



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE PCR BASADA EN
EL ADN, PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN
EL SUBGÉNERO *VIANNIA* EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
LEISHMANIOSIS CUTÁNEA AMERICANA**

TEG

Bachiller: Enrique Contreras

Tutora: Dra. Palmira Guevara

CARACAS, VENEZUELA
AGOSTO - 2013

Índice

| | Pág. |
|---|------|
| Agradecimientos | 1 |
| Resumen | 2 |
| Introducción. | 3 |
| i. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> | 11 |
| ii. Tratamientos de la leishmaniosis | 12 |
| iii. Métodos de diagnóstico de la enfermedad e identificación del parásito | 15 |
| iv. Características del ADN mitocondrial en el Kinetoplasto | 21 |
| Antecedentes | 24 |
| Objetivos | 39 |
| Materiales y Métodos | 41 |
| 1. ADNs de cepas de referencia de especies de <i>Leishmania</i> | 41 |
| 2. Muestras de ADN de pacientes con Leishmaniosis Cutánea (LC). | 42 |
| 3. Análisis <i>in silico</i> de las especificidad de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 | 42 |
| 4. Determinación de los sitios de corte por enzimas de restricción en la región del minicírculo amplificada mediante los iniciadores LeishF3 y LeishB3. | 43 |
| 5. Ensayo PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos Hmod1/Hmod2/Hmod3. | 44 |

| | |
|---|----|
| 6. Normalización de las condiciones del ensayo de PCR-ADNk con los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 en cuanto a temperatura de hibridación y concentración de oligonucleótidos. | 45 |
| 6.1 Normalización de la temperatura de hibridación | 45 |
| 6.2 Normalización de la concentración de dNTPs y cationes [Mg] ⁺² | 46 |
| 6.3 Normalización de la concentración de oligonucleótidos y de los tiempos de incubación. | 46 |
| 7. Análisis de la especificidad del ensayo PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3. | 47 |
| 8. Empleo de sitios de corte polimórficos determinados para enzimas de restricción en regiones del ADNk en el subgénero Viannia en el desarrollo y aplicación de una prueba PCR-RFLP ADNk LeishF3/ LeishB3 capaz de diferenciar especies en el subgénero Viannia. | 47 |
| 9. Análisis de muestras de pacientes de una zona endémica en el estado Cojedes utilizando la prueba PCR ADNk | 49 |
| 10. Estrategias para el diseño de un flujograma de pruebas moleculares para la identificación progresiva desde el nivel de género hasta el de complejo/especie | 49 |
| Resultados | 50 |
| 1. Evaluación de las secuencias de mc a considerar, pertenecientes a especies de Leishmania del subgénero Viannia. | 50 |
| 2. Determinación de los sitios de corte por enzimas de restricción en la región del mc amplificada por los iniciadores LeishF3 y LeishB3 | 59 |
| 3. Ensayo PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos Hmod1/Hmod2/Hmod3. | 69 |

| | |
|---|-----|
| 4. Normalización de las condiciones del ensayo de PCR-ADNk, utilizando los iniciadores LeishF3 y LeishB3, en cuanto a temperatura de hibridación y concentración de oligonucleótidos. | 70 |
| 4.1 Normalización de la temperatura de hibridación | 70 |
| 5. Análisis de la especificidad del PCR ADNk utilizando los oligos LeishF3 y LeishB3. | 74 |
| 6. Desarrollo del ensayo PCR – RFLP ADNk con oligos LeishF3/ LeishB3. | 74 |
| 7. Análisis de muestras de pacientes diagnosticados con LC de una zona endémica en la localidad de Macapo, estado Cojedes. | 79 |
| 8. Diseño propuesto de un flujograma de pruebas moleculares para la identificación progresiva desde el nivel de género hasta el de complejo/especie | 87 |
| Discusión | 90 |
| Conclusiones | 97 |
| Consentimiento informado | 101 |
| Bibliografía | 103 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Distribución geográfica de la leishmaniosis cutánea y muco-cutánea en el continente americano. (WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis., 2010). | 4 |
| Figura 2. Distribución de las formas clínicas de LCA de acuerdo con los estados que presentan las mayores tasas de incidencia en c/u de ellas. Venezuela 1988-2007 (De Lima, H. y col., 2010). | 5 |
| Figura 3. Taxonomía de <i>Leishmania</i> (Baños y col., 2007). | 8 |
| Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .(Modificado de Stuart y col., 2008) | 11 |
| Figura 5. Algunos blancos para pruebas de diagnóstico moleculares. (Modificado de http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13 [consulta: 3 de julio de 2012]) | 23 |
| Figura 6. PCR ADNk (subgénero <i>Viannia</i>) empleando los oligos Leish F3 y LeishB3 B3. | 35 |
| Figura 7. Modelos de variación de secuencia en mc de ADNk, donde se representa un gradiente de variación de secuencia a lo largo del mc (Rogers y Wirth, 1987; Lacruz, 2011). | 36 |
| Figura 8. Alineamiento de las secuencias de mc de <i>L. (V) guyanensis</i> reportados en la investigación de Fernandes y col. en el año 1996 y en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj. | 55 |
| Figura 9. Alineamiento de las secuencias de mc de <i>L. (V) peruviana</i> reportados en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj. | 56 |
| Figura 10. Alineamiento de las secuencias de mc de <i>L. (V) panamensis</i> reportados en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj. | 57 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 11. Alineamiento de las secuencias de mc de <i>L. (V) braziliensis</i> encontradas en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj, y reportadas por Fernandes y colaboradores en el año 1996. | 58 |
| Figura 12. Distribución en el mc de diferentes aislados reportados de <i>Leishmania</i> (subgénero <i>Viannia</i>). de los sitios de restricción de <i>Hae</i> III y <i>Taq</i> I en las secuencias de | 64- 65 |
| Figura 13. Representación esquemática y simplificada de la distribución de los sitios de restricción de <i>Hae</i> III y <i>Taq</i> I en las secuencias de mc de diferentes aislados reportados de <i>Leishmania</i> (subgénero <i>Viannia</i>), | 67 |
| Figura 14. Resultado esperado de la aplicación de la prueba PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 en muestras de <i>Leishmania</i> de referencia | 68 |
| Figura 15. Ensayo PCR ADNk empleando los iniciadores Hmod1/Hmod2/Hmod3 | 69 |
| Figura 16. Normalización de la temperatura de hibridación de los iniciadores LeishF3 y LeishB3 | 70 |
| Figura 17. Normalización de la temperatura de hibridación de los iniciadores LeishF3 y LeishB3, mediante un gradiente de temperatura. | 71 |
| Figura 18. Normalización de la temperatura de hibridación de los iniciadores LeishF3 y LeishB3, empleando las temperaturas de 56 °C y 60 °C | 73 |
| Figura 19. Normalización de la temperatura de hibridación de los iniciadores LeishF3 y LeishB3, empleando las temperaturas de 50 °C y 55 °C | 73 |
| Figura 20. Análisis de la especificidad del PCR ADNk utilizando los oligos LeishF3 y LeishB3. | 75 |
| Figura 21. Desarrollo del PCR-RFLP ADNk con los oligos Hmod1/Hmod2/Hmod3 | 76 |
| Figura 22. Desarrollo del PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 | 77 |
| Figura 23. Desarrollo del PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 | 78 |

| | |
|---|-------|
| Figura 24. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR ADNk con los oligos Hmod 1-3 (género <i>Leishmania</i>) | 79 |
| Figura 25. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR-RFLP ADNk con los oligos Hmod 1-3 | 80 |
| Figura 26. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 | 81 |
| Figura 27. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR ADNk con los oligos Hmod 1-3 (género <i>Leishmania</i>) | 82 |
| Figura 28. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR-RFLP ADNk con los oligos Hmod 1-3 | 84 |
| Figura 29. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero <i>Viannia</i>) | 85 |
| Figura 30. Análisis de muestras de pacientes con LC. PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 | 86 |
| Figura 31. Flujograma del proceso de atención del paciente en la consulta externa de parasitología de la fundación social San Isidro Labrados, Macapo, Edo. Cojedes incluyendo las pruebas realizadas (Guevara y col.; 2013). | 87 |
| Figura 32. Flujograma propuesto del diagnóstico molecular del parásito <i>Leishmania</i> (Volpini y col., 2003) | 88 |
| Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> capaces de infectar a los humanos | 10 |
| Tabla 2. Tratamientos útiles frente a la leishmaniosis causada por las diferentes especies del parásito | 14 |
| Tabla 3. Algunas pruebas de PCR utilizadas en el diagnóstico de la leishmaniosis e identificación de los patógenos | 20 |
| Tabla 4. Algunas pruebas de diagnóstico molecular desarrolladas | 30-32 |

| | |
|---|----|
| Tabla 5. ADN de cepas de aislados de <i>Leishmania</i> utilizadas en los ensayos de PCR | 41 |
| Tabla 6. Secuencias de mc pertenecientes a aislados de <i>L. (V) guyanensis</i> | 52 |
| Tabla 7. Secuencias de mc pertenecientes a aislados de <i>L. (V) peruviana</i> | 52 |
| Tabla 8. Secuencias de mc pertenecientes a aislados de <i>L. (V) panamensis</i> | 53 |
| Tabla 9. Secuencias de mc pertenecientes a aislados de <i>L. (V) braziliensis</i> | 54 |
| Tabla 10. Análisis de restricción de las secuencias de mc | 60 |
| Tabla 11. Cantidad y tamaño de los fragmentos generados al digerir el producto del PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3, empleando simultáneamente las enzimas <i>Hae III</i> y <i>Taq I</i> | 63 |

Agradecimientos

Se agradece al proyecto FONACIT/MPPCT Misión Ciencia G-2007001442 y al CDCH-UCV por sus aportes, que permitieron la realización de este trabajo.

También agradezco a Dios y su guía, a mi familia por todos sus consejos y apoyo; y a la Universidad Central de Venezuela por todas las facilidades prestadas y orientadas hacia mi formación profesional. Además; también le doy las gracias al Instituto de Biología Experimental, al Laboratorio de Genética Molecular, y a mi Tutora Palmira Guevara, que junto con varios otros amigos y compañeros que en algún punto trabajaron a mi lado en el laboratorio, me aconsejaron y ayudaron durante la etapa de realización de este estudio y que así pudiese avanzar hacia el cumplimiento de mis metas profesionales.

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria desencadenada por especies del género *Leishmania*, afectando la salud pública a nivel mundial y al menos de 22 países en América. Las manifestaciones clínicas: leishmaniosis cutánea (LC) y la leishmaniosis muco-cutánea (LMC) en Latinoamérica, son originadas por las especies del subgénero *Viannia*, las cuales tienen como vectores a mosquitos del género *Lutzomyia*. En las medidas de control y tratamiento existen problemas como la evidente diferencia en la respuesta clínica del paciente frente a las drogas, de acuerdo a la especie infectante, impulsando a desarrollar mejores métodos de diagnóstico de esta enfermedad. En este sentido, se ha recomendado el empleo de las técnicas de PCR basadas en ADN de kinetoplasto, como método de diagnóstico molecular para identificar al parásito con propósitos clínicos y epidemiológicos. El proyecto propuso: el desarrollo de una prueba de PCR ADNk que discriminara a nivel del subgénero *Viannia* e incluirla en el diseño de un flujograma de evaluación de muestras clínicas para el diagnóstico de la LC y LMC, donde se emplearon diferentes aproximaciones moleculares que permitieron la identificación del parásito a nivel de género, subgénero, complejo y especie. Esta aproximación fue incluida en el proceso diagnóstico de un grupo de pacientes provenientes de un brote reciente de leishmaniosis en el estado Cojedes. El *análisis in silico* de la especificidad de los oligonucleótidos LeishF3/LeishB3, el diseño y normalización del PCR ADNk – RFLP, y la aplicación del flujograma en la identificación de siete muestras de pacientes diagnosticados con LC, conllevaron a que se lograra identificar la infección por *Leishmania (V) braziliensis* en estas últimas.

Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad metaxénica, que ocasiona un espectro de síntomas resultado de la infección por varias especies de protozoarios del género *Leishmania*. La enfermedad resulta de la interacción compleja de factores biológicos del parásito y el hospedador, que incluyen la respuesta inmunoinflamatoria. Esta enfermedad actualmente es un problema de salud pública en 88 países del mundo, incluyendo países del continente americano, entre ellos Venezuela (Figura 1). Esta epidemia representa un serio obstáculo para el desarrollo socioeconómico, afectando en gran medida a la población humana de bajo nivel socioeconómico, principalmente en países en desarrollo; hoy en día 350 millones de personas se consideran en riesgo de contraer leishmaniosis, y se reportan aproximadamente 2 millones de casos nuevos anualmente. Esta problemática se acentúa con la escasez de programas de control funcionales, la evidente tendencia de aumento de mortalidad causada por la leishmaniosis a nivel mundial, y además el hecho de que los métodos para diagnosticar la enfermedad toman tiempo y muchas veces son traumáticos para el paciente (Cáceres y Montoya, 2002; WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases., 2010).



Fig. 1. Distribución geográfica de la leishmaniosis cutánea y muco-cutánea en el continente americano. (WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis., 2010).

En Venezuela se ha observado un aumento de la incidencia acumulada de Leishmaniosis, en especial desde el año 1998, cuando se registraron 7,3 casos/100 000 habitante, hasta 1999 , con 11,3 casos/100 000 habitante. Este aumento en los casos de leishmaniosis se ha asociado con indicadores socioeconómicos, cambios climáticos, movimientos poblacionales y al avance en los métodos de diagnóstico que facilitan su detección. Posteriormente, durante el periodo 1970-2004 se observó un incremento continuo y anual de nuevos casos; donde las manifestaciones más frecuentes fueron la leishmaniosis cutánea (LC) y la muco-cutánea (LMC), mientras que solo se reportaron pocos casos de leishmaniosis visceral (LV). Adicionalmente, cabe señalar que se diagnosticaron 47.762 casos de las diferentes formas clínicas de leishmaniosis cutánea en el

periodo 1988-2007(Nieves y col., 2008; Rodríguez- Morales, A. y col., 2010; Félix y col., 2011).

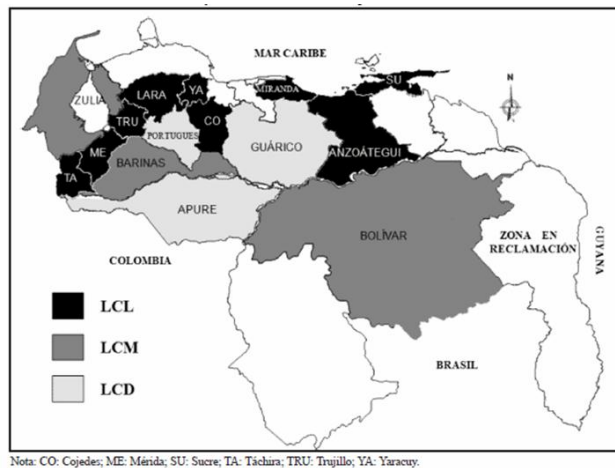


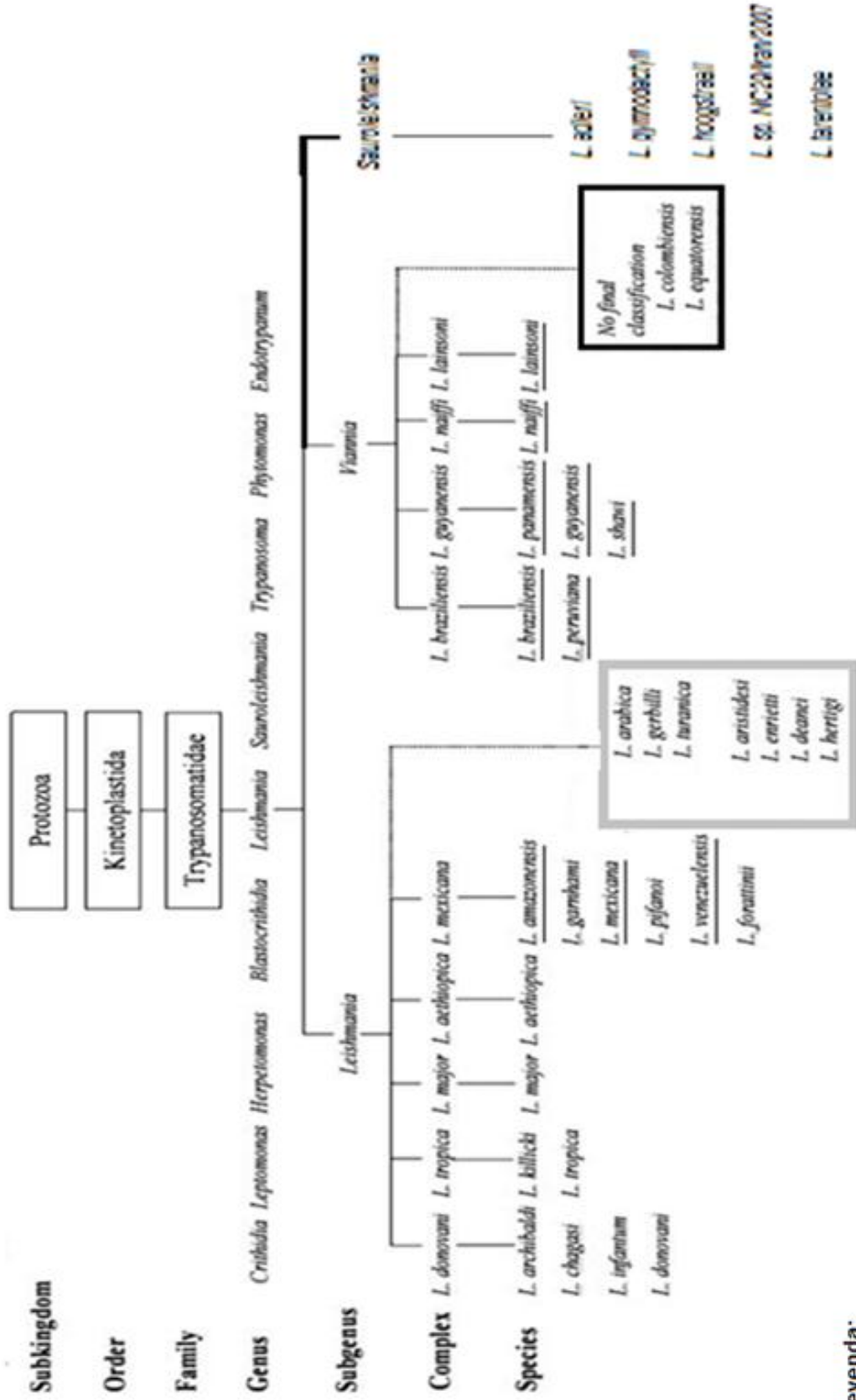
Fig. 2. Distribución de las formas clínicas de LCA de acuerdo con los estados que presentan las mayores tasas de incidencia en c/u de ellas. Venezuela 1988-2007 (De Lima, H. y col., 2010).

La Leishmaniosis tiene como agentes etiológicos a especies de parásitos del género *Leishmania*, con aspectos poco conocidos sobretodo en las poblaciones naturales. Existen al menos 20 especies de *Leishmania*, de entre las 35 en total que han sido descritas e identificadas (Figura 3), que son capaces de causar la enfermedad con un amplio espectro de síntomas en el humano. La distribución de las especies de *Leishmania* se encuentra estrechamente asociada con la de su vector, su hospedador reservorio, o ambos, por lo que es dependiente de las relaciones ecológicas y características concretas del medio ambiente. Entre las diferentes manifestaciones de la enfermedad se describen la leishmaniosis visceral (LV), fatal en los casos no tratados y causada por especies del complejo donovani, incluyendo *Leishmania (Leishmania) donovani* y *Leishmania (Leishmania) infantum*; leishmaniosis muco-cutánea (LMC), la cual se asocia principalmente con *Leishmania (Viannia) braziliensis*; la leishmaniosis cutánea

(LC), causada por especies como *Leishmania (Leishmania) major* en el Viejo Mundo y por *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* y *Leishmania (Viannia) panamensis* en el Nuevo Mundo. En el caso de la LC se describen distintas formas, donde tenemos la leishmaniosis cutánea localizada (LCL) (en Venezuela causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) mexicana*, leishmaniosis diseminada (LD) (en Venezuela causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*), y la leishmaniosis cutánea difusa (LCD) (en Venezuela causada principalmente por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (Leishmania) mexicana*) (ver figura 2). Esta diversidad de manifestaciones clínicas de la enfermedad y sus complicaciones son consecuentes con la complejidad de la epizootología de la leishmaniosis, y con que las infecciones pueden ser causadas por numerosas especies del parásito, con una gran diversidad de especies de mosquitos y mamíferos que han sido incriminados como vectores y hospedadores o reservorios, respectivamente. Lo anterior contribuye a la dificultad de estudio del parásito *Leishmania* como modelo biológico desde un punto de vista ecológico, genético y filogenético, aunado a que los determinantes genéticos responsables por el polimorfismo clínico en humanos son aún desconocidos (Reithinger y col., 2006; Baños y col., 2007; Rogers y col., 2011).

