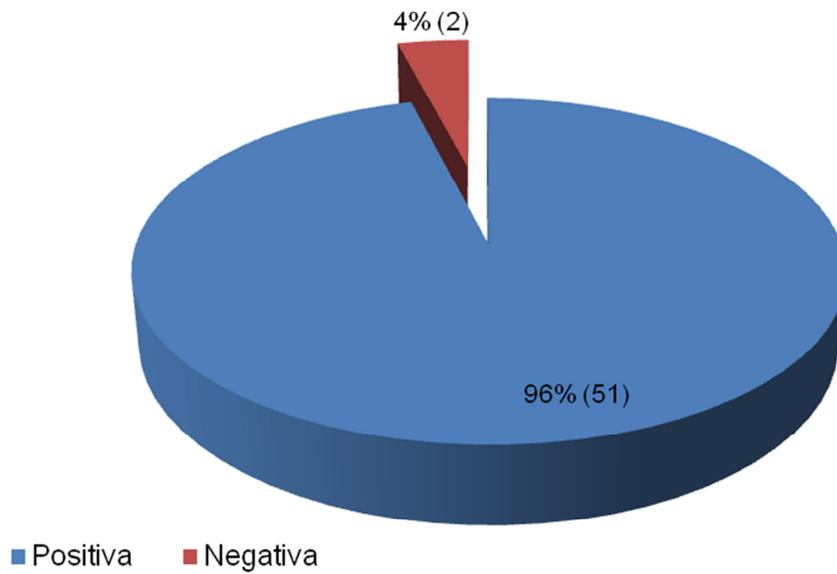


Figura 17. Frotis por escarificado en los pacientes con LCL.  
(N=53)

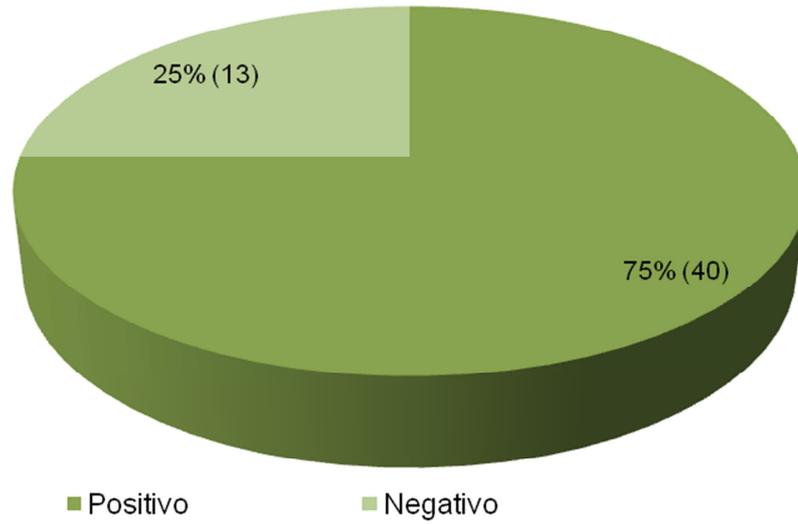
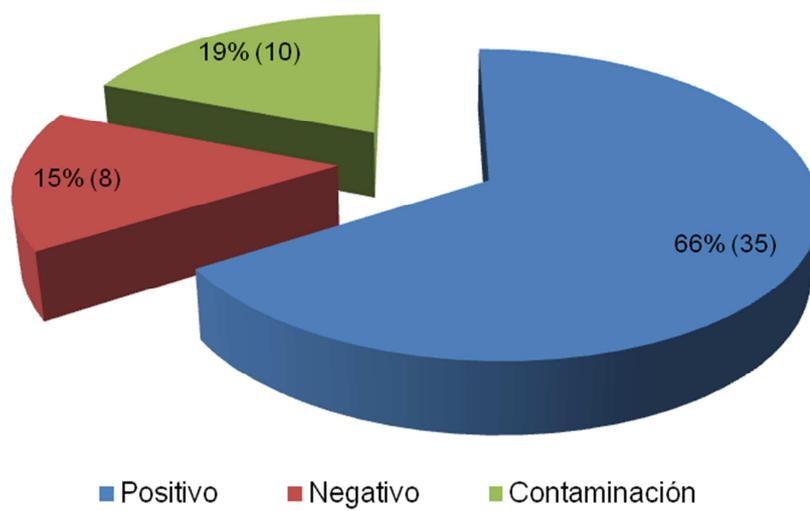
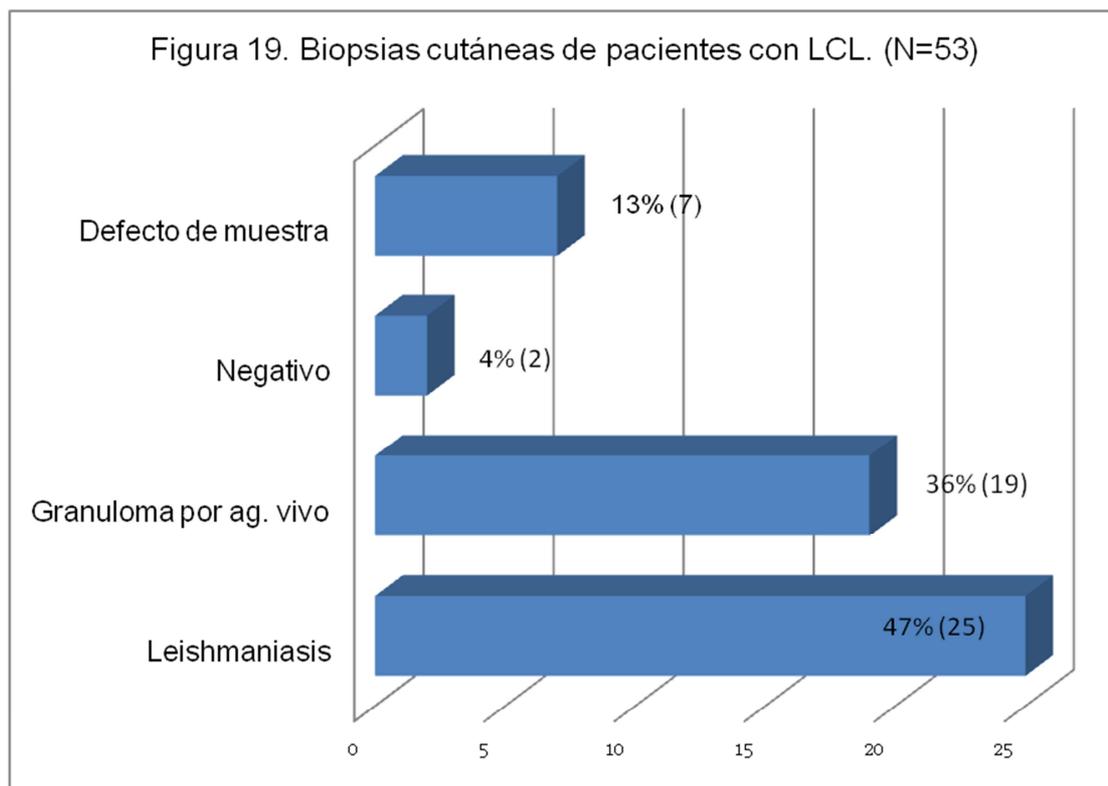


Figura 18. Cultivos realizados en los pacientes con LCL.  
(N=53)





**Tabla 2.** Comparación de métodos diagnóstico (N=53)

Método Dx	IDR	Frotis	Cultivo	Biopsia	PCR
Positivo	51/53 (96%)	40/53 (75%)	35/53 (66%)	25/53 (47%)*	38/53 (72%)

IDR: Intradermorreacción (leishmanina)

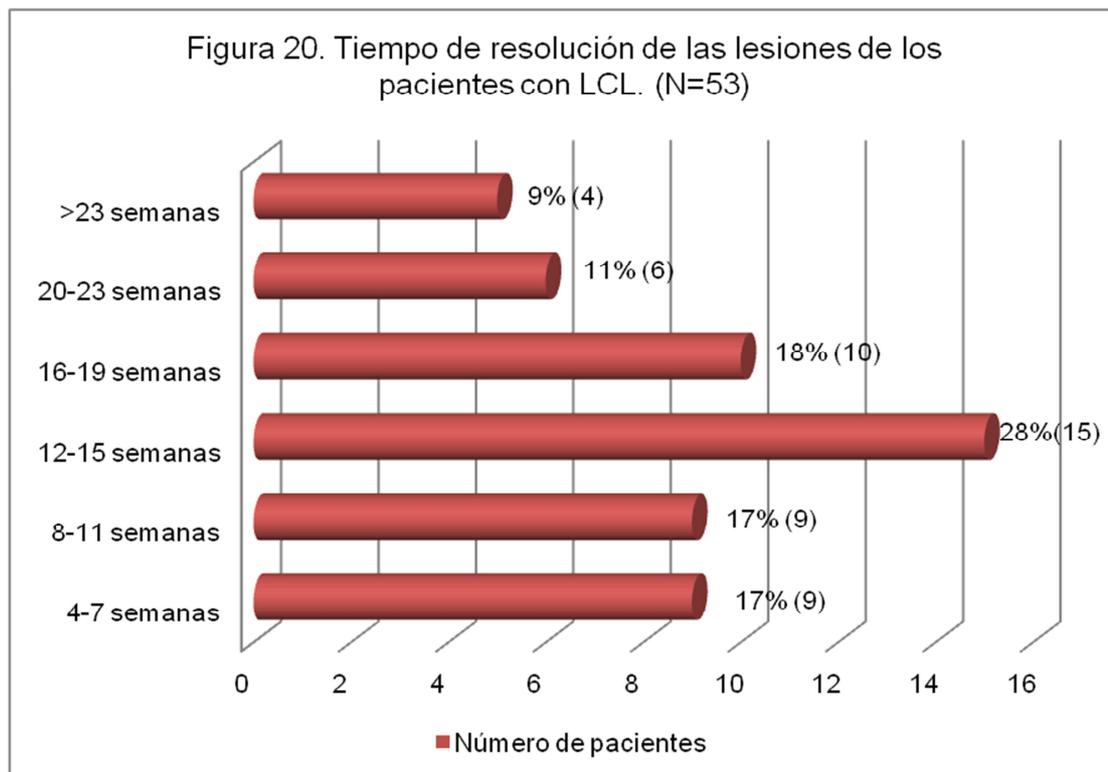
\*Se obtuvieron 19 biopsias con reportes histológicos sugestivos de leishmaniasis, aunque no se identificaron los amastigotes.