Adicionalmente, la clasificación actual de los subgéneros de *Leishmania* capaces de infectar a humanos procede principalmente de la revisión presentada por Lainson y Shaw (1987) donde se señala que, los miembros del subgénero *Leishmania* se desarrollan exclusivamente en el intestino medio y el intestino anterior de sus insectos vectores (desarrollo del tipo suprapylarian); mientras que

los miembros del subgénero *Viannia* incluyen una fase de desarrollo en el intestino posterior (desarrollo peripylarian) (Correa, Brazil y Soares, 2005).



Leyenda:

- o Especies subrayadas: causantes de LC en el continente americano.
- o Especies dentro del cuadro gris: No infectan a seres humanos.
- o Especies dentro del cuadro negro: No se han clasificado definitivamente.

Fig. 3. Taxonomía de *Leishmania*; (Modificado de Bañus y col., 2007; <http://www.uniprot.org/taxonomy/5688> [Consulta: 17 de mayo de 2012])

Observamos que las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniosis tienen como agentes etiológicos a especies del género *Leishmania*, ubicadas en dos subgéneros (*Leishmania* y *Viannia*) y varios complejos de especies, de acuerdo con su distribución global en el “Nuevo” y “Viejo” mundo, como se representa en la tabla 1. Existe una mayor diversidad de especies que infectan al ser humano en el continente americano, en relación a los continentes africano, europeo y asiático. Varias de estas especies se presentan con un tropismo dermatrópico y mucotrópico en la infección humana, particularmente *L. (V) braziliensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (L) mexicana* y *L. (L) major*. Esta diversidad en la clínica y las especies responsables nos muestra el complejo escenario del diagnóstico de la enfermedad y la identificación del agente etiológico, y dirige nuestra atención hacia el desarrollo de métodos moleculares para la identificación de estas especies del subgénero *Viannia* y agentes etiológicos de la LMC y LC. La disponibilidad de una metodología rápida, sencilla y amigable, que brinde simultáneamente el diagnóstico y la precisa identificación del parásito, habilitaría la evaluación de la prognosis y prescripción de tratamientos apropiados para el paciente en las áreas endémicas de la enfermedad, e impulsaría a los estudios epidemiológicos (modificado de WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010).

Tabla 1.

Especies de *Leishmania* capaces de infectar a los humanos

| Subgénero | <i>L. (Leishmania)</i> | <i>L. (Leishmania)</i> | <i>L. (Viannia)</i> | <i>L. (Viannia)</i> |
|---|------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Continentes: África, Europa, Asia | <i>L. donovani</i> | <i>L. major</i> | | |
| | <i>L. infantum</i> | <i>L. tropica</i> | | |
| | | <i>L. killickia</i> | | |
| | | <i>L. aethiopica</i> | | |
| | | <i>L. infantum</i> | | |
| Continente: América (principalmente Centro y Suramérica) | <i>L. infantum</i> | <i>L. infantum</i> | <i>L. (V) braziliensis</i> | <i>L. (V) braziliensis</i> |
| | | <i>L. mexicana</i> | <i>L. (V) panamensis</i> | <i>L. (V) panamensis</i> |
| | | <i>L. pifanoi a</i> | <i>L. (V) guyanensis</i> | |
| | | <i>L. venezuelensis</i> | <i>L. shawi</i> | |
| | | <i>L. garnhamia</i> | <i>L. naiffi</i> | |
| | | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. lainsoni</i> | |
| | | | <i>L. lindenbergi</i> | |
| | | | <i>L. (V) peruviana</i> | |
| | | | <i>L. colombiensis b</i> | |
| Tropismo principal | viscerotrópico | dermotrópico | dermotrópico | mucotrópico |

a Estado de la especie bajo discusión; **b** posición taxonómica bajo discusión (modificado de WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010).

Ciclo de vida de *Leishmania*

Durante el complejo ciclo de vida de las diferentes especies de parásitos del género *Leishmania*, estos organismos digenéticos transcurren dos estadios básicos: uno extracelular dentro de un mosquito vector de la subfamilia Phlebotominae, y otro estadio intracelular en un hospedador vertebrado (figura 4). De los seis géneros descritos de mosquitos vectores, sólo dos son de importancia médica en la transmisión del parásito: *Phlebotomus* de los continentes: África, Europa y Asia, dividido en 12 subgéneros; y *Lutzomyia* del continente americano, dividido en 25 subgéneros y grupos de especies, habiéndose descrito 30 especies antropófilas en Venezuela. Entre las 500 especies de mosquitos de la subfamilia Phlebotominae conocidos, sólo 31 han sido identificados positivamente como vectores de especies patógenas de *Leishmania* y 43 como probables vectores (Baños y col., 2007).

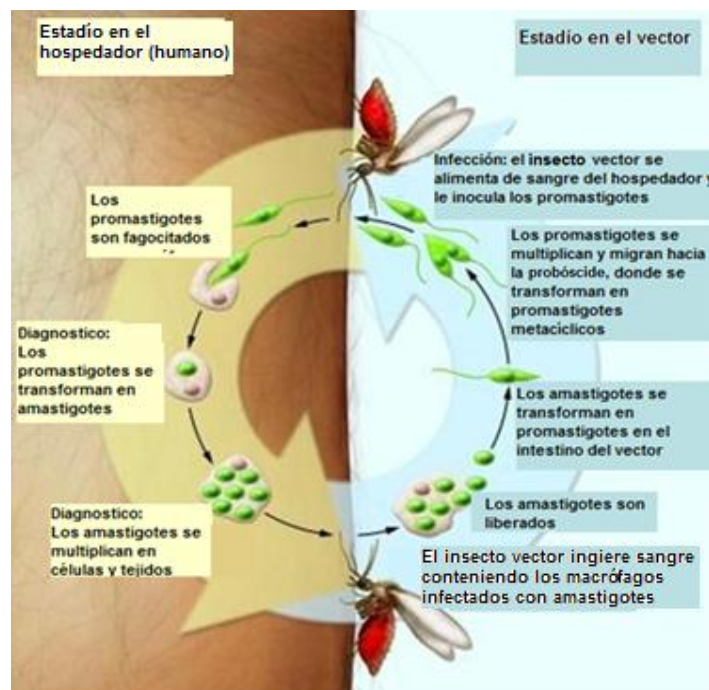


Fig. 4. Ciclo de vida de *Leishmania* (Modificado de Stuart y col., 2008).

Tratamiento de la leishmaniosis

Se han utilizado ciertos regímenes de tratamiento y fármacos para tratar la leishmaniosis teniéndose en cuenta la variación del pronóstico de la enfermedad según la especie del parásito infectante, y en consecuencia esto resalta la importancia del desarrollo de métodos para la identificación de especies que son requeridos para los estudios epidemiológicos en programas de control y así mejorar el manejo clínico de los pacientes. Sin embargo, existe evidencia de que la respuesta del paciente frente a los medicamentos anti-leishmaniales no es especie-específica, y esto puede relacionarse a la complejidad de las interacciones parasito-hospedador. Estas investigaciones se realizan en respuesta a la necesidad originada por el aumento de la probabilidad de que la resistencia del parásito a los tratamientos sea más frecuente con el paso del tiempo, la dificultad de establecer recomendaciones consensuadas de tratamiento, y la falta de reproducibilidad entre los estudios. Los resultados obtenidos en estas investigaciones, en cuanto a la especificidad de los tratamientos frente a la leishmaniosis se resumen en la tabla 2, donde tenemos que puede observarse un grado de respuesta similar frente a grupos de especies del parásito, lo que permite aplicar regímenes de tratamiento racionalmente y evitando exponer al paciente a terapias ineficaces que promuevan la aparición de resistencia en los patógenos. De allí tenemos que, los antimoniales tienen efectos adversos severos (pudiendo ocasionar alteraciones electrocardiográficas que obligan a detener su uso), la identificación de la especie infectante oriente hacia el uso de antimoniales pentavalentes en LC y LMC causadas por *L. (V) braziliensis*, y terapias alternativas con miltefosina (interfiere con las vías de transducción de señales

celulares e inhibe la biosíntesis de fosfolípidos y esteroides) en infecciones causadas por *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. (L) mexicana*, e inclusive para manifestaciones de LV por *L. (L) donovani*; cabiendo señalar que el orden de la sensibilidad de las especies frente a la miltefosina in vitro fue: *L. (L) donovani* > *L. (L) aethiopica* > *L. (L) tropica* > *L. (L) mexicana* > *L. (V) panamensis* > *L. (L) major*. Otra opción consiste en el uso de la termoterapia, la cual ha demostrado ser efectiva en casos debidos a *L. (L) mexicana*, observándose que esta terapia resulta en un tiempo de cura del paciente más corto respecto al de los tratamientos con antimoniales. Además, podemos señalar que en casos de LC causada por *L. (V) panamensis*, y especialmente *L. (V) guyanensis*, el uso de pentamidina (interfiere con la síntesis de ADN en *Leishmania*) ha servido como otra alternativa altamente efectiva, más aún si se aplica lo antes posible. Mientras que, como alternativas eficaces en los casos de LC y LMC por *L. (V) braziliensis* resistentes a los antimoniales, tenemos el empleo de anfotericina B liposomal (menos tóxica, y de mayor costo) y el desoxicolato de anfotericina B (altera la permeabilidad de la membrana celular de los parásitos, y tiene una alta toxicidad y costo). Adicionalmente, el uso de ungüentos de paramomicina ha demostrado ser efectivo en casos de Leishmaniosis por *L. (L) major* y *L. (L) tropica*, incrementando su eficacia y tendencia a causar reacciones inflamatorias locales al combinarse con cloruro de metilbenceno (modificado de Arevalo y col., 2007; Minodier y Parola, 2007; Ramos y Segovia, 1997; Goto y col., 2010).

Tabla 2.

Tratamientos útiles frente a la leishmaniosis causada por las diferentes especies del parásito

| Especies | Tratamientos | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------|----------------------------|---------------|----------------------------|--------------|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|--|
| | Paramomifina | cloruro de metilbencetonio | Termosterapia | Antimoniales pentavalentes | Ketoconazole | Miltefosina | pentamidina | Antoleishina B liposomal | desoxicolato de antoleishina B | |
| <i>L. mexicana</i> | \$ | \$ | \$ | \$ | \$ | \$ | | | | |
| <i>L. guyanensis</i> | \$ | \$ | \$ | \$ | | \$ | \$ | \$ | | |
| <i>L. panamensis</i> | \$ (pomada) | \$ | \$ | \$ | | \$ | \$ | | | |
| <i>L. braziliensis</i> | \$ | \$ | \$ | \$ | | | | \$ | \$ | |
| <i>L. amazonensis</i> | \$ | \$ | \$ | \$ | | | | | | |
| <i>L. peruviana</i> | \$ | \$ | \$ | \$ | | | | | | |
| <i>L. venezuelensis</i> | \$ | \$ | \$ | \$ | | | | | | |
| <i>L. major</i> | \$ | | | | | | | | | |
| <i>L. tropica</i> | \$ | | | | | | | | | |
| <i>L. donovani</i> | | | | | | \$ | | | | |

Leyenda: \$ tratamiento eficaz;

(Modificado de Minodier y Parola, 2007; WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, 2010; Chrusciak-Talhari y col., 2011)

Métodos de diagnóstico de la enfermedad e identificación del parásito

Existen diferentes métodos de diagnóstico empleados en la caracterización de la enfermedad y en la identificación de las diferentes especies del parásito, entre ellos se encuentran las pruebas parasitológicas, que incluyen la microscopia mediante la identificación de las formas amastigotas en la evaluación de frotis teñidos con Giemsa o colorante de Romanowski de biopsias de lesiones (en el caso de LC) o de aspirados de nódulos linfáticos, médula ósea o del bazo (en el caso de LV). Se ha evidenciado que la identificación de las formas amastigotes puede tener una elevada dificultad debido a la limitada sensibilidad de la metodología. Estos métodos continúan utilizándose como referencia por su especificidad, y la evaluación microscópica de frotis por aposición de tejido de las lesiones se mantiene como una herramienta útil en el diagnóstico en regiones rurales endémicas para la LC y LMC, donde solo existe una infraestructura básica y poco especializada. Adicionalmente, se ha demostrado que el cultivo *in vitro* de los parásitos a partir de muestras de lesiones o biopsias como método de identificación tiene una elevada sensibilidad respecto a los métodos de observación directa al microscopio óptico, sin embargo el cultivo *in vitro* requiere de una infraestructura de laboratorio adecuada, personal técnico capacitado, así como de un tiempo considerable para la obtención de los resultados (Goto y col., 2010; Félix y col., 2011)

En cuanto a las pruebas de diagnóstico inmunológicas, actualmente se dispone de métodos como:

- Ensayos serológicos, entre los que se encuentran: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), donde se fija sobre un portaobjetos los antígenos o parásitos de especies de *Leishmania* de referencia y luego se le añade el suero de quien se sospecha la presencia de anticuerpos específicos y se forma el complejo antígeno-anticuerpo si la reacción es positiva, de manera que al agregar la anti-inmunoglobulina humana conjugada con un fluorocromo esta se asociará con el anticuerpo del complejo formado y al excitar estas moléculas fluorescentes con luz UV en un equipo, podemos detectar la presencia de anticuerpos específicos para la especie de parásito que infecta o ha infectado al paciente. El ensayo inmunoenzimático (ELISA), como otra técnica comúnmente empleada, que tiene una variedad de modalidades y sirve como una prueba preliminar para determinar la presencia de anticuerpos particulares dirigidos al antígeno del parásito o particularmente del antígeno en el suero del paciente; y la aglutinación directa de los promastigotes, en la cual la muestra donde se sospecha que hay anticuerpos específicos hacia los antígenos del parásito se coloca en contacto con el antígeno particular en pocillos, y se observa la formación de discos al aglutinarse los antígenos y el anticuerpo específico en caso de encontrarse este en la muestra del paciente debido a una infección subclínica o un padecimiento previo ya curado(http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Laboratorio_TPN8.pdf [Consulta: 23 de julio de 2012];http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/25/orgentec/autoimmundiagnostik.vlu/Page/vsc/en/ch/25/orgentec/diagnostik_elisa_varianten_en.vscml.html [consulta: 3 de julio de

2012];http://www.ungefcm.gq:8081/datas/agentesbiologicos/contenidos/general/es/bibliografia_basica/microcap82.pdf [consulta:26 de julio de 2012]).

- Además, se dispone de otros métodos inmunológicos de identificación de los parásitos: como las pruebas de hipersensibilidad retardada específica para *Leishmania*; entre las que se encuentra la reacción de Montenegro o prueba cutánea de la leishmanina, la cual es útil en el diagnóstico de LC y LMC aunque generalmente proporciona un resultado negativo en la forma cutánea difusa y se debe considerar que su sensibilidad es baja debido a que los anticuerpos detectados por la prueba se desarrollan lentamente y generalmente alcanzan títulos bajos. Adicionalmente disponemos del empleo de tiras inmuno-cromatográficas con antígenos purificados (en el caso de LV se utiliza el antígeno K39), donde se emplea una tira generalmente de nitrocelulosa con bandas a la cual se han agregado anticuerpos marcados de manera que al agregar la muestra en un punto de la tira y permitir su elución a lo largo de la tira mediante una solución tamponada, puede ocurrir la formación de complejos antígeno-anticuerpo que son eluidos hasta un equipo, que al detectar la llegada de los anticuerpos marcados nos permitirá comprobar la presencia del antígeno de interés en la muestra (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>[consulta: 5 de Enero de 2013]; <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap35.asp> [consulta: 3 de julio de 2012]).

- Otro método consiste en el “inmunoblotting” o “Western Blotting”, consiste en la preparación de una mezcla proteínica con el antígeno de interés y tratada con SDS, a la cual se le realizará una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar a las proteínas, seguida de una transferencia mediante corriente eléctrica hacia un papel de nitrocelulosa o PVC; de manera que al agregar un anticuerpo acoplado a una enzima en la superficie del papel, se formarán los complejos antígeno-anticuerpo que pueden ser detectados mediante varias maneras, como podría ser utilizando el sustrato de la enzima y observando la aparición del color del producto de la catálisis en las bandas donde existe el complejo antígeno-anticuerpo (modificado de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo15.htm> [consulta: 23 de julio de 2012]).

Para la identificación del parásito ha sido necesario desarrollar métodos muy selectivos y sofisticados, debido a que aquellas especies de *Leishmania* que infectan a los humanos son morfológicamente similares, y a que co – infecciones como HIV - SIDA, criptococcosis diseminada, o citomegalovirus en pacientes que presentan leishmaniosis, dificultan el diagnóstico de esta última. En respuesta a esto; se han desarrollado y aplicado pruebas de amplificación molecular, entre las que se encuentran los ensayos de PCR para el diagnóstico de la infección por especies del género *Leishmania*.

Las primeras pruebas utilizaron como blanco a regiones conservadas en el ADN del kinetoplasto para la identificación del género y a las especies del subgénero *Viannia* y del complejo *braziliensis* (ver tabla 3). Otros blancos, como

las regiones repetidas del genoma nuclear, el espaciador intergénico ribosomal, los genes del mini exón y regiones subteloméricas han servido para el desarrollo de ensayos de PCR punto final para identificar a nivel de género, complejo de especies, e inclusive en formato multiplex. Con respecto a estas pruebas moleculares que se encuentran disponibles actualmente para el diagnóstico de la leishmaniosis y de las cuales se señalan algunas en la tabla 3, cabe indicar han demostrado un número de aplicaciones prácticas particulares y ventajas, entre las que destacan la detección altamente específica y sensible de *Leishmania* mediante diversos ensayos de PCR (sin ser afectados por la especie o subgénero) con respecto al examen microscópico y cultivo de parásitos, lo cual es requerido para realizar diagnósticos diferenciales del paciente y proceder con el tratamiento más adecuado. Particularmente, la cuantificación de parásitos en el tejido huésped mediante PCR cuantitativa en tiempo real con alta sensibilidad analítica (0.0125 par/ml de sangre) y excelente linealidad, sirviendo para el monitoreo del progreso de la enfermedad en el paciente y del avance de la terapia. Finalmente la demostración de la viabilidad de los parásitos mediante la amplificación de ARN mediante transcripción reversa acoplada a una prueba PCR, permitiendo determinar una infección activa (Guevara y col., 2012; WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010; Félix y col., 2011; Reithinger y Dujardin, 2007).

Tabla 3.

Algunas pruebas de PCR utilizadas en el diagnóstico de la leishmaniosis e identificación de los patógenos

| ADN blanco Copias/genoma | Nivel de identificación | Tamaño pb | Sensibilidad Parásitos(p) | Referencia |
|--|--|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| ADNk Región conservada del minicírculo 10.000 | Género <i>Leishmania</i> y complejo <i>L. braziliensis</i> | 120 y 70 respectivamente | no evaluada | Belli y col., 1998 |
| ADNk Región conservada del minicírculo 10.000 | Complejo <i>braziliensis</i> | 70 | no evaluada | López y col., 1993 (11) |
| Minixón 100 copias | Complejos <i>braziliensis</i> , <i>mexicana</i> y <i>donovani</i> | 146-149 218-240 351-397 | 1 fg 10 pg 10 pg | Harris y col., 1999 (12) |
| Espaciador Intergénico Ribosomal | Subgénero <i>Viannia</i> | 120 | 1 0,25 parásitos | Guevara y col., 1994 (13) |
| Telómero | Complejo <i>donovani</i> | ➤ 100 pb | 1 fg | Chiurillo y col., 2003 (14) |

(Guevara y col., 2012; Belli y col., 1998)

Características del ADN mitocondrial en el Kinetoplasto

Una característica de los organismos pertenecientes al orden Kinetoplastida, como en el caso de las diversas especies del parásito del género *Leishmania*, es la presencia de ADN mitocondrial en el Kinetoplasto, el cual es la estructura característica de este taxón. Este ADN constituye entre el 10 y 20 % del contenido de ADN total del parásito y consiste en una red de ADN circulares concatenados, divididos en dos clases: los maxicírculos homogéneos (25 – 50 moléculas de 20 kb), y los minicírculos heterogéneos (de 0,8 kb en promedio), con hasta 10^4 copias por célula. Los maxicírculos son la contraparte funcional del ADN mitocondrial, conteniendo los genes que codifican para las enzimas y coenzimas involucradas en el ciclo de Krebs. Los minicírculos codifican ARNs de guía para la edición de información en el maxicírculo (guiando los residuos de purina que pueden hibridar con los uracilos insertados, y que no hibridan con los uracilos codificados que serán eliminados de la secuencia), como la del ARNm de la subunidad III de la citocromo oxidasa codificada en los maxicírculos. Se ha pronosticado que el número de clases de minicírculos en *Leishmania* es mayor de 60 (deducido a partir del número hipotético de los genes mitocondriales que codifican para ARNs abreviados que requieren de una edición de los transcritos pre-ARNm para ser funcionales o “criptogenes”), e inclusive se ha propuesto que algunas de estas clases presentan amplificación preferencial durante la expresión de los ARNs guías requeridos. Además, los minicírculos de ADNk en la familia *Trypanosomatidae* se encuentran organizados uniformemente y contienen una o varias regiones altamente conservadas (CR) (una en el género *Leishmania*, y hasta cuatro en el género *Trypanosoma*) utilizadas durante la replicación del

minicírculo. Dentro de la CR existen tres bloques altamente conservados (CSB) que se extienden entre 8 a 12 pb: CSB1 (GGGCGT), CSB2 (CCCCGTTC), y CSB3 (GGGGTTGGTGTA). Adicionalmente, hay una homología inter-específica de aproximadamente 90 a 100% entre los tres bloques), donde, CSB1 y CSB3 son casi idénticos en todas las especies investigadas hasta la fecha. Este modelo de organización ha sido útil para determinar blancos para el desarrollo de pruebas moleculares (ver figura 5), y nos ha proporcionado al menos dos estrategias diferentes para el análisis mediante PCR de los minicírculos, una que emplea cebadores que son específicos para las regiones de CSB1 y CSB3 y orientados hacia el exterior para la amplificación de las regiones variables del mc (VRs) adyacentes a las regiones conservadas vecinas (CRs); y otra aproximación que utiliza cebadores específicos solo para la región CSB3 con el fin de lograr la amplificación de las VRs y CRs simultáneamente (Yurchenko y col., 1999; Simpson L., 1997; Rogers y col., 2011; Baños y col., 2007).

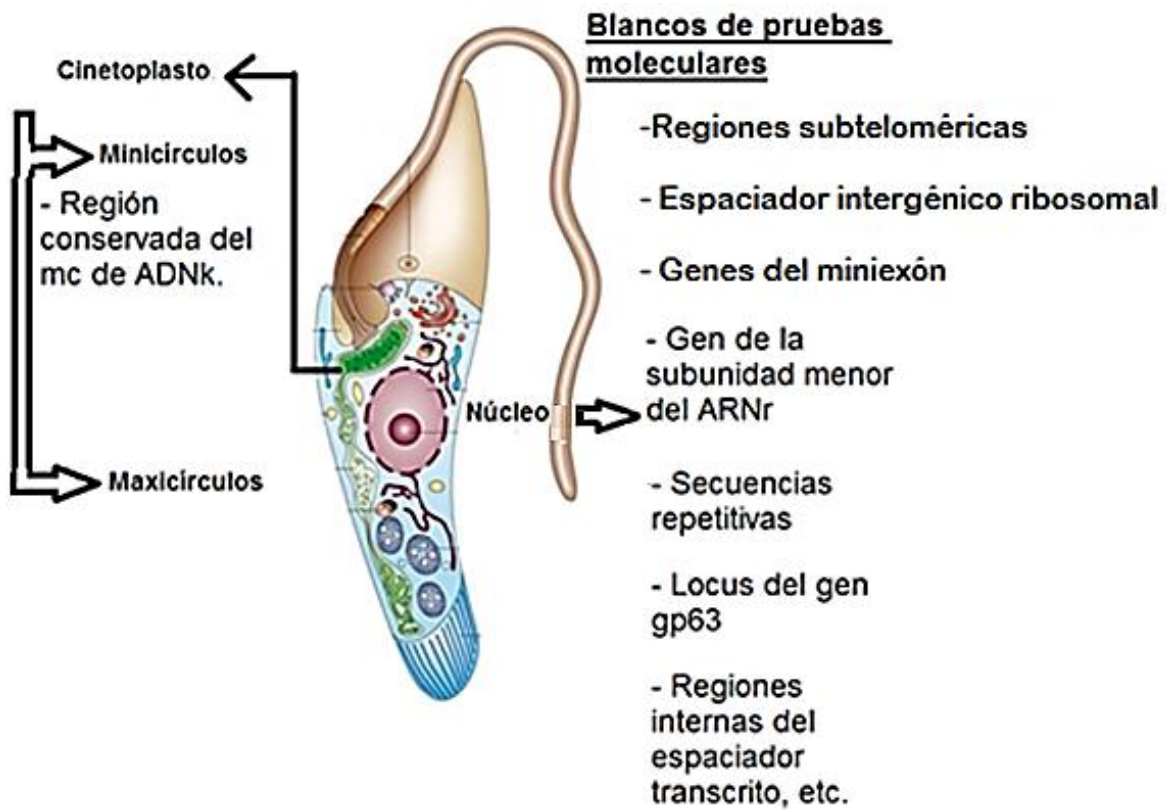


Fig. 5. Algunos blancos para pruebas de diagnóstico moleculares. (Modificado de http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13 [consulta: 3 de julio de 2012])

Antecedentes

Desde principios de la década de los 80, varios métodos moleculares se han evaluado para el diagnóstico de la leishmaniosis; entre los cuales, los ensayos basados en PCR han constituido el principal método de diagnóstico molecular utilizado por los investigadores y profesionales de la salud. Se han descrito distintos formatos de PCR disponibles para su aplicación en diagnóstico, que en términos generales podrían clasificarse en enfoques de "tecnología media", "tecnología alta", y "tecnología baja". En los enfoques de "tecnología baja" se han simplificado los métodos de PCR en cuanto a los pasos de amplificación del blanco y/o la detección de los productos de PCR, permitiendo su uso en laboratorio con un mínimo de equipo especializado; mientras que en los enfoques de "tecnología media" se emplean ensayos de PCR convencionales (o PCR de punto final), comúnmente utilizados donde los amplicones del PCR se resuelven por electroforesis y se visualizan generalmente empleando una tinción con bromuro de etidio. Por otra parte, en los enfoques de "tecnología alta" se analizan los productos de PCR durante su amplificación luego de su visualización con SYBR Green o su hibridación con sondas fluorogénicas requiriendo equipos para la detección de fluorescencia y cuantificación del producto de PCR (Reithinger y Dujardin, 2007).

Un ejemplo de una técnica molecular pertenecientes al enfoque de "tecnología media" consiste en el formato PCR-RFLP (RFLP: longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción), en el cual luego de realizarse ensayos de PCR convencionales, los productos del PCR son digeridos utilizando

enzimas de restricción, y luego resueltos mediante electroforesis. Utilizando esta aproximación se ha realizado la identificación y caracterización rápida y directa de especies de *Leishmania* a partir de cultivos así como directamente de muestras de pacientes, reservorios y vectores (modificado de Bensoussan y col., 2006; Reithinger y Dujardin, 2007).

Entre los enfoques de “tecnología baja”, se puede resaltar a la amplificación isotérmica mediada por la formación de asas (LAMP), donde ocurre la amplificación de ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas, prescindiendo de equipos como el termociclador, debido a que la prueba LAMP emplea la polimerasa *Bst I*, que desplaza y libera una de las cadenas simples del ADN. De manera que, luego de una serie de ciclos autogenerados de la amplificación se obtienen productos con la región blanco de interés con una alta especificidad, debido a los 3 pares de oligonucleótidos que reconocen 6 secuencias específicas; discriminando diferencia entre un nucleótido. Existen una variedad de métodos para visualizar los productos amplificados en la LAMP, como: la electroforesis en gel de agarosa, mediante un colorante intercalador fluorescente de ADN (Bromuro de etidio, SYBER Green I, Calceína, Azul de Hidroxinaftol, o compuestos que detectan diferencias en las concentraciones de Mg^{+2} en la reacción), SYBR green y luz U.V., la medición por turbidimetría del precipitado pirofosfato de Mg^{+2} , producto de los amplicones (Reithinger y Dujardin, 2007).

Al momento de seleccionar el ensayo de PCR más adecuado para realizar un estudio diagnóstico e identificación del parásito, es de suma importancia considerar la secuencia blanco en el genoma del parásito, así como el nivel de

identificación taxonómica que permite la prueba (Tabla 4.). En esta luz podemos mencionar una diversidad de pruebas diagnósticas moleculares que han sido desarrolladas, cuyo blanco de amplificación es el ADNk, empleando diferentes iniciadores diseñados para amplificar distintas regiones del minicírculo (generalmente prefiriéndose incluir la región conservada), y luego son complementadas con otras metodologías que permiten que la prueba alcance niveles de discriminación taxonómica más específicos e incrementen su sensibilidad y especificidad, entre otras características (ver tabla 4). Como ejemplo del punto previo tenemos a Pirmez y colaboradores (1999), quienes han demostrado que la amplificación de ADNk de minicírculo mediante PCR para el subgénero *Viannia* acoplada a la hibridación con sondas específicas constituye una herramienta muy útil en el diagnóstico de LMC. La cual permite determinar hasta el nivel de especie de *Leishmania* presente en la muestra; adicionalmente demostrándose que esta prueba de PCR ADNk, en conjunto con la hibridación con sondas representa una alternativa a los ensayos dependientes de radioactividad para la caracterización de subgénero y especie, mejorando remarcablemente la sensibilidad de los métodos de diagnóstico del parásito. La modalidad de las pruebas PCR-RFLP que amplifican una región de ADNk de minicírculo, y donde la enzima *Hae III* empleada es capaz de digerir el producto de amplificación de *L. (V) braziliensis* (de 120 pb, de manera que el método no es dependiente de la clase de mc) en fragmentos de 80 y 40 pb por la presencia de un único sitio de corte ausente en *L. (L) amazonensis*. Posteriormente en este ensayo se verifica la sensibilidad y especificidad mediante la hibridación con sondas radioactivas al producto de la amplificación preliminar del ADNk. El anclaje de los oligos a la

región conservada hace al método independiente de la clase de mc. Se demuestra que la prueba PCR-RFLP evaluada es capaz de diferenciar entre *L. (V) amazonensis* y *L. (V) braziliensis* en una forma confiable, rápida y resulta más simple respecto a la prueba de hibridación alternativa. Las pruebas de PCR basadas en la amplificación del ADNk han sido recomendadas como herramienta estándar para el diagnóstico de rutina de la leishmaniosis, considerando la elevada sensibilidad que ha demostrado este método de diagnóstico en casos de LC (Bensoussan y col., 2006)

Adicionalmente; se dispone de la prueba de PCR con reacción multiplex, la cual ha sido empleada para el diagnóstico de LC en el continente americano e identificando los parásitos del género *Leishmania* y complejos *braziliensis*, *donovani* y *mexicana* simultáneamente, reduciéndose la cantidad de ensayos de PCR requeridos para la caracterización del parásito mediante la combinación de dos protocolos de PCR en una reacción multiplex. (Disch y col, 2005; Belli y col., 1998).

Por otra parte, se han desarrollado otras pruebas diagnósticas moleculares que tienen blancos de amplificación distintos del ADNk, tales como: la amplificación de secuencias en las repeticiones del gen del mini-exón del parásito, desarrollado por Katakura y col. (1999), permitiendo discriminar entre las especies *L. (L) donovani*, *L. (L) tropica*, *L. (L) mexicana*, y *L. (V) braziliensis*; e inclusive podría complementarse con una prueba PCR-RFLP bajo condiciones estrictas y empleando iniciadores arbitrarios y especie-específicos para la identificación de especies.

Por otra parte, Cardoso da Graça y col. (2012) han desarrollado otros ensayos con la finalidad de realizar el diagnóstico molecular de la leishmaniosis y distinguir una diversidad de especies de *Leishmania* en muestras clínicas, con resultados satisfactoriamente reproducibles; y estos ensayos consisten en: la amplificación mediante PCR de la secuencia específica de 234 pb ubicada en la región del gen de la proteína de choque térmico 70 (hsp70) seguida del empleo de las enzimas de restricción *Bst* I y *Hae* III, cabiendo señalarse que la amplificación de hsp70 produce fragmentos de 230 hasta 390 pb y que estos genes están dispuestos en un único clúster genómico que contiene cinco o seis copias de HSP70-I seguido por una copia de HSP70-II en algunas especies de *Leishmania*; y en otra prueba aparte basada en la amplificación de una región de 350 pb que corresponde al espaciador interno transcrito (ITS1) en el ADN ribosomal (habiendo entre 20 y 40 copias por célula en las especies de *Leishmania*) y el empleo de la enzima de restricción *Sau*3AI, cabiendo señalarse que esta prueba PCR ITS1 ha sido recomendada como una herramienta altamente sensible y específica para identificar a las especies de *Leishmania* en casos de LC (Bensoussan y col., 2006).

Recientemente se han desarrollado pruebas PCR-RFLP basadas en los genes de la HSP70 y el espaciador intergénico ribosomal que en conjunto permiten identificar las especies de *Leishmania* directamente de muestras clínicas. En el caso del PCR-RFLP HSP70 se amplifica un producto de 1300 pb que al digerirse con las enzimas *Bst* I y *Hae* III genera patrones especie-específicos (García y col., 2006).

Además, se han desarrollado pruebas de PCR basadas en la amplificación del gen del citocromo b (*Cyt b*) ubicado en los maxicírculos en organismos del orden Kinetoplastida, que complementadas con la secuenciación de los productos de PCR y el análisis de la secuencia de ARN y aminoácidos codificados, permiten discriminar entre especies de *Leishmania* y reconstruir sus relaciones filogenéticas (Luyo-Acero y col., 2003).

Adicionalmente, se dispone de la amplificación del gen de la isomerasa glucofosfato (GPI) en el ADN genómico mediante PCR en tiempo real, desarrollado por Wortmann y col. (2005), permitiendo detectar y discriminar entre los complejos *L. mexicana*, *L. Viannia*, y *L. infantum/donovani*; mientras que simultáneamente se monitorea la formación de los productos de PCR durante la reacción, teniendo como ventaja su elevada especificidad y que los resultados pueden observarse rápidamente (en aprox. 1 hora, luego de procesarse el ADN de la muestra) y posibilitando que esta prueba molecular se utilice como herramienta de decisiones clínicas.

Tabla 4.

Algunas pruebas de diagnóstico molecular desarrolladas

| Prueba molecular | Secuencia de ADN blanco en el genoma; y enzimas de restricción empleadas | Nivel de identificación | Oligonucleótidos empleados como iniciadores |
|---|--|---|---|
| PCR ADNk mc (Leishmania) Pímez y col. (1999) | Secuencia de 120 pb correspondiente a la CR del mc | Género Leishmania | Hmod1 (5'-GGGKAG GGG CGT TCT GCG AA-3') Hmod 2 (5'-CGG SCGGTATTACAGCGAGCGC-3') Hmod 3 (5'-GSGCCACTATATTACACCAACCGCC-3') |
| PCR ADNk mc Dirsch y col. (2005) | Secuencias de 120 pb y 51 pb respectivamente en las CR del ADNk de mc. | Género Leishmania y Subgénero Viannia | 5-(G/C)(G/C)(G/C)(A/C)TAT(A/T)TACACCAACCGCC-3' 5-GGGAGGGGGCGT-3 (Pímez et al., 1999). 5-GAA CCG GGT TTC TGT ATG C-3 (López et al. 1993) |
| PCR multiplex Bello y col., (1999) | Secuencias de 54 y 120 pb del ADNk de mc, específicas para el complejo <i>L. braziliensis</i> y el resto de los complejos del género respectivamente | Género Leishmania y Complejo <i>L. braziliensis</i> simultáneamente | MP3H (5-GAAGGGGGTTTCTGTATGC-3) MP1U (5-TACTCCCGACATGCCCTCTG-3) 13A (5-GTGGGGAGGGGGGTTCT-3) 13B (5-ATTTTACACCAACCGCCCAAGTT-3) |
| PCR ADNk mc (Leishmania) Fichoux y col. (1999) | LT1 (145 bp) y LT2 (120 bp), en las CR del ADNk de mc | Subgénero Leishmania | RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGGGGTAGG-3) RV2 (5'-CCAGCTGGCCTATTTTACACCA-3) |
| PCR mini-exon (Leishmania) Katakura y col. (1999) | Secuencias de 450 pb, de 450 pb, de 320 a 350 pb, y de 250 pb respectivamente en las repeticiones del gen del mini-exon de <i>Leishmania</i> | Complejos: <i>L. donovani</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. mexicana</i> , y <i>L. braziliensis</i> | S-1629 (5-gggajmcaatataagtagacagaactg-3) S-1630 (5-gggagccttctgctacttattatttggtta-3) |

Continuación de la tabla 4.

Algunas pruebas de diagnóstico molecular desarrolladas

| Prueba molecular | Secuencia de ADN blanco en el genoma; y enzimas de restricción empleadas | Nivel de identificación | Oligonucleótidos empleados como iniciadores |
|--|--|---|---|
| PCR Multiplex single-step Harris y col., (1998) | Secuencias de 146 a 149 pb, de 218 a 240 pb, y de 351 a 397 pb respectivamente en las repeticiones del gen de la secuencia de ARN líder empalmada, del mini-exón | Complejos: <i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> , y <i>L. donovani</i> | LU-5A (5'-TTT ATTGGTATGCGAAACTTC-3') LB-3C (5'-CGT(C/G)CCGAACCCCGTGTTC-3') LM-3A (5'-GCACCGCACCCGG(A/G)CCAC-3') LC-3L(5'-GCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT-3') |
| PCR-RFLP. Volpini y col. (2003) | Secuencia de 120 pb de la región conservada (CR) del mc. Se utilizó la enzima Hae III (Invitrogen) | <i>L. (V) amazonensis</i> y <i>L. (V) braziliensis</i> . Solo el producto de <i>L. (V) braziliensis</i> es digerido. | 150: 5-GGG(G/T)AGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3 152: 5-(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCACCCCC-3 (Passos et al., 1996) |
| PCR-RFLP ADNk mc Saraiva y col. (2010) | Secuencia de 120 pares de bases en la CR del ADNk de mc. Se utilizó la enzima Hae III | Especies: <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> y <i>L. infantum</i> | (5'CCG CCCCTATTTTACACCAACCC3', 5'GGCCCACTATATTACACCAACCC3' y 5'GGGGAGGGG GGTTCTGCCAA3') (Michalsky et al. 2002) |
| PCR hsp70- 234pb complementado con PCR-RFLP Cardoso da Graça y col. (2012) | Secuencia de 234 pb en el gen hsp70 en el ADN genómico. Se utilizaron las enzimas BstI y Hae III | Especies: <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. infantum</i> , y <i>L. lainsoni</i> | <i>hsp70C</i> (234 bp): (5'-GGACGAGATCGAGCGCATG GT-3 y 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3) |

Continuación de la tabla 4.