Los resultados obtenidos con esta prueba determinaron que el 72% (38/53) de las muestras fueron positivas y 28% (15/53) negativas para la identificación del género *Leishmania*. (Figura 21). De las muestras positivas por PCR, 76% (29/38) fueron positivas para la especie *L (V.) braziliensis* y 24% (9/38) fueron positivas para la especie *L (L.) mexicana*. (Figura 22) Todas las muestras que dieron negativas, se les realizó una nueva reamplificación para confirmar su negatividad.

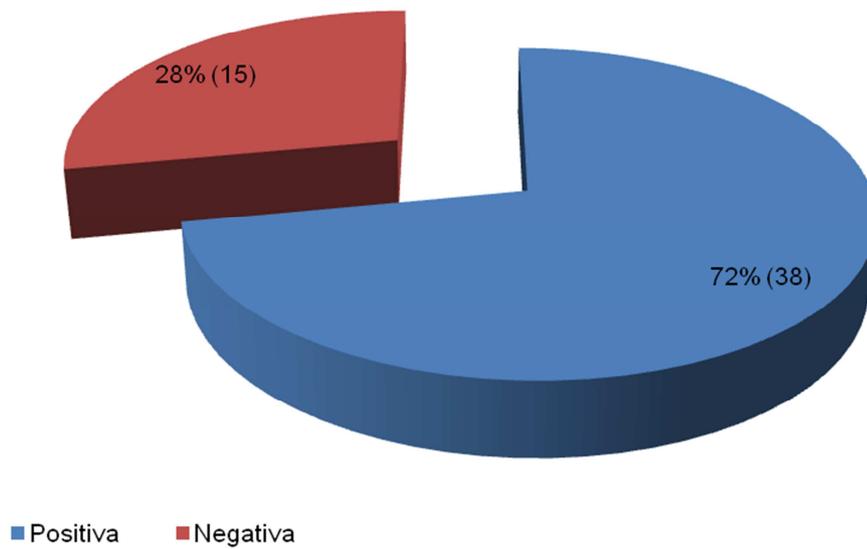
**Tabla 3. Tratamiento (N=52)**

TRATAMIENTO	PACIENTES
INMUNOTERAPIA	61% (32/52)
INMUNOTERAPIA + GLUCANTIME® IM	21% (11/52)
INMUNOTERAPIA + GLUCANTIME® IL	4% 2/52
GLUCANTIME® IM + GLUCANTIME® IL	4% 2/52
INMUNOTERAPIA + CRIOTERAPIA	4% 2/52
GLUCANTIME® IM	2% 1/52
INMUNOTERAPIA + GLUCANTIME® IM+ GLUCANTIME® IL + MILTEFOSINA	2% 1/52
INMUNOTERAPIA + TFD	2% 1/52
TOTAL	100% (52)

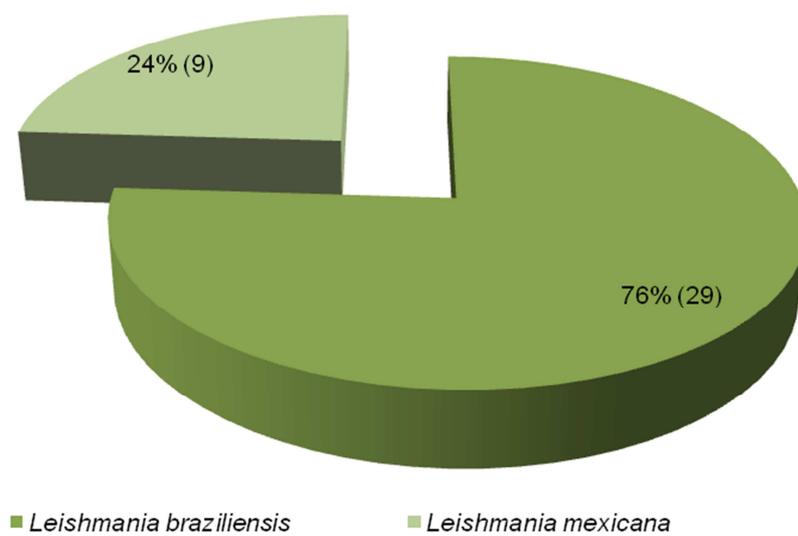
Esquema Glucantime®: 20 mg/kg peso/ 20 días  
IM: intramuscular  
IL: intralesional  
TFD: Terapia fotodinámica



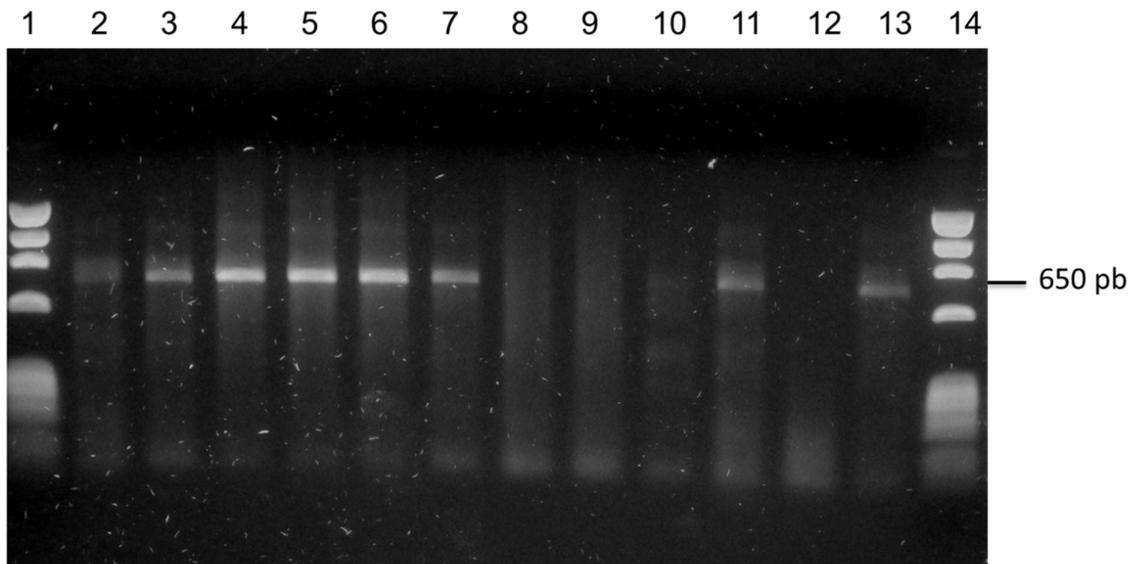
**Figura 21.** Resultados de la PCR para la identificación de *Leishmania spp* (N=53)



**Figura 22.** Resultados de PCR para la identificación de especies de *Leishmania* (N=53)



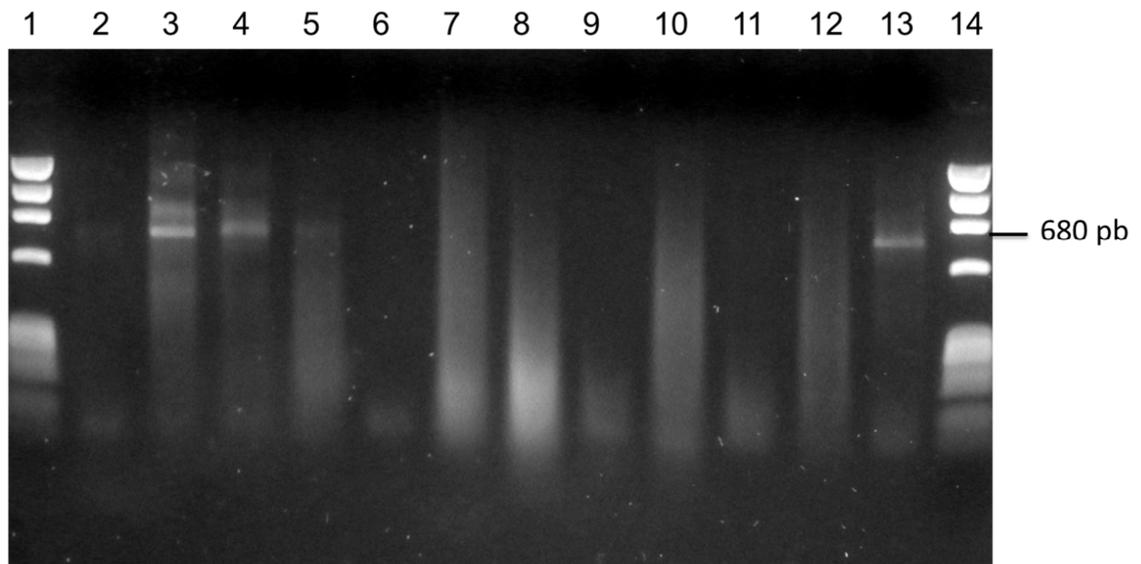
La Figura 23 muestra los resultados obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa al 1%, coloreado con bromuro de etidio, de los productos de PCR amplificados utilizando primers (LB1, LB2) específicos para la región variable de minicírculos de *Leishmania braziliensis*. (LB1 y LB2: 5` GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3` y 5`CTA ATT GTG CAG GGG GAG G 3`). En la línea L1 y L14 se observan los patrones de PM (PM  $\phi$  X174 rango 72-1353 pb); las líneas de L2 a L11 son los productos de PCR amplificados que fueron obtenidos a partir de los ADN de los diferentes pacientes en estudio, donde se observa su positividad o no al comparar la banda con el control positivo (L13). (Figura 25. PCR *L.(V.) braziliensis* ).



**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. Sondas utilizadas: LB1 LB2. Líneas: 1 y 14 PM (Marcador peso molecular  $\Phi$  X174). Líneas 2 al 11 productos de PCR, Líneas 2-7 y 11 bandas de 650 pb (*L. (V.) braziliensis*), 8-10 sin bandas, 12 control negativo, 13 control positivo.

En la Figura 24 posterior a la electroforesis en gel de agarosa al 1%, se generan productos de PCR, utilizando primers (LM1, LM2) específicos para la

región variable de minicírculos de *Leishmania mexicana*. (LM1 y LM2: 5`GAG GCC CCG AGC TTT GAC C3` y 5`GGT GTA AAA TAG GGG CGG ATG CTG TG 3`). En la línea L1 y L14 se observan los patrones de PM (PM  $\Phi$  X174 rango 72-1353 pb); las líneas de L2 a L11 son los productos de PCR obtenidos de los diferentes pacientes observándose su positividad o nó al comparar la banda con el control positivo (L13). (Figura 26. PCR *L.(L.) mexicana* ).



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. Sondas utilizadas: LM1 LM2. Líneas: 1 y 14 PM (Marcador peso molecular)  $\Phi$  X174. Líneas 2 al 11 productos de PCR, Líneas 2-5 bandas de 680 pb (*L. (L.) mexicana*) , 6-11 sin bandas, 12 control negativo, 13 control positivo.

Resultados de los 38 pacientes con PCR positivas.

Tuvimos en cuenta a los 38 pacientes que presentaron la prueba de PCR positiva para *Leishmania* y analizamos los hallazgos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos de este grupo: el 74% (28/38) de los pacientes pertenece al género

masculino, con un promedio de edad de 35 años (rango 11-86 años). Se observó que el 73% (28/38) de los casos, sólo presentaron una única lesión cutánea, y el mayor número de lesiones (4) fue en los casos de *L (V.) braziliensis* al igual que el mayor diámetro de las úlceras (2000 mm<sup>2</sup>). (Tabla 4)

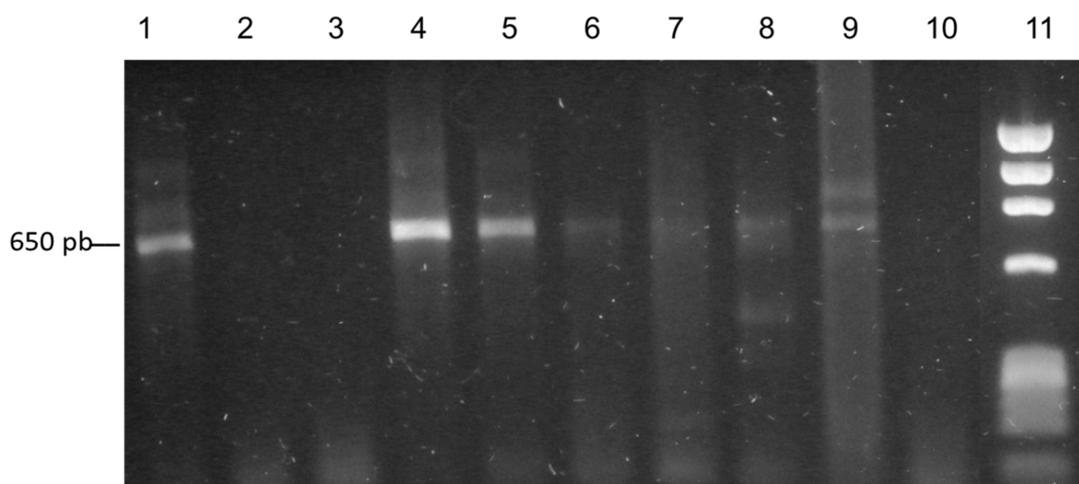


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. Sondas utilizadas: LB1 LB2. Línea: 11 PM (Marcador peso molecular  $\Phi$ X174), Líneas 1 al 10 productos de PCR, Líneas 1, 4 al 8 bandas 650 pb (*L. (V.) braziliensis*), 9 control positivo, 10 control negativo.

Con relación a las especies de *Leishmania*, el área anatómica en un 67% (6/9) de los casos de infección por *L (L.) mexicana* presentaron compromiso principalmente de las extremidades superiores, mientras que el 48% (14/29) de los casos de *L (V.) braziliensis* presentaron compromiso de las extremidades inferiores y superiores en igual proporción. En ambas especies, el área geográfica con mayor número de casos fue el Estado Miranda. Se observó que en los casos de *L (V.) braziliensis* el tiempo de evolución de la enfermedad fue en promedio de 5 semanas (2-12 semanas) comparando con los casos de *L (L.) mexicana* que

presentaron mayor tiempo de evolución, con un promedio de 8 semanas (rango 4-12 semanas). (Tabla 5 y 6)

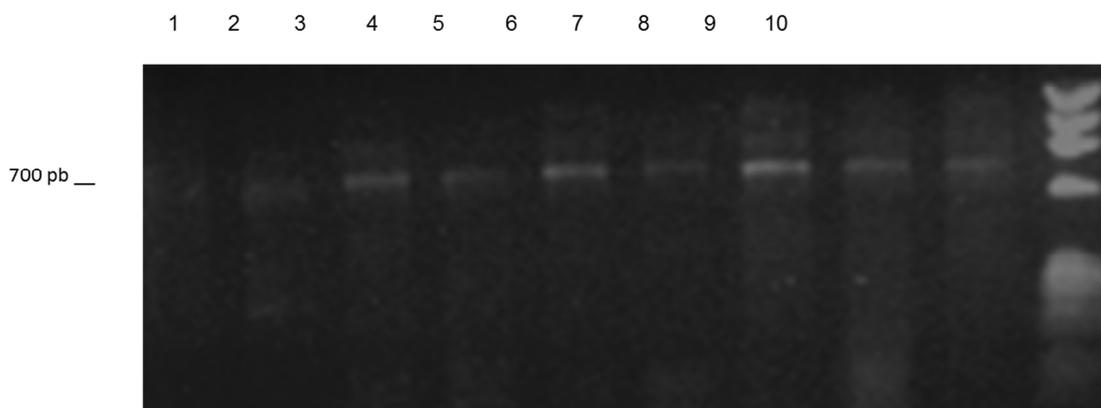


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. Sondas utilizadas: LM1 LM2. Líneas: 10 PM (Marcador peso molecular  $\Phi$ X174), Líneas 1 al 8 productos de PCR, Líneas 2 al 8 bandas 700 pb (*L. (L.) mexicana*), 9 control positivo.

Con respecto a los hallazgos encontrados en la respuesta terapéutica en los 38 pacientes con diagnóstico de leishmaniasis por PCR, observamos que 61% (23/38) recibieron inmunoterapia como monoterapia. De los pacientes que recibieron terapia combinada 97% (inmunoterapia + otro procedimiento), 51% (19/37) recibieron 3 dosis de inmunoterapia, 33% (12/37) recibieron 2 dosis y 16% (6/37) recibieron 1 sola dosis; 26% (10/38) de los pacientes se les asoció como tratamiento Glucantime® intramuscular (10-60 ampollas), 5% (2/38) se les asoció crioterapia, 5% (2/38) se asoció Glucantime® intralesional y 3% (1/38) no recibió tratamiento. (Tabla 7)

La Tabla 8, muestra el tratamiento y el promedio de tiempo de curación de los pacientes positivos para *L (V.) braziliensis*. Observamos que el 66% (19/29)

Tabla 4. Resumen de los 38 pacientes con PCR positiva.

Pacientes PCR(+)	Género	Edad	Evolución	Número lesiones	Tamaño (mm <sup>2</sup> )	Localización anatómica	Tratamiento	Tiempo curación	Especie <i>leishmania</i>
1	F	45 años	2 semanas	2	110-12	pierna (2)	IT (2)	7 semanas	LB
2	M	50 años	8 semanas	4	144- 36-36-150	pierna(2), brazo, abdomen	IT + crioterapia	22 semanas	LB
3	F	59 años	3 semanas	1	49	Cara	IT (3)+ G (10)	23 semanas	LB
4	F	39 años	8 semanas	1	550	antebrazo	IT (2) + intral G (1)	37 semanas	LM
5	M	33 años	5 semanas	1	168	antebrazo	IT (3)+ G (20)	20 semanas	LM
6	M	14 años	4 semanas	1	100	Codo	IT (3)	23 semanas	LM
7	M	56 años	8 semanas	1	240	espalda	IT (2)	7 semanas	LB
8	F	15 años	12 semanas	1	225	muslo	IT (3)	14 semanas	LB
9	M	33 años	8 semanas	1	1120	pierna	IT (3) + G (20)	10 semanas	LM
10	F	29 años	4 semanas	1	162	antebrazo	IT + crioterapia	7 semanas	LB
11	M	16 años	4 semanas	1	450	Brazo	IT	8 semanas	LB
13	M	36 años	8 semanas	1	88	espalda	IT (3)	12 semanas	LM
14	F	44 años	4 semanas	3	132-169-480	pierna (3)	IT (2)+ G (32)	10 semanas	LB
15	M	15 años	3 semanas	1	80	Brazo	IT (3)	17 semanas	LB
16	M	38 años	3 semanas	1	60	Mano	IT (3)	20 semanas	LB
17	M	45 años	4 semanas	1	126	espalda	IT (2) + G	28 semanas	LB
18	F	32 años	3 semanas	1	130	Brazo	IT	8 semanas	LB
19	M	26 años	3 semanas	3	30-25-80	brazo (2), pie	IT	7 semanas	LB
20	M	86 años	4 semanas	1	300	antebrazo	IT (3)	19 semanas	LB
21	F	21 años	8 semanas	1	900	hombro	IT (3) + G (20)	19 semanas	LM
22	M	71 años	8 semanas	1	400	pierna	IT (3)	13 semanas	LB
23	F	49 años	2 semanas	1	150	Pie	IT (3)	12 semanas	LB
25	F	11 años	8 semanas	1	900	antebrazo	IT (2)	17 semanas	LB
26	M	17 años	8 semanas	1	130	pierna	IT (3)	17 semanas	LB
28	M	18 años	8 semanas	2	272-168	pierna (2)	IT (3)	12 semanas	LB
30	M	17 años	8 semanas	1	150	Brazo	IT (2)	13 semanas	LB
31	M	46 años	8 semanas	1	420	pierna	NO RECIBIO	7 semanas	LM
32	M	26 años	4 semanas	4	150-150-255-2000	pierna (4)	IT (3) + G (20)	17 semanas	LB
34	M	57 años	8 semanas	3	700-500-120	antebrazo (2), espalda	IT	12 semanas	LM
36	M	11 años	4 semanas	1	144	Brazo	IT (3) + G (35)	26 semanas	LB
38	M	28 años	8 semanas	2	225- 80	pierna	IT (2)	17 semanas	LB
39	M	29 años	12 semanas	3	100-20-72	brazo(2), pie	IT (3)	11 semanas	LM
41	M	18 años	4 semanas	1	64	Brazo	IT (2)	11 semanas	LB
44	M	79 años	4 semanas	1	1845	antebrazo	IT (2)	8 semanas	LB
46	M	63 años	4 semanas	1	128	Pie	IT (2)	12 semanas	LB
49	M	38 años	4 semanas	1	70	antebrazo	IT + intral G	13 semanas	LB
51	M	17 años	4 semanas	1	1505	rodilla	IT + G (60)	7 semanas	LB
52	M	13 años	12 semanas	2	40-225	pierna	IT (3) +G (20)	18 semanas	LB