Algunas pruebas de diagnóstico molecular desarrolladas

| Prueba molecular | Secuencia de ADN blanco en el genoma; y enzimas de restricción empleadas | Nivel de identificación | Oligonucleótidos empleados como iniciadores |
|--|--|--|--|
| <p>PCR ITS1 complementado con PCR-RFLP. Cardoso da Graça y col. (2012)</p> | <p>Secuencia de 350pb en el ITS1 en el ADN ribosomal. Se utilizó la enzima <i>Sau3A1</i></p> | <p>Especies: <i>L. amazonensis</i>, <i>L. braziliensis</i>, <i>L. guyanensis</i>, <i>L. infantum</i>, y <i>L. lainsoni</i></p> | <p>LITSR (5-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3) y L5.8S (5-TGA TAC CACTTA TCG CAC TT-3)</p> |
| <p>PCR <i>Cyt b</i> (<i>Leishmania</i>) Luyo-acero y col. (2004)</p> | <p>Gen del <i>Cyt b</i> (aprox. 1080 pb) en el maxicirculo</p> | <p>Especies de <i>Leishmania</i></p> | <p>COIIF (5'-TAATACGACTCACTATAAGTTTATATTGACATTTTGTWATT-3') MURF4R (5'-GGGTTTTCCCGAGTCACGACGAATCTCTCTCTCCCCCTT-3')</p> |
| <p>PCR en tiempo real Wortmann y col. (2005)</p> | <p>Secuencia de 700 pb que incluye el gen de la isomerasa glucosilato (GPI) en el ADN genómico</p> | <p>Complejos: <i>L. mexicana</i>, <i>L. Viannia</i>, y <i>L. infantum/donovani</i></p> | <p>Para el complejo <i>Viannia</i> : LV-f (5'-CAACAAAATGCTTCGCAACAG-3), LV-r (5'-CGCAACGCCCTTCATGGA-3) y LV-sonda (5'-CGACGGGATATTGTTGACTT-3').</p> <p>Para el complejo <i>L. mexicana</i>: Lm-f (5'-CCAGTCCCAGAACACAACATG-3) y Lm-r (5'-CCTATCGACCAACACAGAAAAGG-3) y Lm-sonda (5'-ATGCCGAACTCCCGAA-3)</p> <p>Para el complejo <i>L. infantum/donovani</i> : Lid-f (5'-CCAGATGCCGACCAAAAGC-3) y Lid-r (5'-CGGCACGTGATGGATAAC-3) y Lid-sonda (5'-ATCGGCAGGTTCT-3)</p> |

En el año 2011, Lacruz desarrolló una prueba LAMP para las especies del subgénero *Viannia*. Durante el desarrollo del ensayo LAMP se observó que los iniciadores externos LeishF3 y LeishB3, al evaluarse en un ensayo PCR ADNk sobre 7 especies/aislados de referencia del subgénero *Viannia* y *Leishmania* (*L. (L) donovani*, *L. (L) infantum*, *L. (L) chagasi*, *L. (V) panamensis*, *L. (L) mexicana*, *L. (L) pífanoi*, *L. (L) amazonensis*), demostraban especificidad a nivel del subgénero *Viannia* (ver figura 6a.). Estos oligos externos, cuyas secuencias son LeishF3 (sentido): 5'-ACCACCCGACATGCCT-3', y LeishB3 (reversa complementaria): 5'-CGAGAGCTAGCCCCGAGT-3'; se utilizaron también en un ensayo de PCR preliminar sobre ADN de especies del subgénero *Viannia* con la finalidad de evaluar el funcionamiento de los iniciadores y los reactivos, así como también se obtuvo en primera instancia la amplificación del producto del tamaño esperado de 169 pb (ver figura 6b.).

Durante la amplificación por PCR los iniciadores LeishF3 y LeishB3 hibridan en regiones flanqueantes del CR del mc, permitiendo la amplificación de fragmento que incluye la región conservada (CR) y un número variable de pares de bases (aproximadamente 50 pb) "río arriba" y "río abajo" de esta CR. La región de hibridación de los oligos LeishF3 y LeishB3 se corresponde con regiones variables del mc (Rogers y Wirth, 1987).

El análisis de las secuencias clonadas de mc en diferentes especies de *Leishmania* realizado por Rogers y Wirth en el año 1987 demostró que existen secuencias con diferentes especificidades taxonómicas, las cuales se encuentran en un orden definido a lo largo de un mc; y organizadas en un gradiente de

variación de secuencias específico que se extiende “río arriba” de la CR, con secuencias conservadas y específicas a nivel de complejo, seguidas por secuencias con la mayor divergencia (Fig. 7).

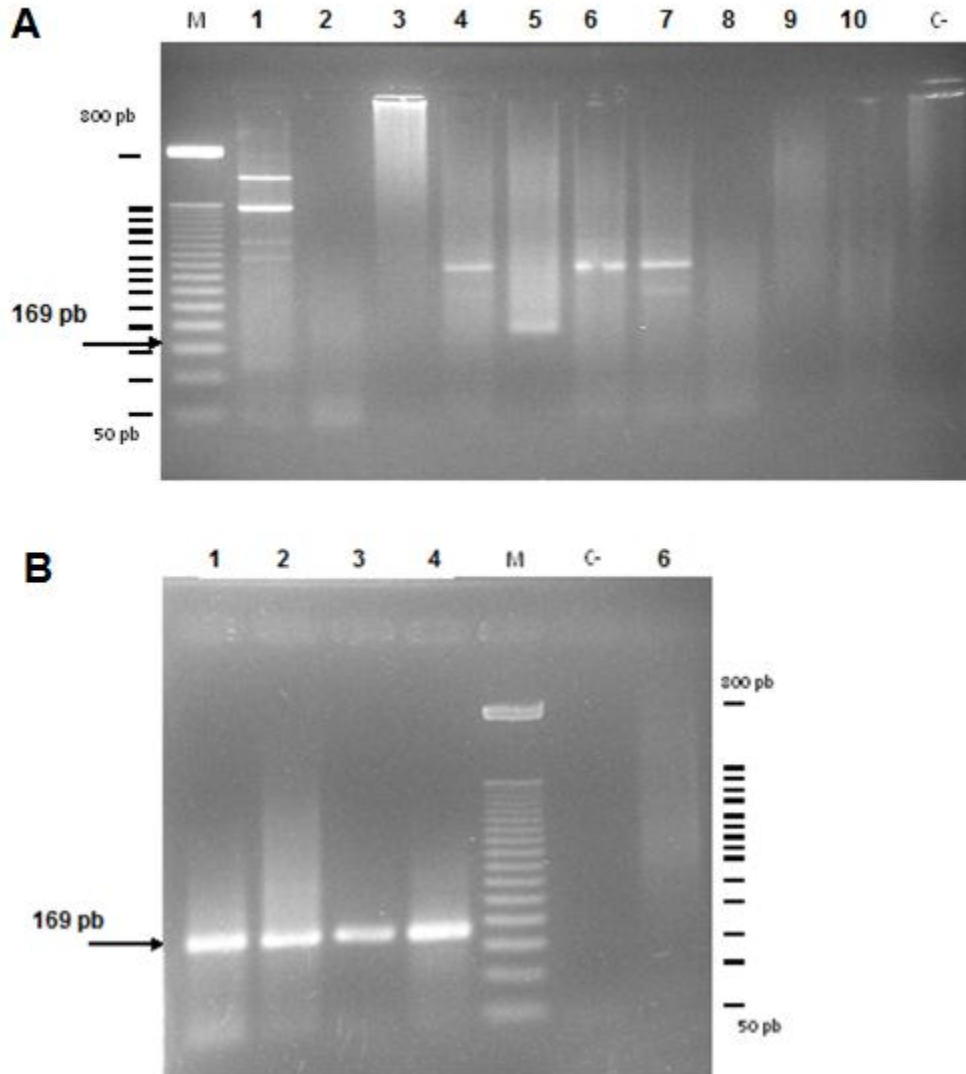


Figura 6. PCR ADNk (subgénero Viannia) empleando los oligos Leish F3 y Leish B3.

- **A.** M: Marcador de Peso Molecular 50 pb. Carril 1: *L. donovani* sp. M/HOM/ET/67/HV3. Carril 2: *L. donovani* sp. M/HOM/IN/80/DD8. Carril 3: *L. infantum* M/HOM/IN/80/IPT1. Carril 4: *L. (L) chagasi* M/HOM/BR/74/PP75. Carril 5: *L. (V) panamensis* 1169. Carril 6: *L. mexicana* HON/BZ/82/BEL21. Carril 7: *L. mexicana* MNY/BZ/62/M379. Carril 8: *L. mexicana* M/HOM/PA/89 APP. Carril 9: *L. m. pifanoi* MHOM/VE/60. Carril 10: *L.m. amazonensis* M/HOM/BR/73/M2269. C-: Control negativo H₂O.(Lacruz; 2011).
- **B.** M: Marcador de peso molecular 50 pb. Carril 1: *L. (V) braziliensis* M/HOM/BR/75/M2903. Carril 2: *L. (V) braziliensis* M/HOM/BR/86/101BA. Carril 3: *L. (V) guyanensis* M/HOM/BR/75/M4147. Carril 4: *L. (V) panamensis* M/HOM/PA/71/LS-94. Carril 6: *T. cruzi*. C-: Control negativo H₂O. (Lacruz; 2011).

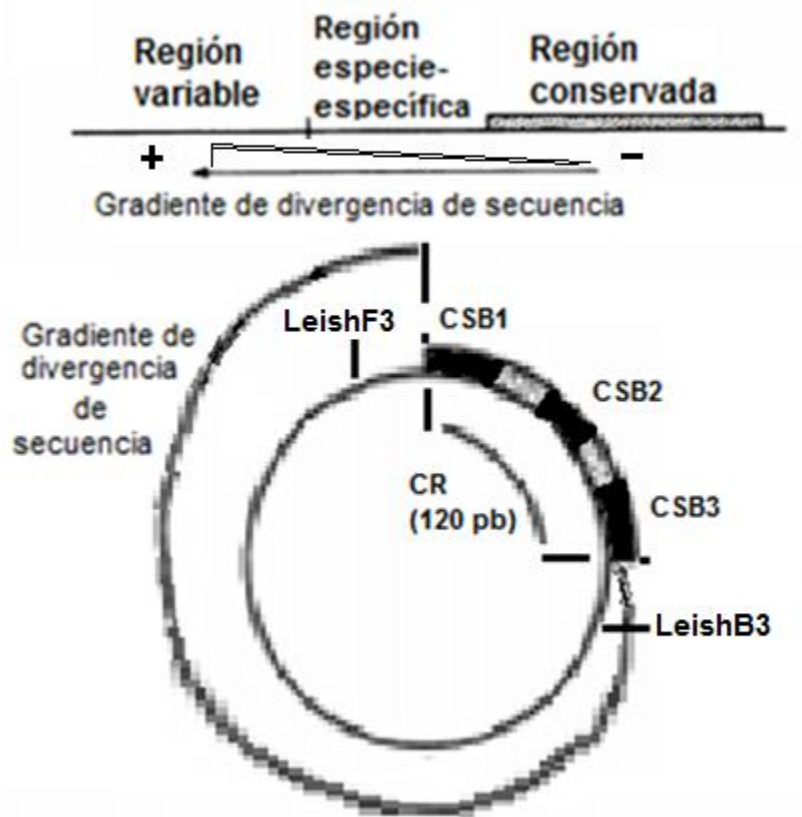


Figura 7. Modelos de variación de secuencia en mc de ADNk, donde se representa un gradiente de variación de secuencia a lo largo del mc (Rogers y Wirth, 1987; Lacruz, 2011).

Existen actualmente una serie de dificultades en cuanto a la operatividad del diagnóstico molecular de la leishmaniosis en nuestro país y el resto del mundo, donde algunas van asociadas al manejo y cualidades de los ensayos moleculares, como el costo del análisis en laboratorio, el consumo de un tiempo considerable para su realización, así como la falta de estandarización y control de calidad en los protocolos basados en PCR. En vista de esto, se recomienda el uso de protocolos estandarizados de extracción, controles adecuados presentes en el laboratorio y en condición óptima, una cepa de control de referencia de *Leishmania*, y la

participación en un programa de control de calidad externo. Otras dificultades se relacionan a las características de la leishmaniosis, como el amplio espectro de manifestaciones clínicas que puede presentar la enfermedad, la dificultad de realizar un diagnóstico del patógeno definitivo y preciso en el caso de lesiones crónicas frente a la baja carga parasitaria y la similitud entre el proceso granulomatoso de varias enfermedades inflamatorias, la existencia de especies simpátricas (la infección por ambas especies ocurre en esta región geográfica particular) en las zonas endémicas de la leishmaniosis cutánea y la visceral, entre otras (Viana de Andrade, 2011; Reithinger y Dujardin, 2007).

Considerándose lo anterior, así como las recomendaciones aportadas por estudios previos, puede señalarse que la utilización de un flujograma, incorporando diferentes aproximaciones moleculares, dirigido a la identificación del parásito *Leishmania*, desde el nivel de género hasta los complejos taxonómicos y/o especies en muestras de humanos, reservorios y vectores; que podría beneficiar en gran medida la normalización de procedimientos a utilizarse en el diagnóstico clínico y epidemiológico.

Considerando esta problemática del diagnóstico y las referencias previas en el laboratorio de Genética Molecular, donde se realizó este estudio, nos propusimos incorporar los iniciadores LeishF3 y LeishB3 a una prueba de PCR y analizar la posibilidad de desarrollar una prueba PCR-RFLP sobre la región de ADNk amplificada por esta. Además; nos propusimos desarrollar un flujograma, donde al incorporar ambas de estas pruebas moleculares, nos permitiese la

identificación secuencial y progresiva del parásito *Leishmania* desde el nivel de género hasta los complejos taxonómicos y/o especies

Objetivos

General:

- Desarrollar una prueba PCR ADNk con la finalidad de reconocer a las especies del *Leishmania* del subgénero *Viannia* e incluirla en el diseño de un flujograma de pruebas moleculares dirigido a la identificación progresiva desde el nivel de género hasta los complejos taxonómicos y/o especies, aplicable en el diagnóstico clínico y epidemiológico.

Específicos:

1. Analizar *in silico* la especificidad de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 mediante búsqueda BLAST en banco de datos accesibles a través del NCBI.
2. Normalizar las condiciones del ensayo de PCR-ADNk con los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3, en cuanto a concentración de cationes $[Mg]^{+2}$, temperatura de hibridación, concentración de oligonucleótidos y tiempos de incubación.
3. Evaluar la especificidad de la prueba PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 y una batería de ADNs de cepas de referencia de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*.
4. Identificar sitios de corte por enzimas de restricción en el producto del ensayo PCR ADNk para el diseño de una prueba PCR-RFLP dirigida a diferenciar especies en el subgénero *Viannia*.
5. Diseñar el flujograma de pruebas moleculares para la identificación progresiva desde el nivel de género hasta los complejos taxonómicos y/o especies
6. Analizar un conjunto de muestras (hisopados) de pacientes de una zona endémica en el estado Cojedes.

Materiales y Métodos

1. ADNs de cepas de referencia de especies de *Leishmania*

La tabla 5 muestra la procedencia e identificación de las especies de referencia de *Leishmania* utilizados en este trabajo. Las muestras de ADNs de cada especie pertenecen a la colección del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental y fueron utilizadas como referencia en los ensayos de especificidad, normalización, y como referencia en las pruebas de PCR.

Tabla 5.

ADN de cepas de aislados de *Leishmania* utilizadas en los ensayos de PCR

| Subgénero | Especie | Código |
|-------------------|----------------------------|--------------------|
| <i>Leishmania</i> | <i>L. (V) donovani</i> | M/HOM/IN/80/DD8 |
| | <i>L. (V) chagasi</i> | M/HOM/BR/74/PP65 |
| | <i>L. (V) mexicana</i> | M/HOM/BZ/82/BEL21 |
| <i>Viannia</i> | <i>L. (V) braziliensis</i> | M/HOM/BR/75/M2903 |
| | <i>L. (V) guyanensis</i> | M/HOM/BR/75/M4147 |
| | <i>L. (V) panamensis</i> | M/HOM/PA/71/LS- 94 |
| | <i>L. (V) braziliensis</i> | M/HOM/BR/ LTB-300 |
| | <i>L. (V) panamensis</i> | 1169 |

2. Muestras de ADN de pacientes con Leishmaniosis Cutánea (LC).

Se utilizó el ADN aislado de muestras de hisopado de siete pacientes diagnosticados con Leishmaniosis, quienes acudieron a la consulta de parasitología. Para resguardo de la confidencialidad de la información se identificaron las muestras con las iniciales de los nombres de los pacientes.

3. Análisis *in silico* de la especificidad de los oligos LeishF3 y LeishB3.

Para el estudio *in silico* se utilizaron las secuencias de *Leishmania* citadas por Fernandes y colaboradores del año 1996, y las encontradas en las bases de datos GenBank de las páginas web:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> y www.Arsa.ddbj.nig.ac.jp/html/, con el fin de identificar las secuencias disponibles de mc que incluyesen la región conservada del mc, así como 50 pb de secuencias flanqueantes, para las especies *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) braziliensis*, y *L. (V) peruviana*.

Una vez encontradas las secuencias, se utilizó el programa DNAMAN for Windows, de LynnonBioSoft, versión: 5.2.2.0, con la finalidad de determinar la presencia de cada uno de los tres bloques de secuencias altamente conservadas (Conserved block sequence, CBS), CSB1, CSB2 y CSB3 ubicados dentro de la región conservada (CR) en las secuencias de mc de cuatro especies de *Leishmania* subgénero *Viannia*. Seguidamente determinamos la ubicación de los sitios de hibridación de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 en las regiones flanqueantes de la CR con el propósito de comprobar si las secuencias de los mc de las especies de este subgénero contenían las regiones diana para la hibridación de estos iniciadores. Utilizando

el programa DNAMAN se alinearon las secuencias de mc (completas o divididas en las dos partes A y B) de las especies del subgénero *Viannia* con los iniciadores LeishF3 y LeishB3. El alineamiento obtenido fue ajustado manualmente para obtener el mayor % de identidad posible.

4. Determinación de los sitios de corte por enzimas de restricción en la región del minicírculo (mc) amplificada mediante la prueba PCR ADNk utilizando los iniciadores LeishF3 y LeishB3.

Con la finalidad de diseñar la prueba PCR-RFLP capaz de diferenciar especies en el subgénero *Viannia* y que se ha propuesto incluir en el flujograma de diagnóstico de LC (ver sección 9 de materiales y métodos), se utilizó el programa DNAMAN for Windows versión: 5.2.2.0 para evaluar la presencia de sitios de corte por enzimas de restricción en cada una de las secuencias de mc de aislados seleccionadas en la sección 2, considerando que incluyesen la CR (completa o solo con un CSB faltante) y también los sitios de hibridación de al menos uno de los iniciadores LeishF3 y LeishB3. La búsqueda se acotó a las regiones del mc entre los sitios de hibridación de los oligos LeishF3 y LeishB3 para las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*. En la búsqueda inicial se determinó la presencia y posición de los sitios de corte presentes para todas las enzimas disponibles en el sistema (listas DNAMANRE.ENZ y RESTRICT.ENZ) a manera preliminar, y luego con solo las enzimas *Hae* III y *Taq* I.

5. Ensayo PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos Hmod1/Hmod2/Hmod3.

El ensayo PCR ADNk con los iniciadores Hmod1/Hmod2/Hmod3 (descrito en el informe técnico proyecto Misión Ciencias G-2007001442, Subproyecto parásitos 2009; Rodríguez y col., 1990; Pirméz y col., 1999) permite identificar a las especies del género *Leishmania*, ha sido considerado en el flujograma de diagnóstico de LC (ver sección 9, materiales y suministros), fue utilizado para corroborar la identidad de las muestras de ADN de las especies de referencia de *Leishmania* y al mismo tiempo verificar los reactivos en relación a su actividad en el ensayo de amplificación y la ausencia de contaminación.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L conteniendo una concentración final de 2 μ M para cada uno de los tres iniciadores, concentración de $MgCl_2$ de 1,5 μ M, dNTPs a 0,2 mM, tampón de amplificación 1X de la enzima GoTaq PROMEGA (compuesto por una formulación de propietario a pH 8,5, contiene un colorante azul y otro amarillo que migran a diferentes velocidades durante la electroforesis en un gel de agarosa al 1%, sin cloruro de magnesio), y un volumen de muestra de ADN de 2 μ L. Las muestras de ADN empleadas correspondieron a las especies *L. (V) braziliensis* M2903, *L. (V) braziliensis* LTB-300, *L. (V) panamensis* LS-94, y *L. (V) guyanensis* M4147.

Las condiciones utilizadas para el ciclaje en el termociclador MJ Research, PTC-200, incluyeron una fase de desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}$ C por 4 minutos; seguida de 35 ciclos compuestos por una fase de desnaturalización a 94 $^{\circ}$ C por 30 segundos, una fase de hibridación a 50 $^{\circ}$ C por

30 segundos, y una fase de extensión a 72 °C por 30 segundos; prosiguiendo con una fase de extensión final a 72 °C por 10 minutos (Informe técnico. Proyecto Misión Ciencias G-2007001442. Subproyecto parásitos, 2009).

6. Normalización de las condiciones del ensayo de PCR-ADNk con los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 en cuanto a temperatura de hibridación y concentración de oligonucleótidos.