de los casos fueron tratados sólo con inmunoterapia, presentando un promedio de tiempo de curación de 12 semanas (7-20 semanas). De éstos, el 16% (3/19) recibió una sola dosis, con un promedio de tiempo de curación de 8 semanas (7-8 semanas); el 42% (8/19) recibió dos dosis, con un promedio de tiempo de curación de 11 semanas (7-17 semanas); y el 42% (8/19) recibió 3 dosis, con un promedio de curación de 14 semanas (12-20 semanas). El 24% (7/29) de los casos que fueron tratados con inmunoterapia + Glucantime® intramuscular, presentaron un promedio de tiempo de curación de 18 semanas (7-28semanas). El 7% (2/29) de los casos fueron tratados con inmunoterapia + crioterapia, con un promedio de curación de 14 semanas (7-22 semanas) y el 3% (1/29) de los casos tratados con inmunoterapia + Glucantime® intralesional presentó un promedio de curación de 13 semanas.

Los pacientes que fueron tratados con terapia combinada IT + Glucantime® IM, demoraron más tiempo en curar.

En el caso de los pacientes infectados por *L (L.) mexicana*, el 45% (4/9) de los casos fueron tratados con inmunoterapia, presentando un promedio de tiempo de curación de 14 semanas (11-23 semanas); el 33% (3/9) de los casos fueron manejados con inmunoterapia + Glucantime® intramuscular, con un promedio de tiempo de curación de 16 semanas (10-20 semanas). Un paciente fue tratado con inmunoterapia + Glucantime® intralesional 11% (1/9), presentó un tiempo de curación de 37 semanas. (Tabla 9)

**Tabla 5.** Clínica y epidemiología de los pacientes con infección por *Leishmania braziliensis* (N=29)

Paciente	Género	Edad (años)	Lugar de infección (Estado)	Tiempo de evolución (semanas)	Tipo de lesión	Número de lesiones	Área anatómica	Tratamiento	Tiempo curación (semanas)
1	F	45	Vargas	2	Úlcera	2	Extremidad inf.	IT (2)	7
2	M	50	Vargas	8	Úlcera	4	Extremidad inf.	IT (3) + crioterapia	22
3	F	59	Miranda	3	Úlcera	1	Rostró	IT (3) + G (10)	23
7	M	56	Miranda	8	Úlcera	1	Tronco sup.	IT (2)	7
8	F	15	Miranda	12	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3)	14
10	F	29	Distrito Capital	4	Úlcera	1	Extremidad sup	IT (1)+ Crioterapia	7
11	M	16	Miranda	4	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT	8
14	F	44	Distrito Capital	4	Úlcera	3	Extremidad inf	IT (2) + G (32)	10
15	M	15	Miranda	3	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3)	17
16	M	38	Miranda	3	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3)	20
17	M	45	Distrito Capital	4	Úlcera	1	Tronco sup.	IT (2) + G (20)	28
18	F	32	Guárico	3	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT	8
19	M	26	Vargas	3	Úlcera	3	Extremidad sup.	IT	7
20	M	86	Miranda	4	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3)	19
22	M	71	Distrito Capital	8	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3)	13
23	F	49	Distrito Capital	2	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3)	12
25	F	11	Miranda	8	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (2)	17
26	M	17	Distrito Capital	8	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3)	17
28	M	18	Miranda	8	Úlcera	2	Extremidad inf.	IT (3)	12
30	M	17	Vargas	8	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (2)	13
32	M	26	Vargas	4	Úlcera	4	Extremidad inf.	IT (3) + G (20)	17
36	M	11	Vargas	4	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3) + G (35)	28
38	M	28	Vargas	8	Úlcera	2	Extremidad inf.	IT (2)	17
41	M	18	Miranda	4	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (2)	11
44	M	79	Miranda	4	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (2)	8
46	M	63	Vargas	4	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (2)	12
49	M	38	Vargas	4	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (2) + inf G	13
51	M	17	Aragua	4	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT + G (60)	7
52	M	13	Vargas	12	Úlcera	2	Extremidad inf.	IT (3) + G (20)	18

El paciente 31 no recibió ningún tipo de tratamiento y tuvo un tiempo de curación de 7 semanas, tiempo muy similar al de los pacientes que si recibieron

tratamiento. Esto también se deba posiblemente a factores propios del huésped que permitieron una resolución de la enfermedad de forma rápida, lo cual es característico de las infecciones por *L (L.) mexicana*.

El promedio de tiempo de curación de todas las lesiones fue de 14 semanas en general. Para los casos de los pacientes infectados con *L (V.) braziliensis* fue de 14 semanas (7-28 semanas) y para los casos de *L (L.) mexicana* fue de 18 semanas. (10-37 semanas)

**Tabla 6.** Clínica y epidemiología de los pacientes con infección por *Leishmania mexicana* (N=9)

Paciente	Género	Edad (años)	Lugar de infección (Estado)	Tiempo de evolución (semanas)	Tipo de lesión	Número de lesiones	Área anatómica	Tratamiento	Tiempo curación (semanas)
4	F	39	Miranda	8	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (2) + G inf (1)	37
5	M	33	Distrito Capital	5	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3) + G (20)	20
6	M	14	Miranda	4	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3)	23
9	M	33	Vargas	8	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3) + G (20)	10
13	M	36	Miranda	8	Úlcera	1	Tronco sup.	IT (3)	12
21	F	21	Miranda	8	Úlcera	1	Tronco sup	IT (3)+G (20)	19
31	M	46	Vargas	8	Úlcera	1	Extremidad Inf.	Ninguno	7
34	M	57	Miranda	8	Úlcera	2	Extremidad sup.	IT (1)	12
39	M	29	Miranda	12	úlceras	3	Extremidad sup.	IT (3)	11

IT: Inmunoterapia

G: Glucantime

G inf: Glucantime intralesional

Se identificó la presencia ó no de variabilidad genética dentro de una misma especie de *Leishmania* con la técnica molecular PCR-RFLP. Al realizar el análisis

de restricción con la endonucleasa HaeIII de los productos amplificados por PCR con primers para *L (V.) braziliensis*, se demuestra la existencia de variantes genéticas entre aislados de pacientes observando la presencia de patrones de bandas de 550, 400, 310 y 250 pb diferentes a 650 pb. (Figura 27) Los resultados de la PCR-RFLP para la identificación de variabilidad genética en especies de *L (V.) braziliensis*, demuestran un 21% de presencia de variabilidad. (Figura 28) En la Tabla 10 se observan las características de los pacientes en los que se evidenció variabilidad genética. De igual forma, al realizar el análisis de restricción para *L (L.) mexicana*, no se observa variabilidad entre las muestras. (Figura 29)

**Tabla 7.** Tratamiento de pacientes con PCR (+) *Leishmania sp.* (N=38)

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>NÚMERO DE PACIENTES</b>
IT monoterapia	60% (23/38)
IT + Glucantime® IM	26% (10/38)
IT + crioterapia	5% (2/38)
IT + Glucantime® IL	5% (2/38)
Sin tratamiento	3% (1/38)
<b>TOTAL</b>	<b>100 % (38)</b>

IT: inmunoterapia

IM: intramuscular

IL: intralesional

**Tabla 8.** Tratamiento y tiempo de curación pacientes con *Leishmania braziliensis* (N=29)

TRATAMIENTO	NÚMERO DE PACIENTES	PROMEDIO TIEMPO CURACIÓN
IT monoterapia	65.5% (19/29)	12.5 semanas
IT + Glucantime® IM	24,1% (7/29)	19 semanas
IT + Crioterapia	7% (2/ 29)	14.5 semanas
IT + Glucantime® IL	3.4% (1/29)	13 semanas
<b>TOTAL</b>	100% (29/29)	Promedio : 14.7 semanas

IT: inmunoterapia

IM: intramuscular

IL: intralesional

**Tabla 9.** Tratamiento y tiempo de curación pacientes con *Leishmania mexicana* (N=9)

TRATAMIENTO	NÚMERO DE PACIENTES	PROMEDIO TIEMPO CURACIÓN
IT monoterapia	44,4% (4/9)	14.5 semanas
IT + Glucantime® IM	33, 3% (3/9)	16.3 semanas
IT + Glucantime® IL	11.1% (1/9)	37 semanas
Sin tratamiento	11.1% (1/9)	7 semanas
<b>TOTAL</b>	100 % (9/9)	Promedio: 18.7 semanas

Nota: El paciente 31 no recibió ningún tipo de tratamiento y tuvo un tiempo de curación de 7 semanas.

IT: inmunoterapia

IM: intramuscular

IL: intralesional

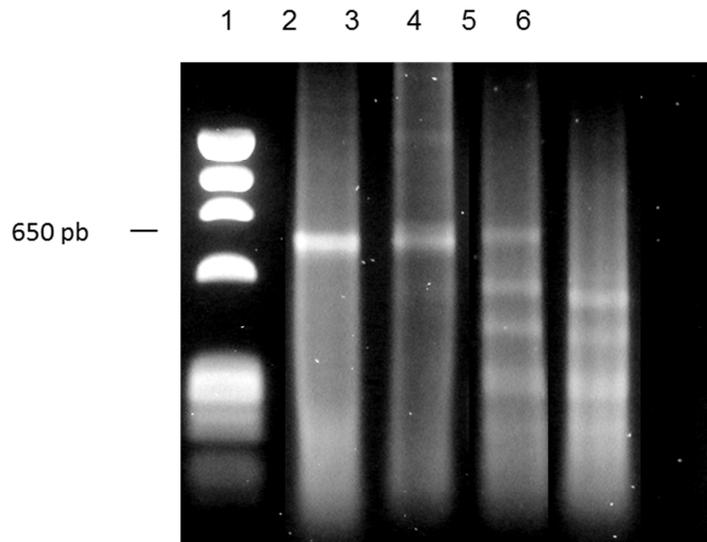
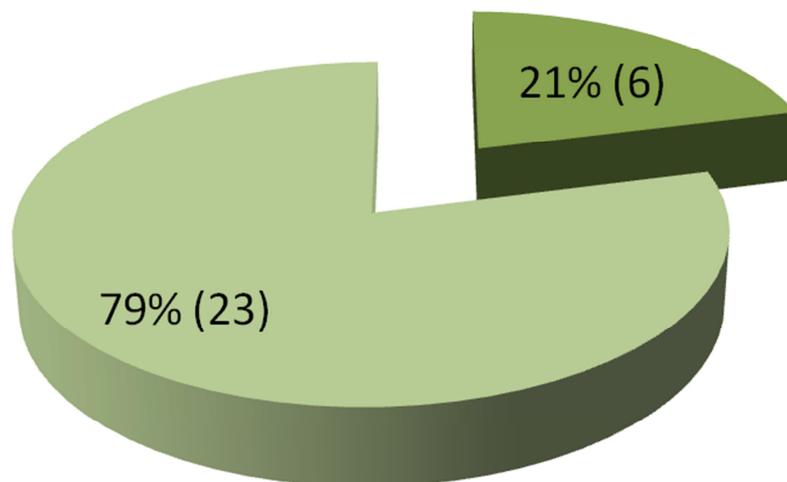


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR luego de la digestión con enzima HaeIII. Línea: 1 PM (Marcador peso molecular  $\Phi$ X174), Líneas 2, 3 y 4 bandas 650 pb (*L. (V.) braziliensis*), Líneas 4 y 5 patrones de bandas de 550, 400, 310 y 250 pb.

Figura 28. Resultados de PCR-RFLP para la identificación de variabilidad genética en especies de *Leishmania braziliensis* (N=29)



■ Presencia de variabilidad genética ■ Ausencia de variabilidad genética

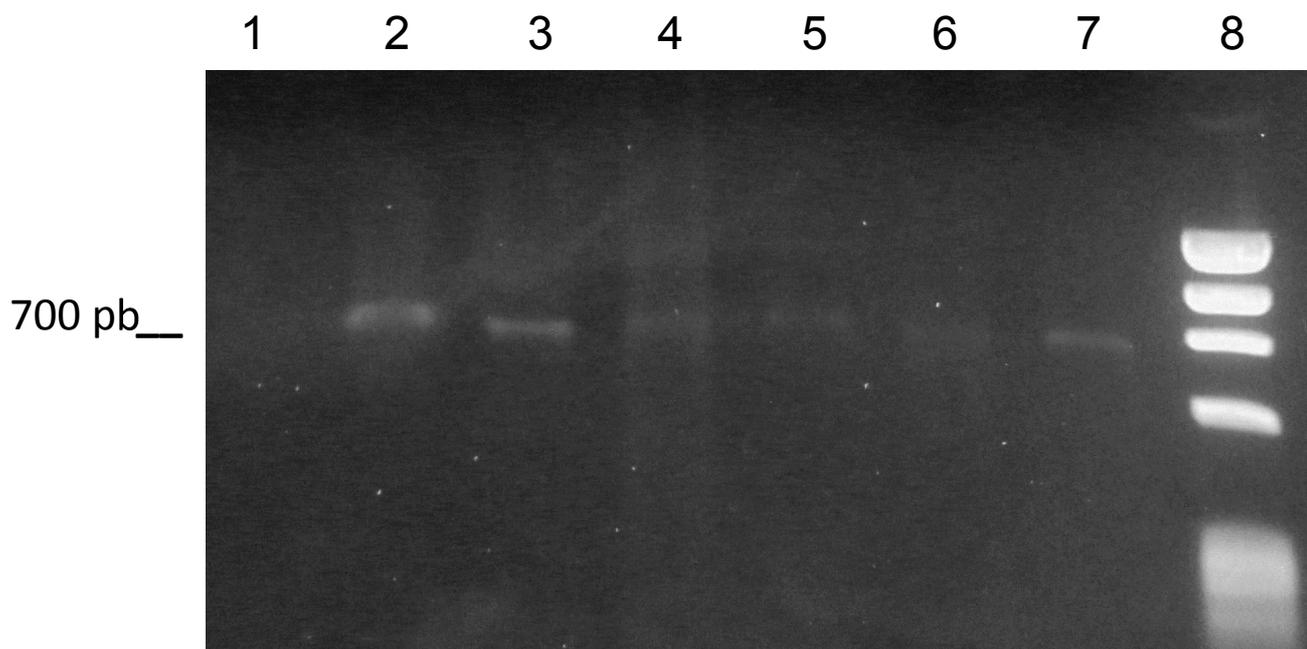


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN digeridos con la endonucleasa de restricción Hae III. Línea: 8 PM (Marcador peso molecular  $\Phi$ X174), Líneas 1 al 7 productos de PCR luego de la digestión, patrones de bandas de 700 pb (*L. (L.) mexicana*).

Tabla 10. Pacientes en los que se demostró variabilidad genética entre aislados de *Leishmania braziliensis* (N=6)

Paciente	Género	Edad (años)	Lugar de infección (Estado)	Tiempo de evolución (semanas)	Tipo de lesión	Número de lesiones	Área anatómica	Tratamiento	Tiempo curación (semanas)
16	M	38	Miranda	3	Úlcera	1	Extremidad sup.	IT (3)	20
17	M	45	Miranda	4	Úlcera	1	Espalda	IT (2) + G (40)	28
22	M	71	Distrito Capital	8	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3)	13
23	F	40	Distrito Capital	2	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (3)	12
46	M	63	Guaira	4	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT (2)	12
51	M	17	Aragua	8	Úlcera	1	Extremidad inf.	IT + G (60)	17

## DISCUSIÓN

Datos de vigilancia epidemiológica a nivel mundial han indicado que el número de casos de leishmaniasis se ha incrementado en las últimas décadas. Esto se debe a múltiples factores como el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, el control inadecuado de vectores o reservorios, la asociación con otras enfermedades oportunistas, la urbanización de los vectores y la resistencia a los medicamentos, entre otros.

Se ha observado que las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ser producidas por parásitos con morfología similar, y esto ha generado un problema al momento de realizar la identificación y la diferenciación de especies de parásitos responsables de la variabilidad clínica.

En Latinoamérica, las especies de parásitos que producen enfermedad tanto cutánea como mucosa son la *Leishmania (V.) braziliensis* y la *Leishmania (L.) mexicana*. Se ha observado que es importante realizar una discriminación entre las especies con el fin de tomar las decisiones terapéuticas, ya que la historia natural y la respuesta terapéutica se encuentran relacionadas con la especie que se encuentra en la lesión clínica.<sup>14</sup>

Para lograr la identificación correcta y rápida de estas especies de parásitos, se han desarrollado técnicas como la Reacción de Cadena de

Polimerasa (PCR) y sus variantes, las cuales han brindado la posibilidad de realizar el diagnóstico de la enfermedad y hacer la discriminación de especies con una alta sensibilidad <sup>77</sup>. El gran valor que tiene esta técnica, además de lograr la rápida identificación de los parásitos, es el poder administrar el tratamiento adecuado para prevenir recurrencias.

Algunos estudios mencionan, que la epidemiología y el control de la enfermedad se encuentran relacionados con la discriminación de las subespecies de *Leishmania*, mientras que las decisiones terapéuticas están estrechamente relacionadas con la distinción entre las especies *L. braziliensis* y *L. mexicana*.<sup>17</sup>

En este proyecto, decidimos utilizar la técnica molecular PCR con el fin de diagnosticar las diferentes especies de *Leishmania* causantes de la leishmaniasis cutánea localizada en pacientes de la consulta de leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, y realizar la identificación de la variabilidad genética dentro de una misma especie de *Leishmania* con la técnica molecular PCR-RFLP y observar la relación de este polimorfismo genético con la manifestaciones clínicas y la respuesta terapéutica.

Se han realizado estudios en donde se han comparado diferentes métodos de diagnóstico para la leishmaniasis, y han encontrado resultados que mencionan la técnica de PCR como un método altamente sensible para demostrar la presencia de material genético del parásito. Zerpa y col. (2002)<sup>3</sup>, realizaron la comparación de cinco métodos diagnóstico para la leishmaniasis y encontraron

que la PCR fue el segundo método sensible (71.4%) para demostrar la presencia de *Leishmania*. Aun así, ellos observaron que a pesar de ser un método altamente sensible y específico, este requiere de extremas medidas para el almacenamiento, transporte y procesamiento de la muestra, ya que el ADN del parásito puede desnaturalizarse y dar falsos negativos.