6.1 Normalización de la temperatura de hibridación.

En primera instancia se llevó a cabo el PCR ADNk (subgénero *Viannia*) empleando los oligos LeishF3 y LeishB3 y utilizando las condiciones del PCR ADNk descrito por Lacruz en el año 2011 (ver figura 6b.), donde se empleó un volumen final de 25 µL conteniendo una concentración final de los oligos de 0,4 µM, concentración de MgCl₂ de 2 mM, dNTPs a 0,2 mM, tampón de amplificación 1X de la enzima GoTaq, y un volumen de muestra de ADN de 2 µL, en las muestras de: *L. (V) braziliensis* LTB-300, *L. (V) guyanensis* M4147, *L. (V) panamensis* LS-94, y *L. (V) braziliensis* M2903. Para este ensayo, las condiciones del programa de ciclaje en el termociclador MJ Research, PTC-200, incluyeron una fase de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos; continuando con 40 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, una fase de hibridación a 60 °C por 1 minuto, y una fase de extensión a 72 °C por 1 minuto; prosiguiendo con una fase de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Este ensayo inicial permitió confirmar el estado de las alícuotas de iniciadores LeishF3 y LeishB3 empleados, seleccionar un control positivo

(C+) para el resto de las pruebas de PCR, y verificar que los reactivos no se encontrasen contaminados.

Posteriormente se realizó un gradiente de temperatura de hibridación de 50 °C a 60 °C, y un ensayo posterior incluyendo solo las temperaturas de 56 °C y 60 °C; utilizando los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3, y el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf); con la finalidad de determinar la temperatura óptima de hibridación en la cual se eliminan las bandas inespecíficas observadas en la prueba PCR con las condiciones reportadas por Lacruz, en el año 2011.

6.2 Normalización de la concentración de dNTPs y cationes $[Mg]^{+2}$

Se evaluó una concentración final de dNTPs y de $MgCl_2$ en la reacción de PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 de 0,2 mM y 2 mM respectivamente (Lacruz, 2011).

6.3 Normalización de la concentración de oligonucleótidos y de los tiempos de incubación.

Se probaron las concentraciones finales para ambos oligonucleótidos en la reacción de PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 de: 0,4 μM y 2 μM ; donde la concentración de 0,4 μM corresponde con la descrita por Lacruz en el año 2011 para ambos iniciadores y se mantuvieron, los tiempos de incubación reportados por Lacruz en el año 2011.

7. Prueba PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 y una batería de ADNs de cepas de referencia de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, para el análisis de la especificidad de esta prueba molecular.

Con la finalidad de evaluar la especificidad de la prueba PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3, se utilizaron una batería de ADNs de las siguientes cepas de referencia: *L. (V) braziliensis* M2903, *L. (V) guyanensis* M4147, *L. (V) panamensis* LS-94, *L. (L) mexicana* BEL21, *L. (L) donovani* DD8, *L. (L) chagasi* PP65, *L. (V) panamensis* 1169. Las condiciones de reacción del PCR han sido descritas en la sección 6.1; y empleándose una concentración de los oligos LeishF3 y LeishB3 de 2 μ M, con base a los resultados obtenidos de la optimización de esta prueba de PCR.

8. Empleo de sitios de corte polimórficos determinados para enzimas de restricción en regiones del ADNk en el subgénero *Viannia* en el desarrollo y aplicación de una prueba PCR-RFLP ADNk LeishF3/ LeishB3 capaz de diferenciar especies en el subgénero *Viannia*.

Utilizando las enzimas de restricción *Hae* III y *Taq* I, cuyos sitios de corte fueron determinados en la sección 3; se procedió a evaluar el funcionamiento de la prueba PCR-RFLP ADNk mediante un ensayo utilizando los iniciadores LeishF3/ LeishB3, así como los reactivos y las concentraciones finales señalados y modificados según los resultados de los ensayos de la sección 5, los cuales nos permitieron determinar las condiciones óptimas para la prueba PCR ADNk LeishF3/ LeishB3.

Con lo anterior se obtuvo la amplificación de ADN de muestras de diferentes especies de *Leishmania* de referencia; los amplicones fueron digeridos con las enzimas de restricción seleccionadas, inicialmente digiriendo 5 µL del producto de PCR con 1 U de enzima *Hae* III por 3 horas a 37 °C empleando el tampón específico de la enzima (Volpini y col., 2003). Los productos de la digestión fueron separados mediante electroforesis a 50 V por 30 – 60 minutos en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturizantes. Se utilizaron solo agua y reactivos de grado de biología molecular (GBM). Los fragmentos fueron visualizados luego de realizar una tinción del gel con bromuro de etidio, y se llevó a cabo el registro de la imagen generada con luz UV utilizando el equipo transiluminador GelDoc.

Como prueba confirmatoria y control del ensayo PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3, se incluyó la prueba PCR-RFLP sobre el ADNk descrita por Volpini y colaboradores en el 2003; este ensayo amplifica la CR de mc ADNk resultando en un producto de 120 pb, y luego se digiere este amplicón empleando la enzima *Hae* III generando dos fragmentos de 80 y 40 pb para *L. (V) braziliensis*.

Para la amplificación de la CR utilizamos los iniciadores Hmod1, Hmod2, y Hmod3 descrito en la sección 5. El producto fue digerido con la enzima *Hae* III; y los productos de la digestión fueron analizados en geles de poliacrilamida al 8% y 0,5X TBE en condiciones no desnaturizantes, descritos previamente.

Los tamaños en pb correspondientes a cada banda presente en cada una de las amplificaciones y digestiones fueron determinados, graficando el logaritmo base 10 del r_f en cm vs el tamaño del fragmento de ADN (correspondiente en pb).

9. Prueba PCR ADNk para el análisis de muestras de pacientes

diagnosticados con LC de una zona endémica en el estado Cojedes

Al haberse comprobado la especificidad de la prueba PCR ADNk y la prueba PCR-RFLP ADNk para el diagnóstico molecular, y disponerse de las condiciones de reacción normalizadas; se inició el estudio de siete muestras clínicas de ADN obtenidas de hisopados de lesiones obtenidas de los pacientes provenientes de una zona endémica del estado Cojedes, quienes acudieron a la consulta de parasitología de la fundación San Isidro Labrador, Municipio Limas Blanco, Estado Cojedes y consintieron participar en el proyecto.

10. Estrategias para el diseño de un flujograma de pruebas moleculares para la identificación progresiva desde el nivel de género hasta el de complejo/especie.

Con la finalidad de diseñar este flujograma con aplicaciones confirmatorias en el diagnóstico clínico y epidemiológico de la LC, se seleccionaron un conjunto de pruebas moleculares de las reportadas en la literatura y la desarrollada en este trabajo, para lograr la identificación progresiva y eficaz hasta el nivel de complejo y especie de los Kinetoplastidios presentes en las lesiones. El flujograma fue inicialmente corroborado con ADN de cepas de referencia de *Leishmania*.

Resultados

1. Evaluación de secuencias de mc, pertenecientes a especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.

Una vez realizada la búsqueda de secuencias de mc de *Leishmania* subgénero *Viannia* citadas en la referencia de Fernandes y col. del año 1996, y en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj.nig.ac.jp, se procedió a identificar los bloques CSB1, CSB2 y CSB3, así como la presencia de las regiones diana para los oligos LeishF3 y LeishB3.

Se lograron identificar 42 secuencias de mc de aislados del parásito: 5 para *L. (V) guyanensis*, 1 para *L. (V) peruviana*, 22 para *L. (V) panamensis* y 14 para *L. (V) braziliensis*, resumidas en las tablas 6, 7, 8 y 9 respectivamente.

Fue posible ubicar los tres bloques de la región conservada del mc (CR) (CSB1, CSB2 y CSB3) en todas las secuencias reportadas para las especies *L. (V) guyanensis*, *L. (V) peruviana*, *L. (V) panamensis* (aislado de la cepa 1166 con CSB3 incompleto), y para 12 de 14 secuencias de *L. (V) braziliensis* (aislado U19806 con CSB1 incompleto).

Para la determinación de la presencia de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 se procedió en cada caso a seleccionar la secuencia de mc de 50 pb “río arriba” de CSB1 y al bloque CSB1 (denominada parte A) para el alineamiento con LeishF3 y la secuencia del bloque CSB3 más 50 pb “río abajo” (denominada parte B) para el alineamiento con LeishB3, utilizando el programa DNAMAN for Windows versión: 5.2.2.0. Las tablas 6, 7, 8 y 9 muestran las secuencias analizadas identificando en número de acceso a GeneBank, la especie y cepa o aislado de *Leishmania*, la procedencia geográfica, el tamaño de la secuencia en

pb, la presencia de los tres CSBs, y el % de identidad de los iniciadores LeishF3 y LeishB3.

Observamos que la presencia del iniciador LeishF3 es positiva para todas las secuencias de *L. (V) guyanensis* (% de homología o identidad: 87.5 - 100%) (tabla 6), *L. (V) peruviana* (% de homología: 93.75%) (tabla 7), *L. (V) panamensis* (% de homología: 100%) (tabla 8), y para 4 de las 14 secuencias de *L. (V) braziliensis* (% de homología: 81.25 – 93.75%) (tabla9). Mientras que, la presencia del iniciador LeishB3 es positiva para todas las secuencias de *L. (V) guyanensis* (% de homología o identidad: 44 – 77.78%), *L. (V) peruviana* (% de homología: 55.56%), para 21 de 22 secuencias de *L. (V) panamensis* (% de homología: 44.44 – 94.44%), y para 5 de las 14 secuencias de *L. (V) braziliensis* (% de homología: 50 - 61.11 %).

Las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran las ubicaciones de los sitios de hibridación de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 sobre las secuencias de mc analizadas, cada una de las cuales fueron organizadas en dos partes: una parte A que inicia y comprende desde el CSB1 hasta incluir 50 pb “río arriba” de CSB1, y una parte B que inicia y comprende desde el CSB3 hasta incluir 50 pb “río abajo” de CSB3. Se observa que para cada una de las especies *L. (V) guyanensis*, *L. (V) peruviana*, *L. (V) panamensis*, y *L. (V) braziliensis*; el sitio de hibridación del oligo LeishF3 se encuentra a alrededor de 8 pb “río arriba” de CSB1, mientras que el sitio de hibridación del oligo LeishB3 se encuentra a alrededor de 18 pb “río abajo” de CSB3.

Tabla 6

.Secuencias de mc pertenecientes a aislados de *L. (V) guyanensis*

| <i>L. guyanensis</i> | | | | | | | | | |
|--|--|------------------|-------------|--------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Aislado/Cepa | Cantidad de aislados/cepas | Número de acceso | Procedencia | Tamaño | Descripción | Cadena de ADN analizada | CSBs (CB1,CSB2 y CB3) | LeishF3 (16 nts) Posición: 624 | LeishB3 (18 nts) Posición: 34 |
| MOHM/BR/75/M4147 | 1 | HQ878382 | Brazil | 699 bp | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 10/18; 55,56% |
| MOHM/BR/75/M4147 | 1 | AF130467 | Brazil | 858 bp | Secuencia de ADN de minicírculo | reversa complementaria | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 14/18; 77,78% |
| guyanensis/151M; minicírculo: LBkDNA24 | 1 | X54471 | Brazil* | 216 | Region conservada | reversa complementaria | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 11/18; 61,11% |
| guyanensis/151M; minicírculo: LBkDNA25 | 1 | X54472 | Brazil* | 220 | Region conservada | reversa complementaria | 100% ; 100%; 100% identidad | 14/16; 87.5% | 9/18; 50% |
| guyanensis/151M; minicírculo: LBkDNA22 | 1 | X54470 | Brazil* | 222 | Region conservada | reversa complementaria | 100% ; 100%; 100% identidad | 14/16; 87.5% | 8/18; 44,44 % |
| Total | 5 (2 de la cepa M4147, y 3 de la cepa guyanensis 151M) | | | | | | | | |

Tabla 7.

Secuencias de mc pertenecientes a aislados de *L. (V) peruviana*

| <i>L. peruviana</i> | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Aislado/Cepa | Cantidad de aislados/cepas | Número de acceso | Procedencia | Tamaño (bp) | Descripción | Cadena de ADN analizada | CSBs (CB1, CSB2 y CB3) | LeishF3 (16 nts) Posición: 26 | LeishB3 (18 nts) Posición: 158 |
| MHOM/PE/76/SL5 | 1 | M87317 | Peru | 751 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 15/16; 93.75% | 10/18; 55,56% |
| Total | 1 (de la cepa MHOM/PE/76/SL5) | | | | | | | | |

Tabla 8.

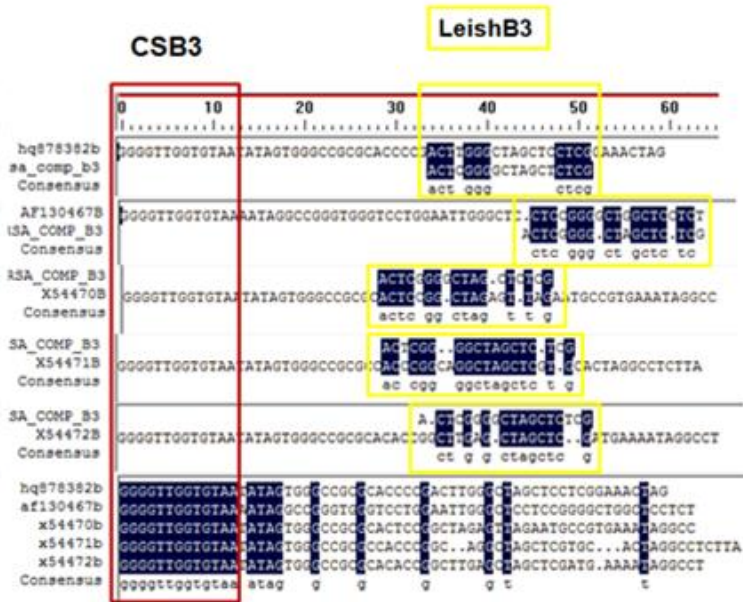
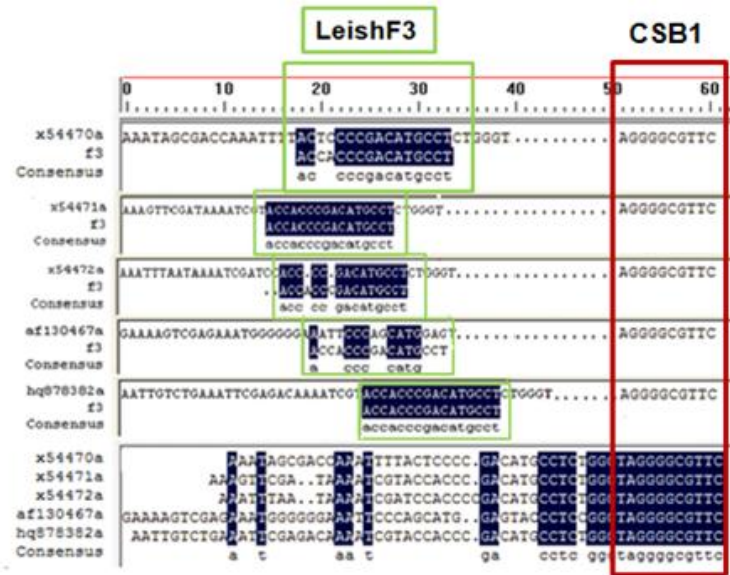
Secuencias de mc pertenecientes a aislados de *L. (V) panamensis*

| L. panamensis | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|------------------|-------------|-------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Aislado/Cepa | Cantidad de aislados/cepas | Número de acceso | Procedencia | Tamaño (bp) | Descripción | Cadena de ADN analizada | CSBs (CB1, CSB2 y CB3) | LeishF3 (16 nts) Posición: 625 | LeishB3 (18 nts) Posición: 16 |
| loc165 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118473 | Panama* | 741 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 11/18; 61,11% |
| loc97 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118471 | Panama* | 750 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 10/18; 55,56% |
| loc158 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118469 | Panama* | 749 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc50 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118467 | Panama* | 750 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 9/18; 50% |
| loc44 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118465 | Panama* | 734 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 12/18; 66,67% |
| loc36 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118463 | Panama* | 751 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc31 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118461 | Panama* | 740 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc29 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118459 | Panama* | 749 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc3 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118457 | Panama* | 739 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc246 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118455 | Panama* | 733 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 12/18; 66,67% |
| loc173 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118474 | Panama* | 750 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 10/18; 55,56% |
| loc148 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118472 | Panama* | 750 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 10/18; 55,56% |
| loc168 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118470 | Panama* | 750 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 11/18; 61,11% |
| loc98 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118468 | Panama* | 733 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 12/18; 66,67% |
| loc48 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118466 | Panama* | 742 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc41 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118464 | Panama* | 740 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 17/18; 94,44 % |
| loc35 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118462 | Panama* | 749 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 15/18; 83,33% |
| loc30 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118460 | Panama* | 732 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 12/18; 66,67% |
| loc28 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118458 | Panama* | 747 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 8/18; 44,44% |
| loc254 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118456 | Panama* | 734 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 12/18; 66,67% |
| loc245 / MHOM/PA/75/M4037 | 1 | AF118454 | Panama* | 739 | Secuencia completa | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 16/16; 100% | 12/18; 66,67% |
| MHOM/CO/86/1166 | 1 | AY366071 | Colombia | 749 | Secuencia completa | sentido y reversa complementaria | 100% ; 100%; 18,75% identidad | 16/16; 100% | ausente |
| Total | 22 (21 de la cepa M4037; 1 de la cepa 1166) | | | | | | | | |

Tabla 9.
Secuencias de mc pertenecientes a aislados de *L. (V) braziliensis*

| <i>L. braziliensis</i> | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|------------------|-------------|-------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Aislado/Cepa | Cantidad de aislados/cepas | Número de acceso | Procedencia | Tamaño (bp) | Descripción | Cadena de ADN analizada | CSBs (CB1, CB2 y CB3) | LeishF3 (16 nts) Posición: 20 | LeishB3 (18 nts) Posición: 150 |
| Lb-PR-81/Lb-PR | 1 | EU370881 | Peru* | 117 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| Lb-PR-82/Lb-PR | 1 | EU370879 | Peru* | 117 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| Lb-PR-80/Lb-PR | 1 | EU370877 | Peru* | 117 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| Lb-PR-82/Lb-PR | 1 | EU370882 | Peru* | 116 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| Lb-PR-80/Lb-PR | 1 | EU370880 | Peru* | 117 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| Lb-PR-61/Lb-PR | 1 | EU370878 | Peru* | 117 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| Lb-PR-59/Lb-PR | 1 | EU370876 | Peru* | 117 | Secuencia parcial | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | ausente | ausente |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19809 | 1 | U19809 | Brazil | 297 | Secuencia parcial, MCLB22 | sentido y reversa complementaria | ausente:ausente; ausente | ausente | ausente |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19807 | 1 | U19807 | Brazil | 749 | Secuencia parcial, MCLB12 | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 14/16; 87,5% | ausente |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19805 | 1 | U19805 | Brazil | 774 | Secuencia parcial, MCLB06 | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 13/16 ; 81,25 % | ausente |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19803 | 1 | U19803 | Brazil | 722 | Secuencia parcial, MCLB01 | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 14/16; 87,5% | ausente |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19808 | 1 | U19808 | Brazil | 347 | Secuencia parcial, MCLB20 | sentido y reversa complementaria | ausente:ausente; ausente | ausente | ausente |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19806 | 1 | U19806 | Brazil | 574 | Secuencia parcial, MCLB10 | sentido | ausente; 100%; 100% | ausente | 6/18; 33,33% |
| MHOM/BR/75/M 2903; locus: LBU19804 | 1 | U19804 | Brazil | 253 | Secuencia parcial, MCLB05 | sentido | 100% ; 100%; 100% identidad | 15/16; 93,75% | ausente |
| Total | 14 (7 de la cepa Lb-PR; 7 de la cepa MHOM/BR/75/M2903) | | | | | | | | |

L. (V) guyanensis

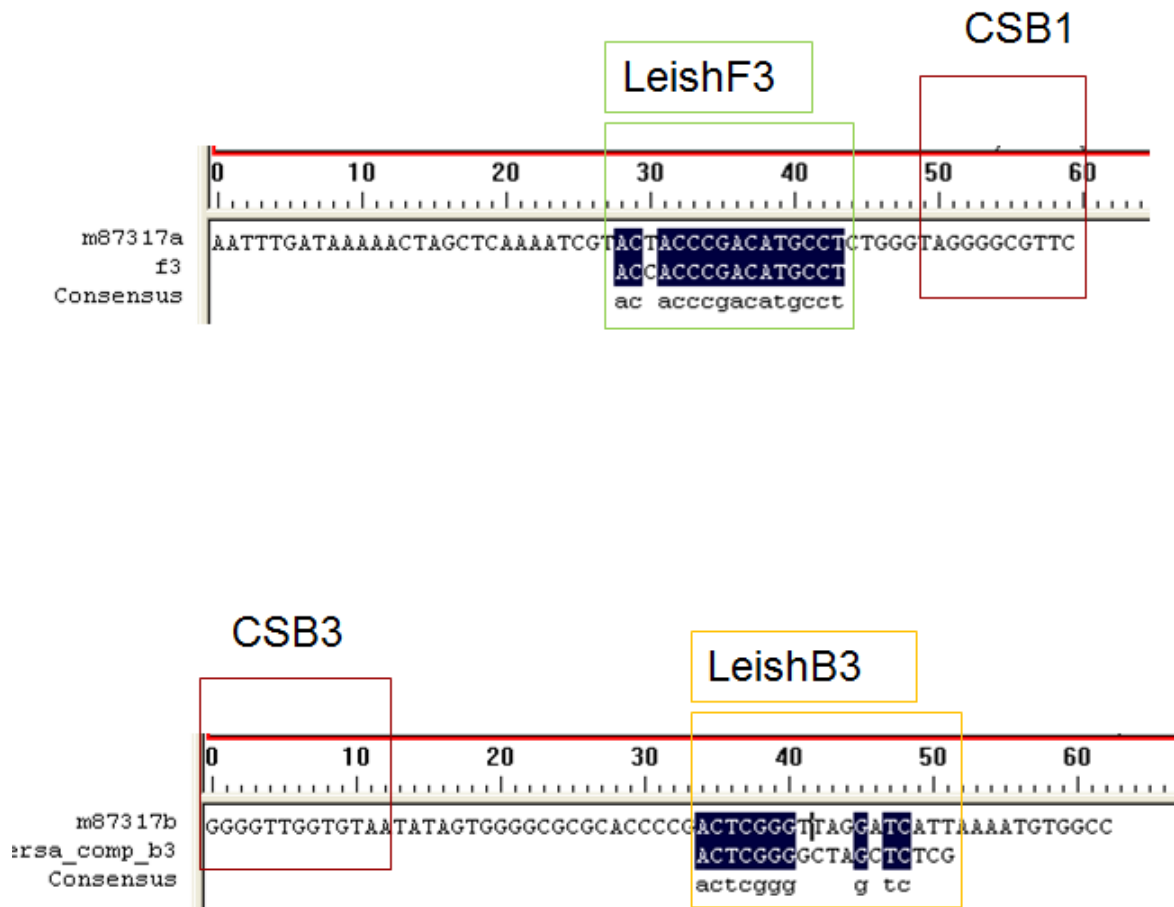


Leyenda:

- → 100% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 90% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 80% de identidad entre los aislados para la especie particular

Figura 8. Alineamiento de las secuencias de mc de *L. (V) guyanensis* reportados en la investigación de Fernandes y col. en el año 1996 y en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj. Las secuencias resaltadas en colores presentan un % de identidad, como se señala en la leyenda. Los cuadros en rojo indican la posición de los tres bloques CBS y en verde/amarillo la ubicación de los oligos LeishsF3/LeishB3.

L. (V) peruviana:

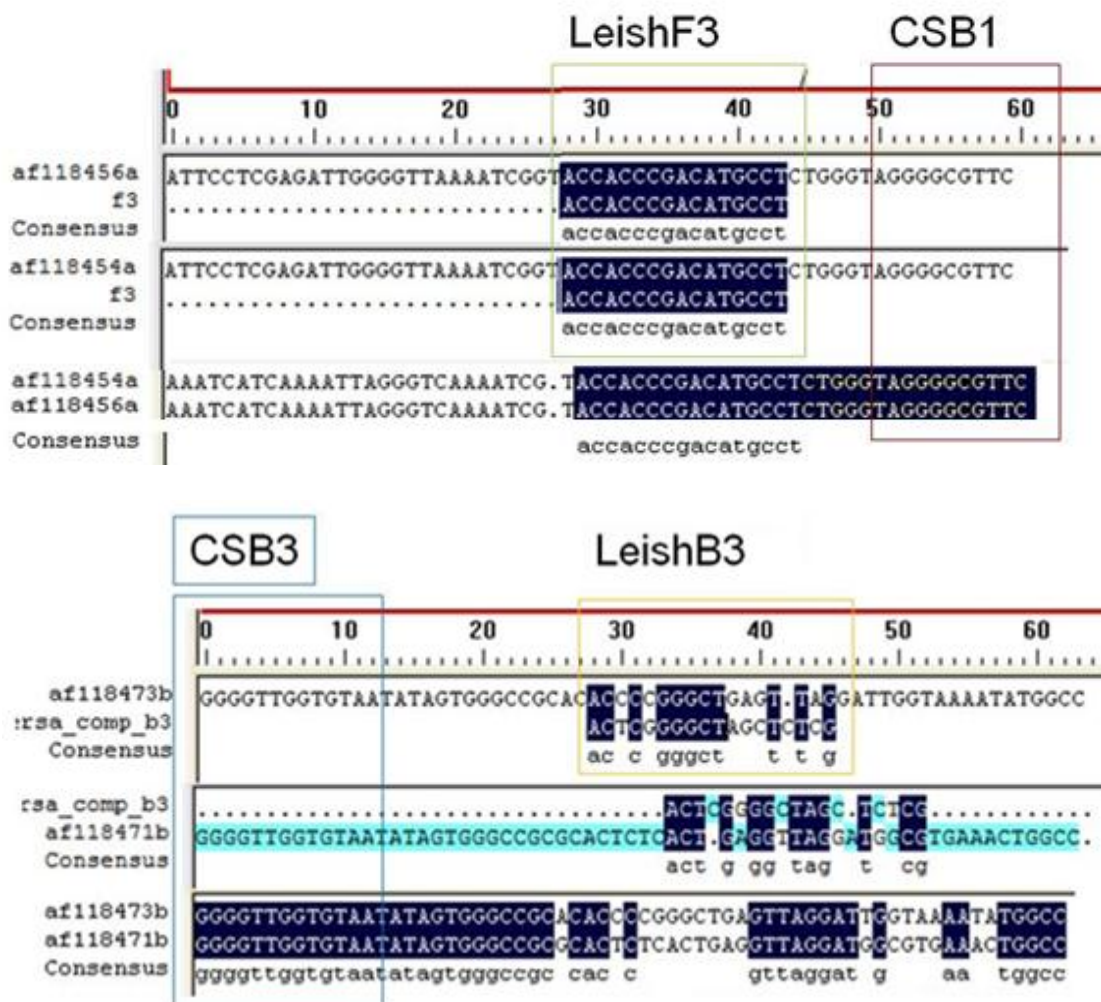


Leyenda:

- → 100% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 90% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 80% de identidad entre los aislados para la especie particular

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de mc de *L. (V) peruviana* reportados en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj. Las secuencias resaltadas en colores presentan un % de identidad, como se señala en la leyenda. Los cuadros en rojo indican la posición de los tres bloques CBS y en verde/amarillo la ubicación de los oligos LeishsF3/LeishB3.

L. (V) panamensis:

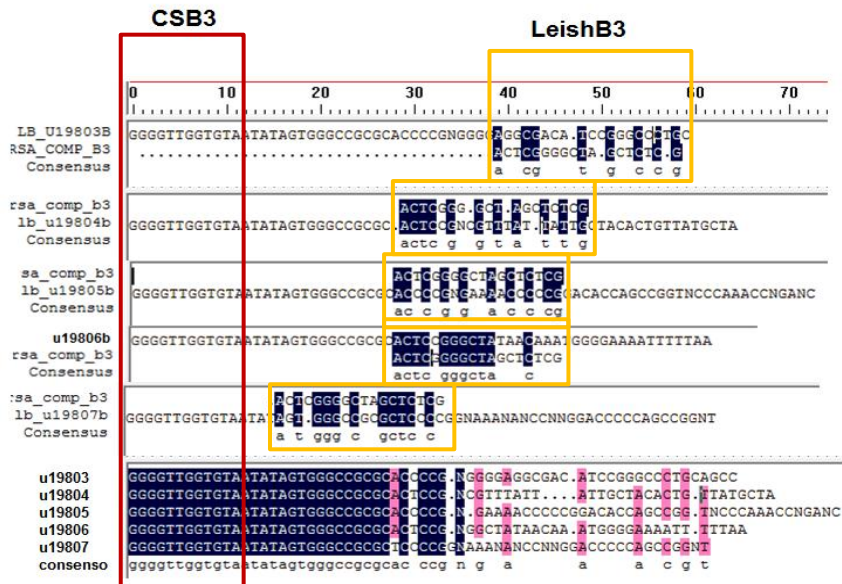
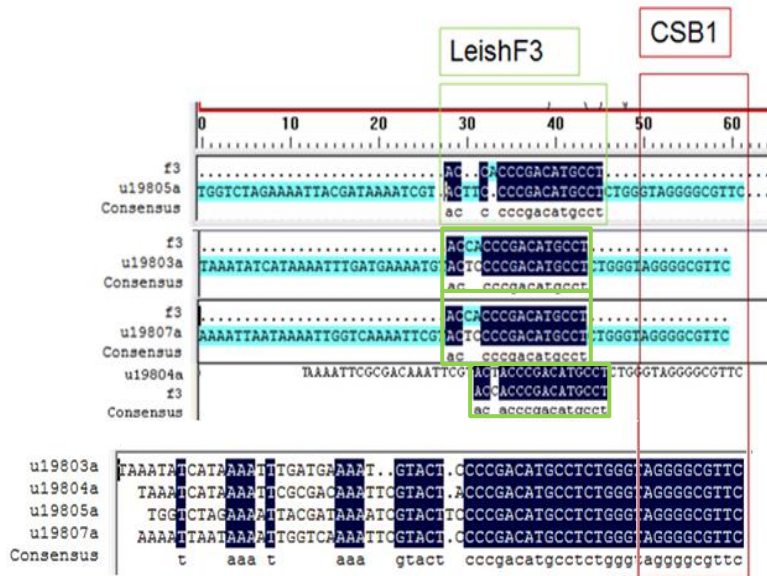


Leyenda:

- → 100% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 90% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 80% de identidad entre los aislados para la especie particular

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de mc de *L. (V) panamensis* reportados en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj. Las secuencias resaltadas en colores presentan un % de identidad, como se señala en la leyenda. Los cuadros en rojo indican la posición de los tres bloques CBS y en verde/amarillo la ubicación de los oligos LeishsF3/LeishB3.

***L. (V) braziliensis*:**



Leyenda:

- → 100% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 90% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 80% de identidad entre los aislados para la especie particular

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de mc de *L. (V) braziliensis* encontradas en las bases de datos de GenBank y Arsa.ddbj, y reportadas por Fernandes y colaboradores en el año 1996. Las secuencias resaltadas en colores presentan un % de identidad, como se señala en la leyenda. Los cuadros en rojo indican la posición de los tres bloques CBS y en verde/amarillo la ubicación de los oligos LeishsF3/LeishB3.

2. Determinación de los sitios de corte por enzimas de restricción en la región del mc amplificada por los iniciadores LeishF3 y LeishB3

La tabla 10 resume los resultados de la identificación de sitios de corte por las enzimas de restricción *Hae III* y *Taq I* en cada una de las secuencias de las 4 especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*. Las figuras 12 y 13 muestran la ubicación de los sitios de corte de *Hae III* y *Taq I* sobre los alineamientos de las secuencias de mc de los diferentes aislados de cepas de las 4 especies de *Leishmania* analizadas.

Puede observarse que existen 2 sitios de corte para la enzima *Hae III* en *L. (V) guyanensis* (con las excepciones de las secuencias HQ878382 y AF130467, que tienen 1 sitio de corte), *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis* (con las excepciones de los aislados AF118458, con 3 sitios; y AY366071, con solo 1 sitio de corte); además de un sitio de corte en *L. (V) peruviana*.

Por otro lado, con respecto a la enzima *Taq I* no hay sitios de corte presentes en *L. (V) peruviana*, *L. (V) guyanensis* (con la excepción del aislado HQ878382, con 1 sitio de corte) y *L. (V) panamensis* (con las excepciones de las secuencias AF118454, AF118457, AF118458, AF118461, AF118463, AF118464, AF118466 y AY366071, que tienen 1 sitio de corte; y aparte el aislado AF118469, que tiene 2 sitios de corte). Mientras que en *L. (V) braziliensis* se encuentra presente un sitio de corte (con las excepciones de las secuencias U19803 y U19804, que no tienen ningún sitio de corte).

Tabla 10.

Análisis de restricción de las regiones del mc de interés.

| | L. (<i>V</i>) guyanensis (5 sec.)(A) | L. (<i>V</i>) peruviiana (1 sec)(B) | L. (<i>V</i>) braziliensis (5 sec.)(C) | L. (<i>V</i>) panamensis (22 sec.)(D) |
|--|--|--|---|--|
| Tamaño del fragmento F3-B3 | HQ2878382: 163 pb. AF130467: 182 pb; X54470: 156 pb; X54471: 161 pb; X54472: 159 pb | 167 pb | U19803, U19804, U19805 y U19807: 151 pb; U19806: 200 pb | Cepa M4037 (AF): 169 pb; cepa 1166 (AY): 119 pb |
| Cantidad de sitios de restricción y tamaños de los fragmentos | 2 sitios; X54470: 93, 40 y 23 pb; X54471: 94, 40 y 27 pb; X54472: 90, 40 y 29 pb | 1 sitio; fragmentos de 98 y 69 pb | 2 sitios; U19803, U19804, U19805 y U19807: 98, 39 y 14 pb | 2 sitios; Cepa M4037 (AF): fragmentos de 97, 41 y 31 pb |
| Posiciones de los sitios de corte | 17 rts "no arriba" de CSB3 (92), y 8 rts "no abajo" de CSB3 (133) en promedio | 17 rts "no arriba" de CSB3 (98) en la secuencia M87317 | 17 rts "no arriba" de CSB3 (98), y 8 rts "no abajo" de CSB3 (137) en promedio | 16 + "N" rts "no arriba" de CSB3 (97), y 8 rts "no abajo" de CSB3 (138) |
| Secuencias excepciones | Las secuencias HQ2878382 y AF130467 tienen 1 sitio: 8 rts "no abajo" de CSB3 (133) y 5 rts "no arriba" de CSB3 (138) respectivamente; resultando en fragmentos de 133 y 30 pb, y de 138 y 44 correspondientes. | Ninguna | La secuencia U19806 tiene los 2 sitios en las posiciones 17 rts "no arriba" de CSB3 (124) y 7 rts "no abajo" de CSB3 (165); resultando en fragmentos de 124, 41 y 35 pb | La secuencia AF118458 tiene 3 sitios: un sitio 8 rts "no abajo" de CSB2, y los 2 sitios generales señalados; resultando en fragmentos de 77, 40, 32 y 20 pb. La secuencia AY366071 tiene solo 1 sitio a 16 + "N" rts "no arriba" de CSB3 (98); resultando en fragmentos de 98 y 21 pb |
| Cantidad de sitios de restricción y tamaños de los fragmentos | No hay en ninguna secuencia | No hay en ninguna secuencia | 1 sitio; U19805: 41 y 110 pb; U19807: 40 y 111 pb | No hay en ninguna secuencia |
| Posiciones de los sitios de corte | No hay en ninguna secuencia | No hay en ninguna secuencia | 9 rts "no abajo" de CSB1 (41) en promedio | No hay en ninguna secuencia |
| Secuencias excepciones | la secuencia HQ2878382 tiene 1 sitio 9 rts "no abajo" de CSB1 (41); resultando en fragmentos de 43 y 120 pb | Ninguna | Las secuencias U19803 y U19804 no tienen sitio de corte. La secuencia U19806 tiene un sitio 1 rt "no abajo" de CSB2 (59); resultando en fragmentos de 59 y 141 pb. | La secuencia AF118454 tiene 1 sitio 17 rts "no abajo" de CSB2 (85); resultando en fragmentos de 85 y 64 pb. Las secuencias AF118457, AF118458, AF118461, AF118463, AF118464, AF118466 y AY366071 tienen 1 sitio 19 rts "no arriba" de CSB2 (40); resultando en fragmentos de 40 y 129 pb (40 y 79 pb para AY366071). La secuencia AF118469 tiene 2 sitios, 19 rts "no arriba" de CSB2 (40) y 19 rts "no abajo" de CSB3 (148); resultando en fragmentos de 40, 108 y 21 pb. |

Leyenda:

- **A.** Número de acceso de secuencias de mc de los aislados seleccionados de *L. (V) guyanensis*: HQ878382, AF130467, X54470, X54471 y X54472.
- **B.** Número de acceso de la secuencia de mc del aislado seleccionado de *L. (V) peruviana*: M87317.
- **C.** Número de acceso de secuencias de mc de los aislados seleccionados de *L. (V) braziliensis*: U19803, U19804, U19805, U19806 y U19807.
- **D.** Número de acceso de secuencias de mc de los aislados seleccionados de *L. (V) panamensis*: AF118454, AF118455, AF118456, AF118457, AF118458, AF118459, AF118460, AF118461, AF118462, AF118463, AF118464, AF118465, AF118466, AF118467, AF118468, AF118469, AF118470, AF118471, AF118472, AF118473, AF118474 y AY366071.

Adicionalmente, en la tabla 11 podemos observar los resultados de la identificación del número y tamaño de los fragmentos ocasionados por la digestión simultánea con ambas enzimas de restricción *Hae* III y *Taq* I, sobre la región entre los sitios de hibridación de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 en las secuencias de las 4 especies analizadas del subgénero *Viannia*. Se observan patrones considerablemente distintos entre estas especies; donde en *L. (V) guyanensis* se producen 3 fragmentos, de 92, 41 y 30 pb; mientras que en *L. (V) braziliensis* se producen 4 fragmentos, de 65-59, 59-40, 41-39 y 35-14 pb; en *L. (V) panamensis* se producen entre 5 y 3 fragmentos, de tamaños considerablemente variables (57-40, 85-40, 58-37; 40-21 y 31-10 pb) y en *L. (V) peruviana* solo existe un sitio de corte para la enzima *Hae* III y ninguno para *Taq* I.

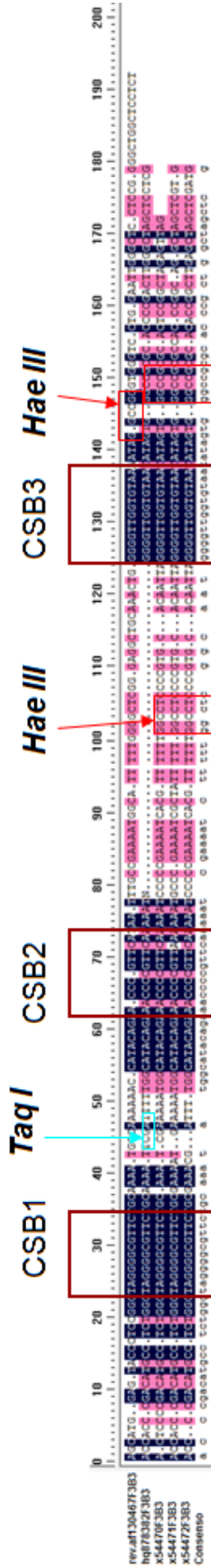
En la figura 12 se representa la distribución de los sitios de restricción de *Hae* III y *Taq* I en las secuencias de mc de diferentes aislados reportados del subgénero *Viannia*, ilustrando el análisis y registro presentado en la tabla 10; facilitando la comparación entre los diferentes aislados para cada una de las especies: *L. (V) guyanensis*, *L. (V) peruviana*, *L. (V) panamensis*, y *L. (V) braziliensis*, permitiéndonos observar en que regiones de las secuencias de mc el % de identidad es mayor entre distintos los aislados, con los CSBs ubicados en regiones de 100% de identidad entre los aislados para las especies particulares; así como poder visualizar y comparar más fácilmente en donde se encuentran los sitios de restricción para las enzimas *Hae* III y *Taq* I en las secuencias de los aislados, inclusive para las secuencias excepciones en la tabla 10.

Tabla 11.

Cantidad y tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión del amplicón del PCR ADNk (LeishF3/LeishB3) empleando simultáneamente las enzimas de restricción *Hae III* y *Taq I*.