Rotureau y col. (2006) <sup>78</sup>, observaron que al utilizar 40 biopsias cutáneas frescas, se obtenía mayor sensibilidad (87.5%), en cuanto a los resultados de PCR comparándolo con muestras tomadas de los cultivos. Medeiros y col. (2002) <sup>79</sup>, después de realizar la técnica de PCR a 54 biopsias de paciente con clínica sugestiva de leishmaniasis cutánea, obtuvieron resultados positivos en 82% (44/54) de sus muestras, concluyendo que esta técnica logra una alta sensibilidad en la detección de los parásitos.

En nuestro estudio, realizamos la técnica de PCR con primers específicos para la identificación del parásito *Leishmania*, encontrando que el 72% (38/53) de las muestras fueron positivas. Al realizar la comparación con los otros métodos diagnósticos empleados, fue la tercera técnica con mayor sensibilidad. En primer lugar se reportó en un 96% de positividad la intradermorección de Montenegro que Rodríguez y col.(2002)<sup>6</sup> reportaron en 100% de positividad en sus muestras. Seguido por el frotis por escarificado con un 75% que al revisar la literatura se reporta hasta 88% de positividad.<sup>3</sup> Para el cultivo obtuvimos un 66% en comparación de 52,4% y 44% reportado <sup>3,6</sup>; y por último en las biopsias cutánea se demostró la presencia de amastigotes en un 47%.

Rodríguez y col. (2002) <sup>6</sup>, utilizaron dos tipos de primers diferentes para el diagnóstico de *L (V.) braziliensis*. Encontraron que el método más sensible para la identificación de la especie fué en el que se utilizó los primers con el ADN del kinetoplasto (kDNA) 84% (76/90), pero el método más específico para la subespecie fue aquel diseñado con el material genómico del parásito.

En nuestro estudio realizamos una segunda PCR, en donde encontramos resultados muy similares al utilizar primers específicos para ADNk (B1 y B2; M1 y M2). Observamos que el 76% (29/38) de las muestras fueron positivas para la identificación de *L (V.) braziliensis* con una amplificación de un fragmento de 650 pb. También, el 24% (9/38) fueron positivas para *L (L.) mexicana* con una amplificación de un fragmento de 700 pb. Estos parásitos son las principales especies que causan leishmaniasis en el territorio venezolano. A pesar que los Estados Andinos son los que presentan mayor incidencia de la enfermedad, los Estados Miranda y Vargas; que fueron los Estados en donde la mayoría de nuestros pacientes se infectaron, presentan altas y medias tasas de incidencia en los registros epidemiológicos.

El género masculino es el que presentó mayor porcentaje de infección comparado con el femenino. Esto puede deberse a las actividades laborales que cada uno de los géneros desempeña. Se ha observado que la enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero el riesgo de infección tiende a

aumentar con los años, observando mayor compromiso en la tercera y cuarta década de la vida.

Las úlceras fueron el predominio de las lesiones en nuestro estudio, dato que también se menciona en la literatura, encontrando que el 98,96% de los casos de LCL presentan este tipo de lesión. El área anatómica que presentó mayor compromiso fueron las extremidades superiores, en los casos de *L (L.) mexicana* y en igual proporción en extremidades superiores e inferiores en los casos de *L (V.) braziliensis*. La mayoría de las formas clínicas presentan una ó dos lesiones, dato similar encontrado en nuestro estudio, en donde la mayoría de los casos 72% presentaron una sola lesión clínica.

En cuanto al tamaño de las lesiones, varía según el tipo de lesión y forma clínica, observando que en los casos de LCL oscila entre 18-19 mm. En nuestro estudio encontramos un promedio de tamaño de lesiones de 15-20 mm.

En los casos de infección por *L (L.) mexicana*, los tiempos de evolución de la enfermedad y de curación son cortos. En nuestro estudio observamos que los tiempos de evolución de la enfermedad fueron de 8 semanas (4-12 semanas) y de curación de 18 semanas (7-37 semanas). En los casos de *L (V.) braziliensis*, que son reportados como más agresivos y con tiempos de curación largos, observamos que el tiempo de evolución de la enfermedad fue de 5 semanas (2-12 semanas) y el tiempo de curación de 14 semanas (7-28 semanas). Con respecto al tratamiento, la mayoría de los pacientes fueron tratados con inmunoterapia 61%, presentando tiempos de curación más cortos (12-14 semanas), mientras que

aquellos que fueron tratados combinando inmunoterapia con Glucantime® (IM ó IL), presentaron tiempos de curación más largos (13-37 semanas).

Vemos que no hay ningún tipo de relación de aspectos clínicos y epidemiológicos con estos hallazgos, por lo que no se podría suponer que esto se deba a factores genéticos e inmunológicos del huésped y/o factores propios del parásito.

Schonian y col. (2000)<sup>80</sup>, comentan que la variabilidad genética se encuentra relacionada con el origen geográfico de las muestras, y que las manifestaciones clínicas son el resultado de la interacción de moléculas tanto del parásito como las células del huésped. García y col. (2005), mencionan que las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis es el resultado de la interacción de varias moléculas y queda por entender cuáles son los marcadores genéticos más adecuados para encontrar los genes que determinar la virulencia del parásito y por lo tanto la clínica.<sup>81</sup>

Córdova y col. (2011)<sup>82</sup>, utilizaron los métodos moleculares basados en PCR y RFLP, y lograron la identificación de las especies de *Leishmania* a partir de lesiones clínicas de los pacientes, comentando que esto abre una posibilidad de tener una prueba rápida para el diagnóstico de la infección y permitirá delimitar micro-regiones con potenciales riesgos de transmisión de la enfermedad favoreciendo de esta manera la comprensión de los factores ecológicos y geográficos para diseñar futuras medidas de control epidemiológico.

Miranda y col. (2009)<sup>83</sup>, analizaron muestras de pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis tegumentaria americana con una PCR que amplificaba específicamente la secuencia completa del mini-círculo de las especies de *Leishmania Viannia*. Este estudio reveló que esta prueba fue positiva en el 71,8% de los casos, afirmando así que la PCR del ADNk del minicírculo es la prueba más sensible para el diagnóstico de rutina de leishmaniasis cutánea.<sup>84</sup> Sin embargo, la PCR no es una herramienta perfecta, porque en algunos estudios no ha podido detectar la totalidad de los casos que han sido positivos por métodos parasitológicos ó cultivo<sup>85</sup>.

Nosotros realizamos la técnica PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción HaeIII. Observamos cierto grado de variabilidad genética entre los aislados de *Leishmania braziliensis* dada por la presencia de patrones de bandas diferentes; no así para los casos de *Leishmania mexicana* donde se observa que el grupo estudiado es muy homogéneo desde el punto de vista genético, sin variabilidad entre ellos.

Con base a este patrón de restricción y teniendo en cuenta los criterios epidemiológicos de donde provenían las muestras, es posible incriminar a *L. braziliensis* como la principal especie responsable de estas infecciones, puesto que esta especie se encuentra reportada en las zonas de procedencia de los pacientes estudiados.

## CONCLUSIONES

Realizar la identificación de las especies de *Leishmania* de forma temprana tiene grandes beneficios lo que permite una mejor orientación en el tratamiento médico y el seguimiento de los pacientes, ya que se ha demostrado que la sensibilidad del parásito a los diferentes medicamentos depende de la especie. Y además, la identificación de las especie de *Leishmania* en un área endémica es esencial para la realización de actividades de control y para poder entender el comportamiento epidemiológico de ésta enfermedad.

Las técnicas moleculares tienen ventajas comparadas con las técnicas tradicionales, como son la habilidad de detectar los parásitos en presencia de poco número de éstos y la posibilidad de realizarlo con una amplia gama de muestras clínicas.<sup>5</sup>

La gran diversidad fenotípica del género *Leishmania* ha llevado al desarrollo de una compleja taxonomía con más de 20 especies descritas, la mayoría en América Latina. Así mismo, la complejidad epidemiológica de algunas regiones, la distribución heterogénea de parásitos, los ciclos de transmisión de las diferentes especies; pueden superponerse y variar entre especies. Lo mencionado anteriormente es lo que justifica la necesidad de tipificar las especies infectantes para poder obtener un mayor control de la enfermedad.<sup>9</sup>

Todos los avances en la tecnología molecular han brindado información importante sobre las fuentes de infección, los parámetros de transmisión, la respuesta al tratamiento y la importancia de la inmunidad para prevenir la reinfección.

La técnica de PCR ha abierto nuevas ventanas para el diagnóstico de la leishmaniasis <sup>71</sup> detectando la presencia de parásitos de *Leishmania* con alta sensibilidad, así como la identificación de especies y subespecies.

A pesar de todo, vemos que ésta herramienta no es perfecta, ya que sus resultados dependen de múltiples factores, como: personal que la realiza, el ambiente de trabajo, los reactivos y equipos, integridad del material genético (ADN). Cuando alguno de estos factores falla es cuando vemos que la prueba puede verse alterada y por lo tanto dar resultados errados.

En nuestro estudio, observamos que las dos especies de *Leishmania* *L (V.) braziliensis* y *L (L.) mexicana*, son las que tienen mayor incidencia en el territorio venezolano, y en los Estados Miranda y Vargas, donde la mayoría de nuestros pacientes se infectaron. La mayoría de los pacientes fueron infectados por la especie *L (V.) braziliensis* (76%).

Con relación a los hallazgos epidemiológicos y clínicos, encontramos resultados muy similares a los mencionados en la literatura con respecto al comportamiento de estas dos especies, pero nos llamó la atención observar que en los resultados de tratamiento y tiempo de curación, los casos de *L (L.)*

*mexicana* presentaron tiempos de curación más largos (18 semanas), que los casos de *L (V.) braziliensis* (14 semanas). Se sabe que *Leishmania mexicana* tiende a ser menos agresiva y que una de sus características es su curación rápida y espontánea. A lo mejor este comportamiento se deba a factores genéticos e inmunológicos del huésped o factores propios del parásito (variabilidad genética).

Con los hallazgos encontrados en la técnica de PCR-RFLP, se identificó la presencia de variabilidad genética dentro de la especie de *Leishmania (V.) braziliensis* en un 21%, de este grupo de pacientes se observó que requirieron de terapias combinadas con mayores dosis de Glucantime y mayor tiempo de curación, sugiriendo una resistencia natural al tratamiento.