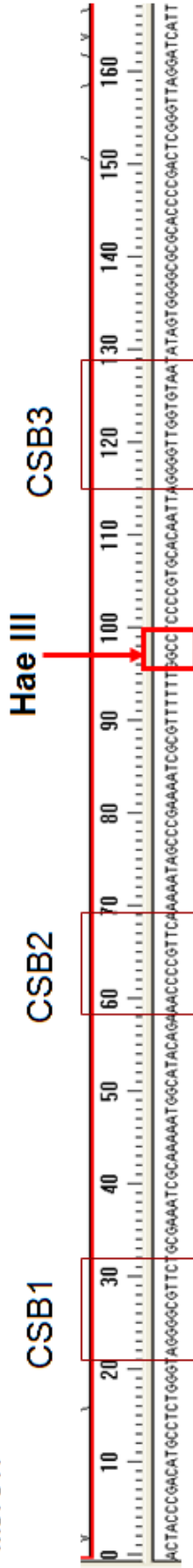
| Especies | Aislado/Cepa | Cantidad y tamaño de los fragmentos por la digestión con <i>Hae III</i> y <i>Taq I</i> |
|---|--|---|
| <i>L. guyanensis</i> (1 aislado) | HQ878382 | (3) 41, 92 y 30 pb |
| <i>L. peruviana</i> (ningún aislado) | La única secuencia disponible perteneciente a esta especie (M87317) no presenta sitio de restricción para la enzima <i>Taq I</i> . | |
| <i>L. brazillensis</i> (3 aislados) | U19805 U19806 U19807 | U19805: (4) 41, 57, 39 y 14 pb; U19806: (4) 57, 65, 41 y 35 pb; U19807: (4) 40, 57, 39 y 14 pb |
| <i>L. panamensis</i> (9 aislados) | AF118454 AF118457 AF118458 AF118461 AF118463 AF118464 AF118466 AF118469 AY366071 | AF118454: (4) 85, 12, 41 y 31; AF118458: (5) 40, 37, 40, 32 y 20; AF118469: (5) 40, 57, 41, 10 y 21; AY366071: (3) 40, 58 y 21; AF118457, AF118461, AF118463, AF118464, AF118466: (4) 40, 57, 41 y 31 |

L. (V.) guyanensis

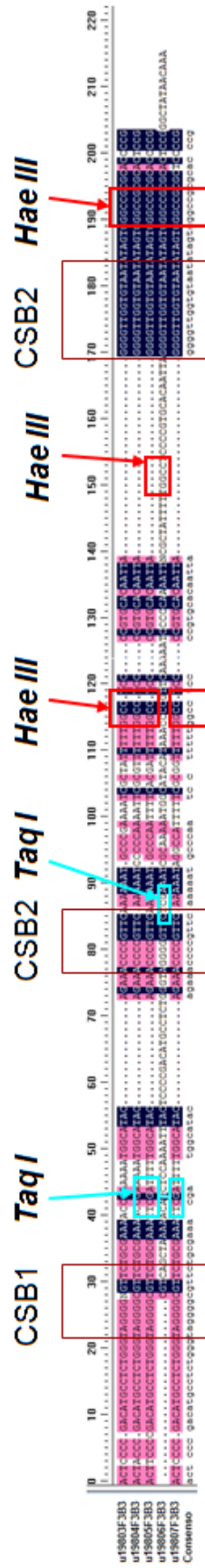


L. (V.) peruviana

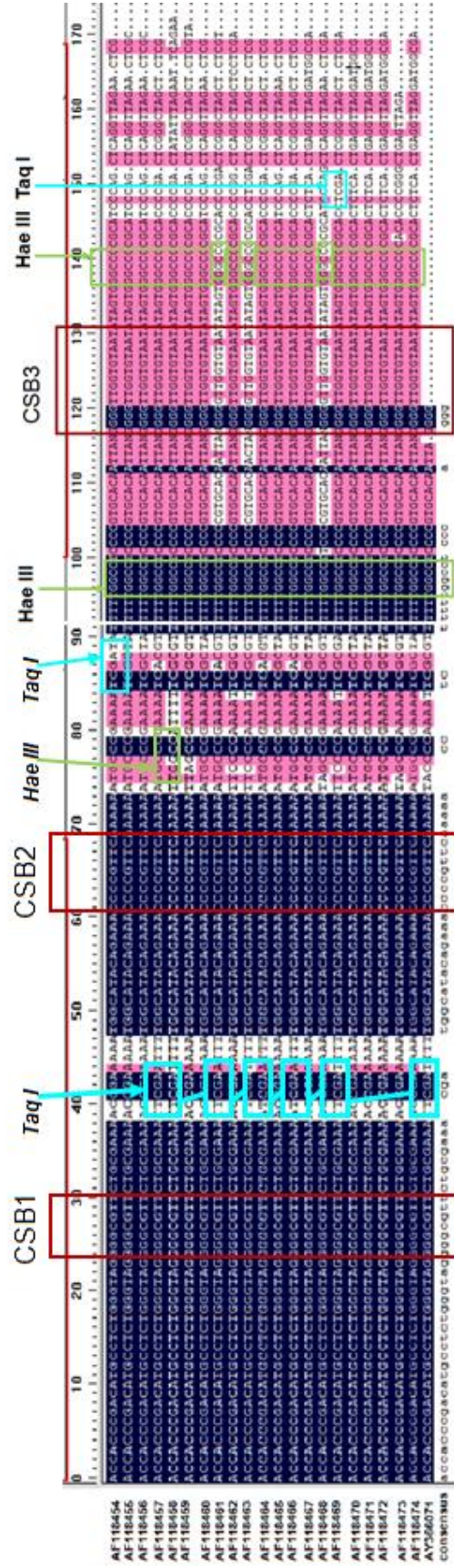
M87317



L. (V.) braziliensis



L. (V.) panamensis



Leyenda:

- → 100% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 90% de identidad entre los aislados para la especie particular
- → 80% de identidad entre los aislados para la especie particular

Figura 12. Ubicación de los sitios de restricción de *Hae III* y *Taq I* en las secuencias de mc de diferentes aislados reportados de *Leishmania* (subgénero *Viannia*).

Adicionalmente, mediante la representación esquemática de la distribución de estos sitios de restricción de *Hae* III y *Taq* I en las secuencias de mc de los diferentes aislados de especies del subgénero *Viannia* (ver figura 13) es posible reconocer, sin considerar las secuencias excepciones, que en general: *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, y *L. (V) braziliensis* presentan 2 sitios de restricción para *Hae* III, *L. (V) peruviana* presenta solo un sitio de restricción de *Hae* III, y solo *L. (V) braziliensis* presenta algún (uno solo) sitio de restricción para *Taq* I. Este esquema, así como la información presente en la tabla 10, nos permiten representar el resultado esperado en electroforesis en geles de agarosa 2%, TBE 0,5X, de la aplicación de la prueba PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 en muestras de especies de *Leishmania* de referencia (ver figura 14); evidenciándose que cada una de las especies *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) braziliensis*, y *L. (V) peruviana* producen un patrón particular de bandas en el gel, sugiriendo la posibilidad del empleo de esta prueba PCR-RFLP ADNk para identificar simultáneamente a estas cuatro especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.



Figura 13. Representación esquemática y simplificada de la distribución de los sitios de restricción de *Hae III* y *Taq I* en las secuencias de mc de diferentes aislados reportados de *Leishmania*, subgénero *Viannia*, sin considerar las excepciones descritas en la tabla 10.

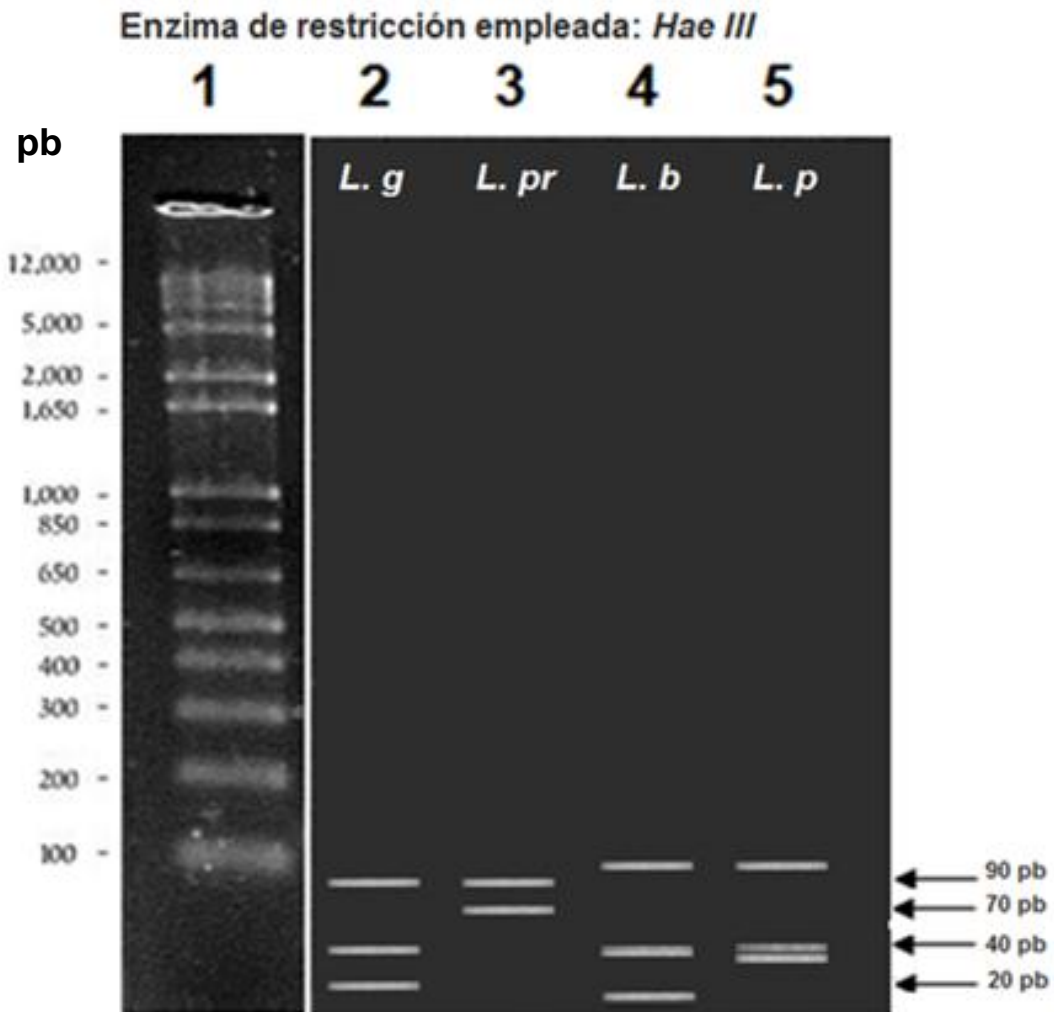


Figura 14. . Resultado esperado de la aplicación de la prueba PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 y la enzima *Hae III* en muestras de *Leishmania* de referencia; basado en la representación esquemática previa y la tabla 10. Se representa la migración esperada en geles de agarosa 2% de los fragmentos generados con las digestiones *Hae III*. L.g: *L (V) guyanensis*; L.pr.: *L. (V) peruviana*; L.b.: *L(V) braziliensis*; L.p.: *L.(V) panamensis*.

3. Ensayo PCR ADNk empleando los iniciadores Hmod1/Hmod2/Hmod3.

En la figura 15 se observa el resultado de la amplificación de la banda de 120 pb correspondiente al producto esperado del PCR ADNk Hmod1/Hmod2/Hmod3 en todos los carriles, confirmándose que las muestras de ADN utilizadas correspondieron a cepas de referencia de especies del género *Leishmania* L. (V) *braziliensis* LTB-300; *L. (V) guyanensis* M4147; *L. (V) panamensis* LS-94; *L. (V) braziliensis* (carriles 2, 3, 4 y 5). Además, se verificó que los reactivos de preparación del PCR no presentasen contaminación (carril 6).

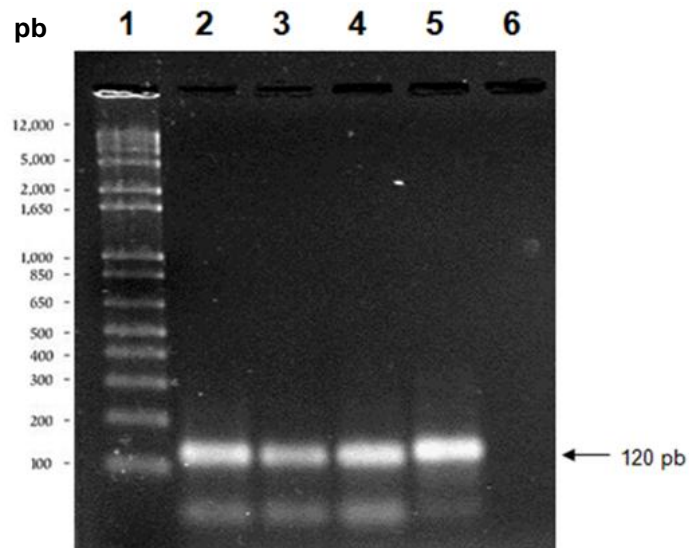


Figura 15. Electroforesis del PCR ADNk con oligonucleótidos Hmod1/Hmod2/Hmod3 para especies del género *Leishmania*. Gel de agarosa 2 % y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2:*L. (V) braziliensis* LTB-300; 3:*L. (V) guyanensis* M4147; 4:*L. (V) panamensis* LS-94; 5: *L. (V) braziliensis* M2903; 6:H₂Obd. La flecha indica el tamaño esperado del amplicón (120 pb)

4. Normalización de las condiciones del ensayo de PCR-ADNk, utilizando los iniciadores LeishF3 y LeishB3, en cuanto a temperatura de hibridación y concentración de oligonucleótidos.

4.1 Normalización de la temperatura de hibridación de los iniciadores

En la figura 16 se observa el resultado de la amplificación de la banda de 169 pb correspondiente al producto esperado del PCR ADNk LeishF3/LeishB3 utilizando 50 °C para la hibridación de los oligonucleótidos en las especies *L. (V) guyanensis* M4147 (carril 4), *L. (V) braziliensis* M2903 (carril 6), y una banda muy claras (poca cantidad de producto) en *L. (V) braziliensis* LTB-300 (carril 3) y *L. (V) panamensis* LS-94 (carril 5). Adicionalmente, se observan bandas debidas a la formación de producto de mayor tamaño en *L. (V) braziliensis* M2903 (carril 6).

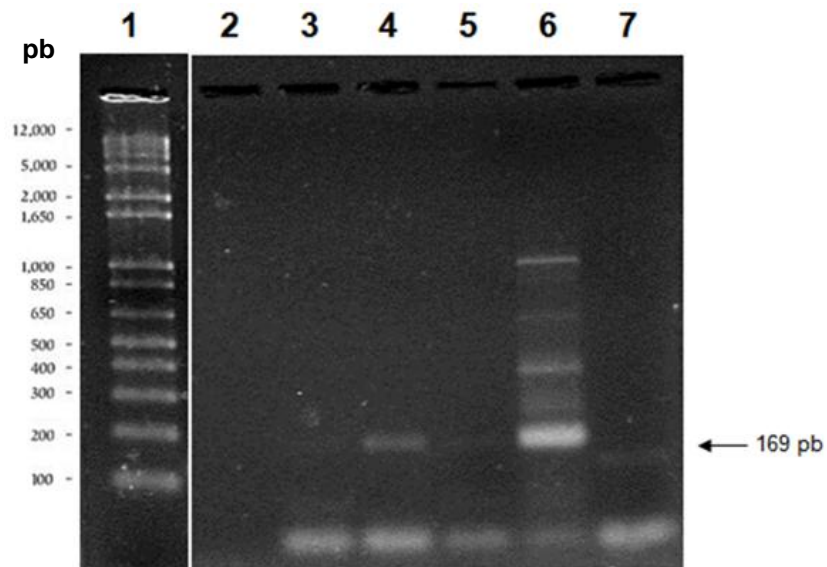


Figura 16. Electroforesis del PCR ADNk con oligonucleótidos externos LeishF3/LeishB3 para especies del subgénero *Viannia*. Gel de agarosa 2 % y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: vacío; 3:*L. (V) braziliensis* LTB-300; 4:*L. (V) guyanensis* M4147; 5: *L. (V) panamensis* LS-94; 6:*L. (V) braziliensis* M2903; 7: H₂O. La flecha indica el tamaño esperado del amplicón (169 pb)

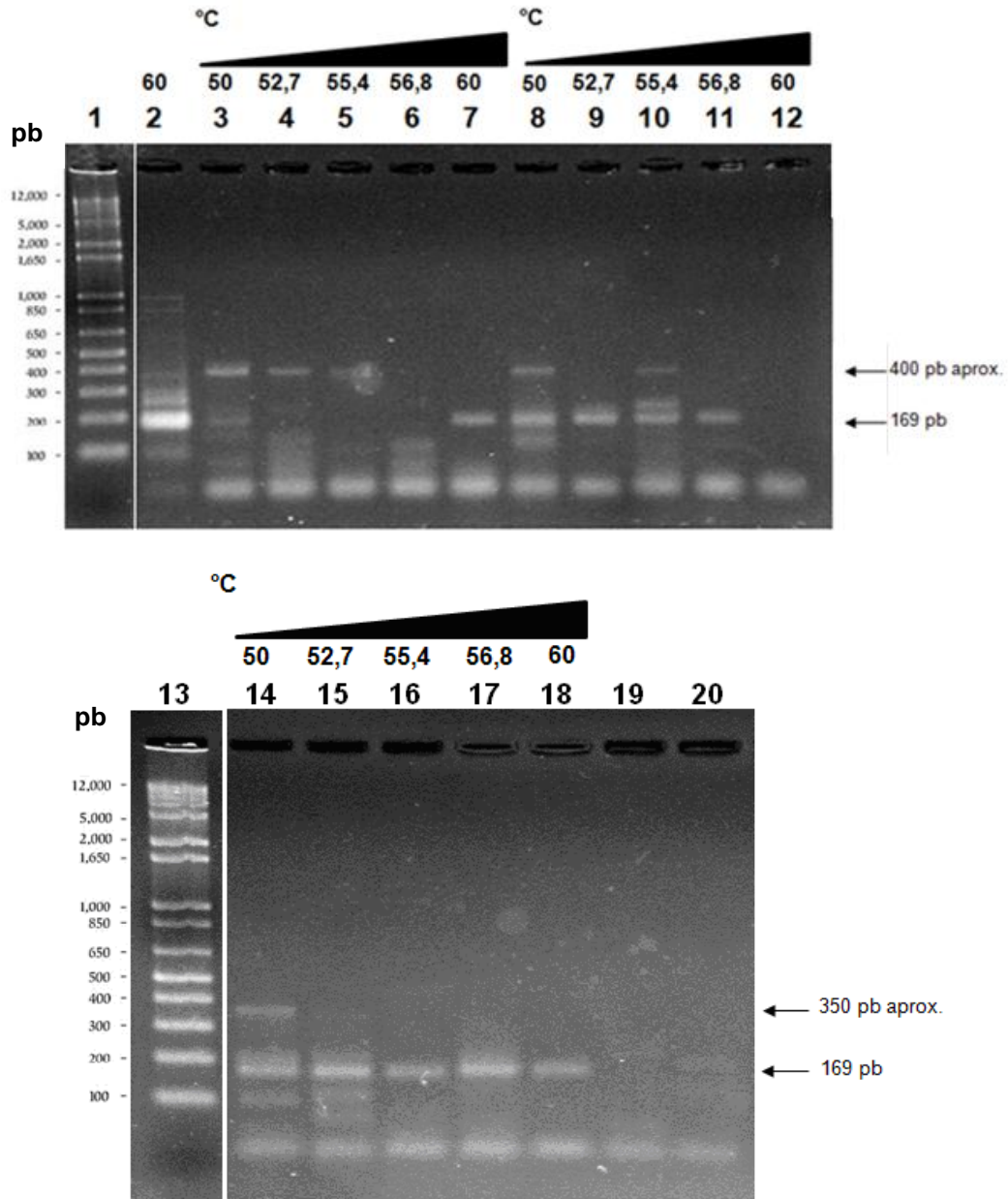


Figura 17. Electroforesis del PCR ADNk con oligonucleótidos externos LeishF3/LeishB3 (subgénero *Viannia*) en gradiente de temperatura. Gel de agarosa 2 % y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: *L. (V) braziliensis* M2903 C+; 3: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (50 °C); 4: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (52.7 °C); 5: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (55.4 °C); 6: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (56.8 °C); 7: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (60 °C); 8: *L. (V) guyanensis* M4147 (50 °C); 9: *L. (V) guyanensis* M4147 (52.7 °C); 10: *L. (V) guyanensis* M4147 (55.4 °C); 11: *L. (V) guyanensis* M4147 (56.8 °C); 12: *L. (V) guyanensis* M4147 (60 °C); 13: MPM 1kb plus; 14: *L. (V) panamensis* LS-94 (50 °C); 15: *L. (V) panamensis* LS-94 (52.7 °C); 16: *L. (V) panamensis* LS-94 (55.4 °C); 17: *L. (V) panamensis* LS-94 (56.8 °C); 18: *L. (V) panamensis* LS-94 (60 °C); 19: H₂Obd C-; 20: H₂Obd C-.