Consideramos que se deben realizarse estudios clínicos similares con mayor población y en diferentes áreas geográficas, para poder observar y corroborar la relación entre la variabilidad genética de estos parásitos con el comportamiento clínico y terapéutico, o si esto sólo se debe a la respuesta propia del huésped.

## RECOMENDACIONES

1. A pesar que obtuvimos positividad con el método de PCR (72%), muy similar a lo reportado en la literatura en diferentes estudios, consideramos que se deben realizar posterior a la toma de biopsias, la PCR y la PCR-RFLP de forma consecutiva, esto con el fin de evitar la degradación y preservar el material genético.
2. Al mismo tiempo, es importante que al tomar las biopsias se realicen varios cultivos de éstas, por el alto grado de contaminación de las mismas, para permitir una evaluación de un mayor número de muestras y poder realizar un diagnóstico más completo.
3. Antes de realizar la técnica PCR-RLFP, se deben probar todos los reactivos con controles positivos, con el fin de evaluar si se encuentran en buen estado y no van alterar los resultados.
4. Realizar en el futuro otros estudios con un mayor número de muestras, con el fin de observar si existe una relación entre la variabilidad genética entre especies con las manifestaciones clínicas y la respuesta terapéutica.

## REFERENCIAS

1. Soto J, Soto P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006;4(2):177-85.
2. Mollinedo S, Torrez S, Holguín E, Vargas F. Leishmaniasis en Bolivia: Epidemiología de fin de siglo. *Rev Med Derma.* 2000;7(1):23-34.
3. Zerpa O, Borges R, Loyo N, Galindo W, Belisario D, Rodríguez N, Sosa A, Convit J. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Dermatol Venez.* 2002;40(4):106-10.
4. Montalvo A, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M. RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania* neotropical. *Biomédica* [Internet]. 2008 feb [Fecha de consulta 2 mar. 2010]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012041572008000400014&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012041572008000400014&lng=en)
5. Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastein P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*, use of Isoenzymes. Suggestions for a New Classification. *J Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65(3):111-25.
6. Rodriguez N, De Lima H, Aguilar C, Rodriguez A, Barker D, Convit J. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;92(1):105-9.
7. Pratlong F, Rioux J, Marty P, Faraut- Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet J. Isoenzimatic Analisis of 712 Strains of *Leishmania infantum* in the

- South of France and Relationship of Enzymatic Polimorphism to Clinical and Epidemiological Features. J Clin Microbiol. 2004;42:4077- 82.
8. Oletta J, Carvajal A, Peña S. Leishmaniasis: consideraciones generales y epidemiológicas. Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas. Alerta epidemiológica N° 195. [Internet] 2011 jul [Fecha de consulta: 29 oct. 2011]. Disponible en: [http://www.rscmv.org.ve/pdf/ALERTA\\_195.pdf](http://www.rscmv.org.ve/pdf/ALERTA_195.pdf)
  9. Rodríguez N, Cardona M, De Guglielmo Z, Rodríguez A. Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania spp* en área endémica en Venezuela. Bol Malariol San Amb. 2001;41(2):21-6.
  10. Montalvo A, Fraga J, Romero J, Monzote L, Montano I, Dujardin J. PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. Rev Cubana Med Trop. [Internet] 2006 mar [Fecha de consulta: 17 mar. 2010]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037507602006000300009&Ing=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602006000300009&Ing=es&nrm=iso)
  11. Tuon F, Sabbaga V, Graf M, Machado A, Nicodemo A, Amato N. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis a systematic review with a meta-analysis. Int J Dermatol. 2008; 47:109-24.
  12. Croft S, Sundar S, Fairlamb A. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clinical Microbiology Reviews. 2006;(19):111-26.
  13. Cupolillo E, Brahim L, Toaldo C, Paes M, Felinto M, Falqueto A, de Farias M, Grimaldi G. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Host and Geographic Areas in Brazil. J Clin Microbiol. 2003;41(7):3126-32.

14. Baghaei M, Mehdizadeh M, Afarid M, Attarzadeh A, Farzin D, Hosseini SH, et al. Intraspecific Variation in *Leishmania major* Isolated From Different Forms of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. Iran J Med Sci. 2005; 30(2):51-4.
15. Berzunza M, Padilla A, Pérez R, Becker I. Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las américas. 2005;45-66.
16. Berzunza M, Bricaire G, Romero S, Perez R, Saavedra E, Perez R, Crippa M, Velasco O, Becker I. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. Exp Parasitol. 2000;95(4):277-84.
17. Khatri M, Di Muccio T, Gramiccia M. Cutaneous leishmaniasis in North-Western Yemen: A clinicoepidemiologic study and *Leishmania* species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. J Am Acad Dermatol. 2009;61:15-21.
18. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom B, Convit J. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization. J Clin Microbiol. 1994; 32(9): 2246-52.
19. Karamian M, Motazedian M, F,hanjeni S. Study of Glucantime Resistance in Cutaneous Leishmaniasis from Shiraz by Pcr-Rflp Method. First Seminar of Medicinal & Natural Products Chemistry. [Internet] 2005 [Fecha de consulta: 19 mar. 2010]. Disponible en: <http://mnpc.congress.sums.ac.ir:8080/mnpc/ENallAbstracts.jsp>
20. Handman, E. Cell biology of *Leishmania*. Adv Parasitol. 2000; 44:1-39.

21. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution.  
En: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. The leishmaniases in Biology and  
Medicine. London: Academic Press; 1987.p.1-120.
22. Walters L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly  
hosts. J Eukaryot Microbiol. 1993; 40:196-206.
23. Englund,P. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol  
protein anchors. Annu Rev Biochem. 1993; 62:121-38.
24. McKerrow J, Sun E, Rosenthal P, Bouvier J. The proteases and  
pathogenicity of parasitic protozoa. Annu Rev Microbiol. 1993;47:821-53.
25. Rivas L. Kahl L, Manson K, McMahon-Pratt D. Biochemical characterization  
of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania*  
*amazonensis*. Mol Biochem Parasitol. 1991;47:235-43.
26. Turco S, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites.  
Annu Rev Microbiol. 1992;46: 65-94.
27. Simpson L, Simpson A, Kidane G, Livingston L, Spithill T. The kinetoplast  
DNA of the hemoflagellate protozoa. Am J Trop Med Hyg. 1980;29:1053-  
63.
28. Alvarez F, Robello C, Vignali M. Evolution of codon usage and base  
contents in kinetoplastid protozoans. Mol Biol Evol. 1994;11:790-802.
29. Wong A. Molecular genetics of the parasitic protozoan *Leishmania*.  
Biochem Cell Biol. 1995; 73:235-40.
30. Arts G, Benne R. Mechanism and evolution of RNA editing in  
kinetoplastida. Biochim Biophys Acta. 1996;1307:39-54.

31. Brewster S, Barker D. Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(S1):55-63.
32. Desjeux P, Piot B, O'Neill K, Meert J. Co-infections of *leishmania*/HIV in south Europe. *Med Trop.* 2001;61:187-93.
33. Gutierrez B, Smyth A, Alvar J, Barker D. *Leishmania infantum*: sequence homology within minicircle classes regardless of geographical distance. *Exp Parasitol.* 1995;81:416-9.
34. Lambson B, Smyth A, Barker D. *Leishmania donovani*: development and characterization of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp Parasitol.* 2000;94:15-22.
35. Basselin M, Badet-Denisot M, Robert-Gero M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop.* 1998;70:43-61.
36. Lee S, Tarn C, Chang, K. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58:187-203.
37. Lanotte G, Rioux J. Cell fusion in *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *C R Acad Sci III.* 1990;310:285-88.
38. Kelly J, Law J, Chapman C, Van Eys G, Evans D. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;46:253-63.
39. Jimenez M, Alvar J, Tibayrenc M. *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS.* 1997;11:569-573.
40. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35(7):699-705.

41. De Lima H, Borges R, Escobar J, Convit J. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Boletín de Malariología y salud ambiental*. 2010;(2):283-99.
42. Chiape G. La leishmaniasis rodea a Caracas. [Internet] 2010 feb [Fecha de consulta 20 mar. 2010]. Disponible en:[http://boletín.uc.edu.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=33417:la-leishmaniasis-rodea-caraca&catid=7:investigaciones&Itemid=10](http://boletín.uc.edu.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=33417:la-leishmaniasis-rodea-caraca&catid=7:investigaciones&Itemid=10)
43. Torres R. Leishmaniasis: la enfermedad de las mil caras/Leishmaniasis: the one thousand faced disease. *Kasmera*.1999; 27(2):103-14.
44. Cuba C. Diagnóstico parasitológico de la Leishmaniasis tegumentaria americana. *Rev Med Exp*. 2000;17:1-4.
45. Guía de atención de la Leishmaniasis. [Internet] [Fecha de consulta 09 nov. 2011]. Disponible en:<http://www.nacer.udea.edu.co/pdf/libros/guiamps/guias21.pdf>
46. Zerpa O, Convit J. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela. *Gaz Med Bahia* 2009; 79:(S3):30-4.
47. Grüber S, Zerpa O, Rondón A. Leishmaniasis en la infancia. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2003; 31(6):351-61.
48. Ochoa W, Gutiérrez L, Guevara R, Oviedo M, Loaiza L, Bastidas G. Diagnóstico de leishmaniasis visceral por frotis de sangre periférica. A propósito de un caso en Cojedes, Venezuela. *Rev Peru Med Exp Sal Publ*. 2009;26(2): 258-61.

49. Van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, Peekel I, Schallig H. Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Real-Time Reverse Transcriptase PCR, and Real-Time PCR for Quantification of *Leishmania* Parasites. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):73-8.
50. Oddone R, Canese A, Maciel J, Velázquez G, Meza T, Mendoza M. Leishmaniasis tegumentaria: sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta en pacientes con diagnóstico parasitológico. *Mem Inst Invest Cienc Salud.* 2005;3(1):15-18.
51. Evans D, Godfrey D, Lanham S, Lanotte G, Modabber F, Schnur LF. Characterization of *Leishmania*. En: Evans DA, eds. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania*; Suiza 1989.p. 1-45.
52. Morel C, Chiari E, Camargo E, Mattei D, Romanha A, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci.* 1980;77:6810-14.
53. Angelici M, Gramiccia M, Gradoni L. Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology.* 1989;99(3):301-9.
54. Pacheco R, Martinez J, Valderrama L, Momen H, Saravia N. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;69:197-209.
55. Taylor G. Polymerase Chain reaction: Basic principles and automation. En: eds. PCR: a practical approach. Oxford University press; 1991.p.1-14.

56. Rodríguez N. Diagnóstico de Leishmaniasis por PCR e identificación de especies mediante hibridación molecular no radioactiva. A Basic Course on host parasite interactions and vector biology. Sponsored by the American Society for Microbiology (ASM) and the Venezuelan Institute for Scientific Research (IVIC). September 2006. Caracas, Venezuela.
57. Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, Parravicini C, Corbellino M. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(1):46-51.
58. Victoir K, Banuls A, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, De Doncker S, Le Ray D, Tibayrenc M, Dujardin J. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus Viannia. *Parasitology.* 1998;117(1):1-13.
59. Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, Ismail R, Le Ray D, Dujardin J. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology.* 2001;122(1):25-35.
60. Mauricio I, Gaunt M, Stothard J, Miles M. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology.* 2001;122:393-403.
61. Noyes H, Belli A, Maingon R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55:98-105.

62. Protocolo integral del manejo de la Leishmaniasis. [Internet] 2009 mar [Fecha de consulta 09 nov. 2011]. Disponible en: [http://sanidadfuerzasmilitares.mil.co/recursos\\_user/DISANEJC/SALUD%20OPERACIONAL/2011/Protocolos%20Enfermedades%20Tropicales/Actualizacion%20Protocolo/PROTOCOLO%20DE%20leishmaniasis%202010%20DISAN.pdf](http://sanidadfuerzasmilitares.mil.co/recursos_user/DISANEJC/SALUD%20OPERACIONAL/2011/Protocolos%20Enfermedades%20Tropicales/Actualizacion%20Protocolo/PROTOCOLO%20DE%20leishmaniasis%202010%20DISAN.pdf)
63. Soto J, Soto P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomédica*. 2006; 26(S1):194-206.
64. Soto J, Soto P. Miltefosine: Oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2006;4(2):177-185
65. Mesa-Valle C, Moraleda V, Lazuen J, Craciunescu D, Osuna A. Action of new organometallic complexes against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:47-57.
66. Nabors G, Afonso L, Farrell J, Scott P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:3142-6.
67. Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, Villaroel H, Zapata Z, Tomedes I. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97:1-4.
68. Pouran, Layeg P, Fakhrozaman P, Soruri A, Naviafar P, Moghiman T. Efficacy of Cryotherapy versus Intralesional Meglumine Antimoniate

- (Glucantime) for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Children. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(2):172-5.
69. Rosal T, Baquero F, García M. Leishmaniasis cutánea. *Rev Pediatr Aten Primaria.* [Internet] 2010 Jun. [Fecha de consulta 16 nov. 2011] Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S11397632201000300009&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S11397632201000300009&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4321/S1139-76322010000300009>
70. Shamsi S, Shamsi M, Zandi S, Dabiri S, Aflatoonian M. Efficacy of topical 5% imiquimod with cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate in the treatment of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Iran J Dermatol.* 2011;14:42-7.
71. Escobar P, Hernández I, Rueda C, Martínez F, Páez E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomédica.* 2006;26(1):49-56.
72. Chan M, Hernández E, Navarrete G. Demuestran la actividad de la nitazoxanida y sus derivados sobre *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1292-3.
73. Berman J. Inhibition of leishmanial protein kinase by antileishmanial drugs. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38:298-303.
74. Balana-Fouce R, Reguera R, Cubria J, Ordonez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 1998;30:435-43.
75. Hammond D, Gutteridge W. Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol Biochem Parasitol.* 1984;13:243-61.

76. Sundar S, Rosenkaimer F, Lesser M, Murray H. Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1995;171:992-6.
77. Vaeznia H, Dalimi A, Sadraei J, Pirstani M. Determination of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. *Arch Inst Razi.* 2009; 64(1):39-44.
78. Rotureau B, Ravel C, Couppie P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2006;44:459-67.
79. Medeiros A, Rodrigues S, Rosalino A. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(4): 421-4.
80. Schonian G, Akuffo H, Lewin S. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasit.* 2000;106:239-48.
81. Cordova O, Vargas F, Hashiguchi Y, Kato H, Gomez E. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y flebótomos en áreas de transmisión en una región del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011; 28(3):446-53.
82. Garcia A, Kindt A, Quispe K. American tegumentar leishmaniasis: anti-gene polymorphism. *Infec Genet Evol.* 2005;5:109-16.

83. Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale J, Samudio F, Saldana A, Santamaria G, Mendoza Y, Calzada J. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(4):565-71.
84. Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio L, Schiavoni P, Monteiro V, Madeira M, Quintella L, Valete-Rosalino C, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho R, Pacheco R, Marzochi M, Marzochi K. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(1):109-12.
85. Ríos J, Yuil E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de leishmaniasis cutánea. *Rev med cient.* 2010; 23(2):22-37.
86. Oruea A, Hidalgo M, De Abreu N, Luisi L, García H, Rodríguez N, Mendoza A. Marcadores moleculares en Kinetoplastida: Secuencias diagnósticas de DNA nuclear de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* y el desarrollo de un ensayo múltiple de PCR (Multiplex PCR) en la identificación del parásito. *Memorias del Instituto de Biología Experimental.* 2005; 4:121-4.

## APENDICES

### ANEXO 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PROYECTO: DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN POR PCR-RFLP DE ESPECIES DE *LEISHMANIA* AISLADAS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN VENEZUELA

Autores: Dra. Andreina Armand Mijares  
Dra. Paula Andrea Soto Toledo  
Tutor: Dra. Noris Rodríguez

La Leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades parasitarias producidas por diferentes especies de protozoarios del género *Leishmania*. La identificación temprana de las especies de *Leishmania* tiene beneficios tanto clínicos como epidemiológicos que permite una mejor orientación en el tratamiento médico y el seguimiento de los pacientes, ya que la sensibilidad del parásito a los diferentes medicamentos depende de la especie. En el presente trabajo vamos a utilizar la PCR-RFLP para realizar el diagnóstico y la identificación de las principales especies de *Leishmania* que se encuentran en Venezuela así como las variaciones genéticas de *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Este método nos ayudará a identificar las especies que infectan a los pacientes que consultan al Servicio de Dermatología del Instituto de Biomedicina y como consecuencia de esto, podremos plantear las opciones terapéuticas más apropiadas según la especie infectante.

El propósito de esta información es permitirle entender este estudio clínico, para que usted decida si desea participar. El objetivo es realizar el diagnóstico y la identificación de las especies de *Leishmania* En su primera consulta se decidirá si podrá participar en el estudio, se le realizará una historia clínica con todos sus antecedentes y examen físico, se procederá a registro fotográfico de las lesiones y se tomará frotis por escarificado y biopsia de piel para PCR-RFLP. Posterior a ello se le indicará su tratamiento respectivo, y se seguirá evolución a través de controles sucesivos. Los riesgos posibles serán ante la toma de la biopsia, molestias a la aplicación de la inyección de la anestesia con cefarquina al 1%. El procedimiento de la toma de la biopsia se realizará con punch 4mm lo que no amerita sutura de la misma, podría producirse signos de inflamación e infección si

no se realizan las medidas de asepsia y antisepsia pertinentes. Si la herida llegase a infectarse y el paciente no pudiese comprar el medicamento se utilizará dinero de la caja chica de la consulta de leishmaniasis. No existe ningún riesgo que comprometa la vida del paciente.

Yo, \_\_\_\_\_

Cédula de Identidad Número: \_\_\_\_\_, Declaro que he sido debidamente informado sobre el estudio titulado DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN POR PCR-RFLP DE ESPECIES DE *LEISHMANIA* AISLADAS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN VENEZUELA, a llevarse a cabo en la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, sede del Hospital Vargas adscrito a la Universidad Central de Venezuela. Así mismo declaro haber leído la información y que libremente he aceptado a suministrar datos de mi historia clínica, toma de biopsia de lesión para realización de PCR-RFLP; en constancia de lo cual firmo la presente. Igualmente declaro que he sido informado que este estudio es de carácter gratuito y no genera remuneración ni gastos.

También declaro estar cociente de la importancia de la enfermedad. Estoy en conocimiento de mi derecho de ser informado del resultado de la investigación y de la confiabilidad de los datos por mi suministrado.

Caracas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Nombre, C.I, Firma Testigo

## AUTORIZACIÓN

Yo, \_\_\_\_\_  
Cédula de Identidad Número: \_\_\_\_\_, Declaro que  
voluntariamente autorizo la anterior declaración de mí representado.

Caracas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Nombre, C.I, Firma Testigo

ANEXO 2

HISTORIA CLÍNICA DEL PROYECTO  
DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN POR PCR-RFLP DE ESPECIES DE  
*LEISHMANIA* AISLADAS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS  
TEGUMENTARIA EN VENEZUELA

NÚMERO PACIENTE: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_

PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_ TELÉFONO: \_\_\_\_\_

LOCALIZACIÓN LESIÓN: \_\_\_\_\_ FORMA CLINICA: \_\_\_\_\_

TIEMPO DE EVOLUCIÓN: \_\_\_\_\_ TAMAÑO LESIÓN: \_\_\_\_\_

FROTIS: \_\_\_\_\_ LEISHMANINA: \_\_\_\_\_

CULTIVO: \_\_\_\_\_ PCR: \_\_\_\_\_

BIOPSIA: \_\_\_\_\_

CONSENTIMIENTO INFORMADO: \_\_\_\_\_ FOTOGRAFIA: \_\_\_\_\_

TRATAMIENTO: \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES:

---

---

---

---

---

---