Se procedió a evaluar un gradiente de temperaturas de hibridación de los iniciadores LeishF3 y LeishB3 entre 50 °C y 60 °C con la finalidad de incrementar la especificidad del ensayo. La figura 17 muestra el resultado de la amplificación del ensayo PCR ADNk LeishF3/LeishB3 en gradiente con ADN de tres especies de referencia del subgénero *Viannia*. Se observa la ausencia de producto en los controles negativos indicando la ausencia de contaminantes (carriles 19 y 20). Hubo amplificación de la banda de 169 pb correspondiente al producto esperado del PCR ADNk LeishF3/LeishB3 en *L. (V) braziliensis* LTB-300 a 60 °C (carriles 3 y 7), en *L. (V) guyanensis* M4147 a todas las temperaturas menores de 60 °C (carriles 8, 9, 10 y 11), y en *L. (V) panamensis* LS-94 a todas las temperaturas probadas (carriles 14, 15, 16, 17 y 18). Adicionalmente, se observaron bandas de mayor tamaño debidas a la formación de producto de 350 aproximadamente en *L. (V) braziliensis* M2903 (carril 2), *L. (V) braziliensis* LTB-300 (carriles 3, 4 y 5), *L. (V) guyanensis* M4147 (carriles 8 y 10), y en *L. (V) panamensis* LS-94 (carril 14).

Este ensayo fue repetido evaluando solo dos temperaturas de hibridación: 56 °C y 60 °C con las tres especies de *Leishmania*. En la figura 18 se observa la ausencia de contaminación (carril 10) y hubo amplificación de la banda de 169 pb correspondiente al producto esperado en: *L. (V) braziliensis* M2903 C+ a 56 °C (carril 3), *L. (V) braziliensis* LTB-300 a 60 °C (carril 5) y *L. (V) guyanensis* M4147 a 56 °C (carril 6). Adicionalmente, se observan bandas debidas a la formación de producto de mayor tamaño (350 pb aprox.) en *L. (V) guyanensis* M4147 a 56 °C

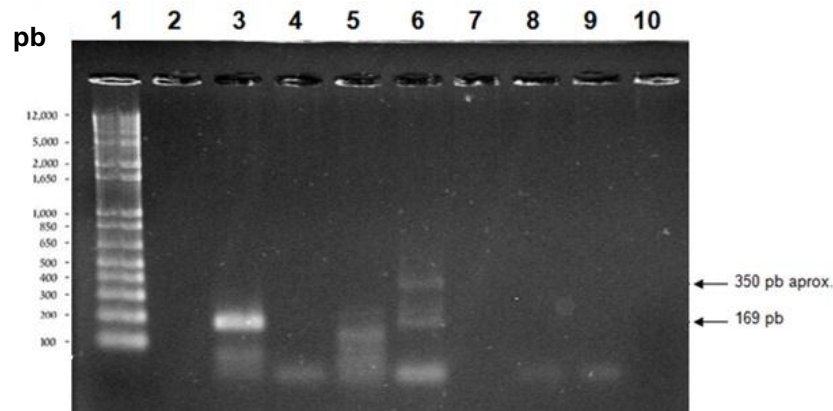


Figura 18. Electroforesis del PCR ADNk con oligos externos LeishF3/LeishB3 (subgénero *Viannia*) en gradiente de temperatura. Gel de agarosa 2 % y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: vacío; 3: *L. (V) braziliensis* M2903 C+; 4:*L. (V) braziliensis* LTB-300 (56 °C); 5: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (60 °C); 6:*L. (V) guyanensis* M4147 (56 °C); 7: *L. (V) guyanensis* M4147 (60 °C); 8: *L. (V) panamensis* LS-94 (56 °C); 9: *L. (V) panamensis* LS-94 (60 °C); 10: H₂Obd.

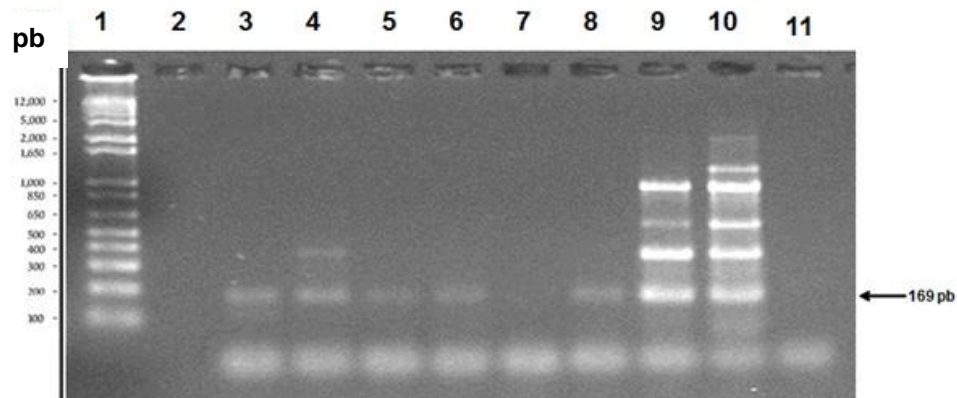


Figura 19. Electroforesis del PCR ADNk con oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*). Amplificación en Termociclador MJ research PTC-200; empleando una concentración de los oligonucleótidos de 2 μM, y dos temperaturas de hibridación (Th) para estos iniciadores (55 y 50 °C). Gel de agarosa 2%, electroforesis a 50V por 60 min y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: vacío; 3: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (55 °C); 4: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (50 °C); 5: *L. (V) guyanensis* M4147 (55 °C); 6: *L. (V) guyanensis* M4147 (50 °C); 7: *L. (V) panamensis* LS-94 (55 °C); 8: *L. (V) panamensis* LS-94 (50 °C); 9: *L. (V) braziliensis* M2903 (55 °C); 10: *L. (V) braziliensis* M2903 (50 °C); 11: H₂O C.B.

La ausencia de amplificación a 60 °C en todas las especies de *Leishmania* fue utilizado como criterio para evaluar el ensayo a 50 °C y a 55 °C de temperatura de hibridación. La figura 19 muestra los resultados. Se puede evidenciar la formación del producto esperado de 169 pb para todas las especies excepto para *L. (V) panamensis* LS-94, que no amplificó a 55 °C (carril 7). Además, se observa la formación de productos de mayor tamaño en las muestras de *L. (V) braziliensis* LTB-300 (55 °C) (carril 3), y para ambas de *L. (V) braziliensis* M2903 (carriles 9 y 10)

5. Análisis de la especificidad del PCR ADNk utilizando los oligos LeishF3 y LeishB3.

La especificidad del PCR ADNk LeishF3/ LeishB3 fue evaluada con especies del subgénero *Leishmania* a 50 °C. La figura 20 muestra los resultados. Se puede observar la formación del producto esperado de 169 pb solo para las especies *L. (V) braziliensis* M2903 y *L. (V) panamensis* 1169 (carriles 3 y 9). Además, Se observan bandas inespecíficas de mayor tamaño para *L. (L) mexicana* BEL21 (carril 6) y *L. (L) chagasi* PP65 (carril 8).

6. Desarrollo del ensayo PCR – RFLP ADNk con oligos LeishF3/ LeishB3.

Previo al análisis PCR-RFLP con los oligos LeishF3/ LeishB3 se utilizó la prueba PCR-RFLP ADNk descrita por Volpini y colaboradores en el 2003 con los oligos Hmod1/Hmod2/Hmod3. La figura 21 muestra el resultado de la amplificación evaluada en geles de poliacrilamida al 8%, 0,5X TBE y las digestiones con *Hae* III

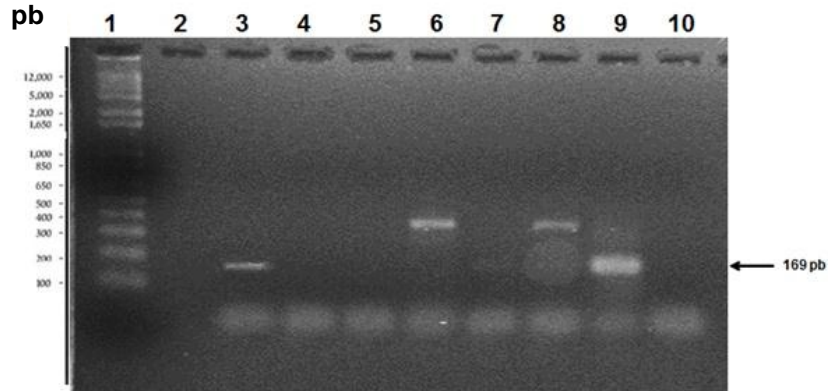


Figura 20. Electroforesis del PCR ADNk con oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*) confirmando la especificidad de la prueba. Amplificación en Termociclador MJ research PTC-200. Gel de agarosa 2%, electroforesis a 50V por 57 min y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: vacío; 3: *L. (V) braziliensis* M2903; 4: *L. (V) guyanensis* M4147; 5: *L. (V) panamensis* LS-94; 6: *L. (L) mexicana* BEL21; 7: *L. (L) donovani* DD8; 8: *L. (L) chagasi* PP65; 9: *L. (V) panamensis* 1169; 10: H₂O C.B.

En la figura 21 se puede observar el producto esperado de 120 pb para todas las muestras de *Leishmania* (carriles 1 al 4). La digestión del amplicón de *L. (V) braziliensis* M2903 generó el patrón esperado de bandas de 80 y 40 pb (carril 8), *L. (V) guyanensis* M4147 generó bandas de 100 y 20 pb (carril 6), mientras que, *L. (V) panamensis* LS-94 no digirió con la enzima *Hae* III ni tampoco lo hizo *L. (V) braziliensis* LTB-300 (carriles 5 y 7).

Una vez establecidas las condiciones de digestión con la enzima *Hae* III y corrida electroforética, así como observados los patrones con el PCR-RFLP ADNk descrito por Volpini y col 2003, se procedió al análisis PCR-ERFL con los oligos LeishB3/LeishF3. En la figura 22 se logran observar las bandas correspondientes al producto de amplificación sin digerir esperado de 169 pb para todas estas muestras del subgénero *Viannia* (carriles 1 al 4), así como también productos de mayor tamaño para *L. (V) b* LTB-300 (carril 1) y para *L. (V) b* M2903 (carril 4).

Adicionalmente, se observa la digestión del producto de PCR en fragmentos menores a 100 pb para todas las digestiones de las muestras realizadas.

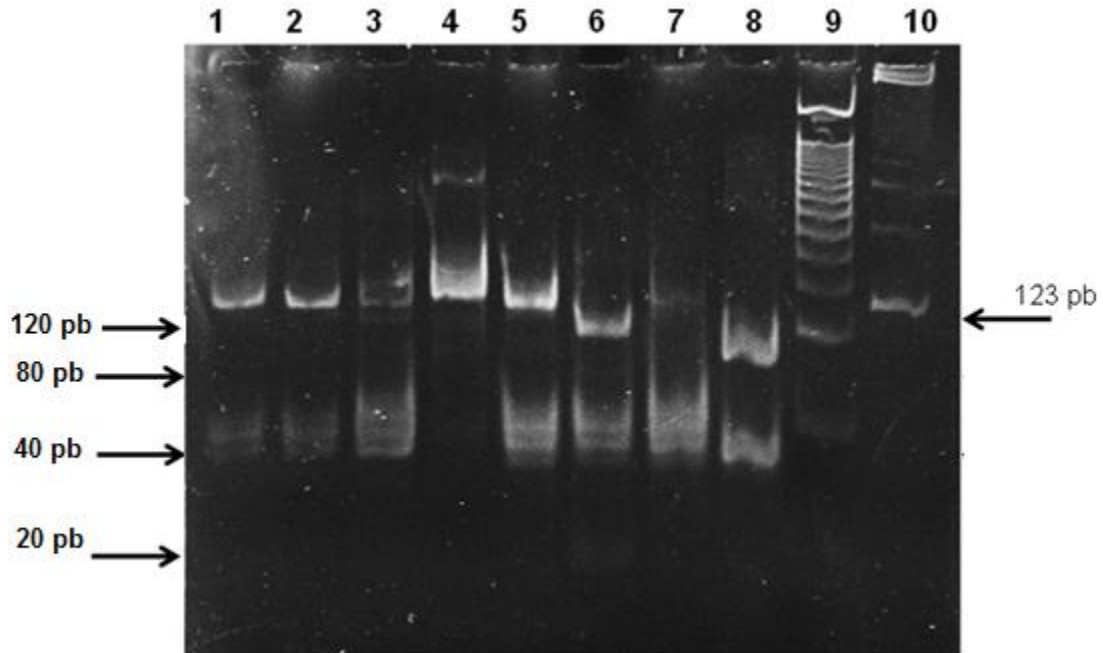


Figura 21. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos Hmod1/Hmod2/Hmod3 (género *Leishmania*) y su digestión. Estos productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae* III por reacción, a 37 °C por 4 horas. Electroforesis realizada a 100V por 45 min. Gel de poliacrilamida 8% y tinción con bromuro de etidio. 1: *L. (V) braziliensis* LTB-300; 2: *L. (V) guyanensis* M4147; 3: *L. (V) panamensis* LS-94; 4: *L. (V) braziliensis* M2903 (C+); 5: Digestión *L. (V) braziliensis* LTB-300; 6: Digestión *L. (V) guyanensis* M4147; 7: Digestión (*L. (V) panamensis* LS-94); 8: Digestión (*V) braziliensis* M2903; 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

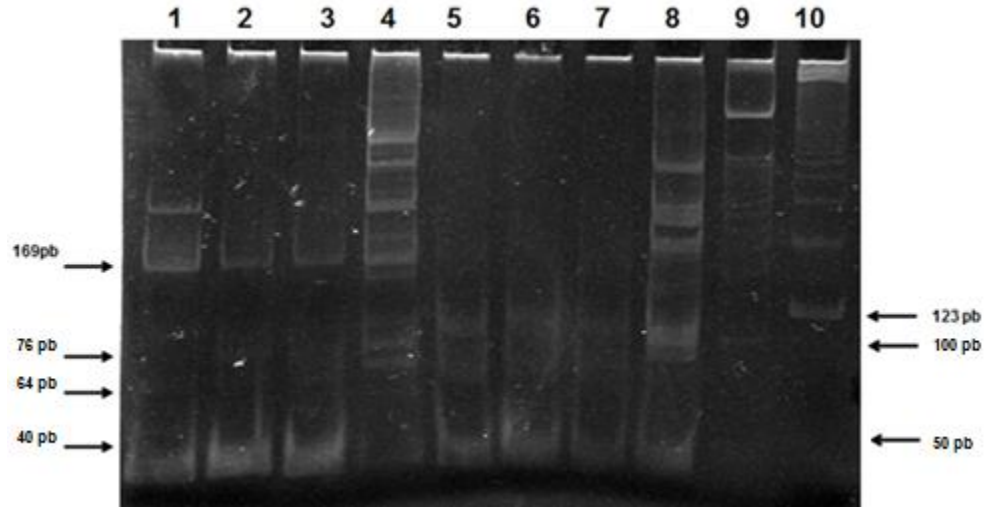


Figura 22. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*) y su digestión con la enzima *Hae* III. Los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae* III por reacción, a 37 °C por 4 horas. Electroforesis realizada a 100V por 42 min. Gel de poliacrilamida 8% y tinción con bromuro de etidio. 1: *L. (V) braziliensis* LTB-300 (55 °C); 2: *L. (V) guyanensis* M4147 (55 °C); 3: *L. (V) panamensis* LS-94 (55 °C); 4: *L. (V) braziliensis* M2903 (50 °C); 5: Digestión (*L. b* LTB-300); 6: Digestión (*L. g* M4147); 7: Digestión (*L. p* LS-94); 8: Digestión (*L. b* M2903); 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

La estimación de los tamaños de los fragmentos generados en pb confirma que el amplicón de las muestras del subgénero *Viannia* tiene el tamaño esperado de 169 pb. Además. La digestión de estos productos con *Hae* III produjo los siguientes patrones de bandas en el gel por especie: *L. (V) braziliensis* LTB-300 y *L. (V) panamensis* LS-94 generaron bandas de 64 y 36 pb, *L. (V) guyanensis* M4147 generó bandas de 76, 64 y 36 pb, mientras que *L. (V) braziliensis* M2903 generó bandas de 64, 50 y 40 pb aproximadamente.

El ensayo PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3/ LeishB3 se extendió a especies del subgénero *Leishmania*. La figura 23 muestra los resultados.

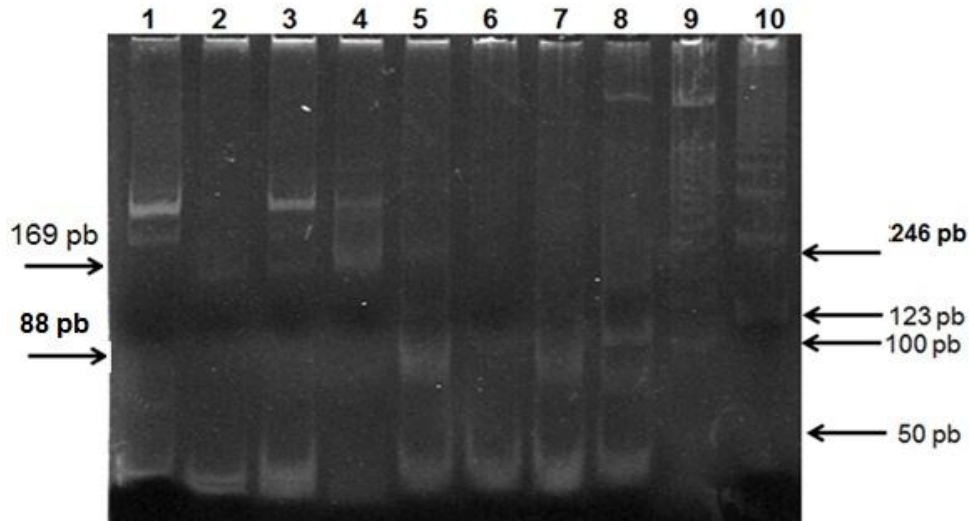


Figura 23. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*) y su digestión con *Hae* III. Los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae* III por reacción, a 37 °C por 4 horas. Electroforesis realizada a 100V por 45 min. Gel de poliacrilamida 8% y tinción con bromuro de etidio. 1: *L. (L) mexicana* BEL21; 2: *L. (L) donovani* DD8; 3: *L. (L) chagasi* PP75; 4: *L. (V) panamensis* 1169; 5: Digestión (*L. m. BEL21*); 6: Digestión (*L. d. DD8*); 7: Digestión (*L. ch. PP75*); 8: Digestión (*L. p 1169*); 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

En la figura 23 se logran observar las bandas correspondientes al producto esperado de 169 pb aprox. solo para *L. (V) panamensis* 1169 (carril 4) y se observan productos de mayor tamaño para *L. (L) mexicana* (carril 1), *L. (L) chagasi* (carril 3). Así mismo, La estimación de los tamaños de los fragmentos generados en la digestión *Hae* III en pb muestra que: *L. (L) mexicana* BEL21 generó fragmentos de 88 y 70 pb (carril5) , *L. (L) donovani* DD8 produjo una sola banda de 88 pb (carril 6), *L. (L) chagasi* PP65 generó fragmentos de 84 pb y 66 pb (carril 7), y *L. (V) panamensis* 1169 generó una banda de 98 pb (carril 8).

Considerando estos patrones en la prueba PCR-RFLP ADNk utilizando los oligonucleótidos LeishF3/ LeishB3, se procedió con el análisis de muestras de pacientes diagnosticados con LC de una zona endémica en el estado Cojedes.

7. Análisis de muestras de pacientes diagnosticados con LC de una zona endémica en la localidad de Macapo, estado Cojedes.

Empleándose el flujograma de pruebas moleculares propuesto y representado en la figura 32, se procedió a realizar el análisis de siete muestras clínicas: inicialmente se realizó el análisis con una muestra, y luego se incorporaron seis muestras de los pacientes.

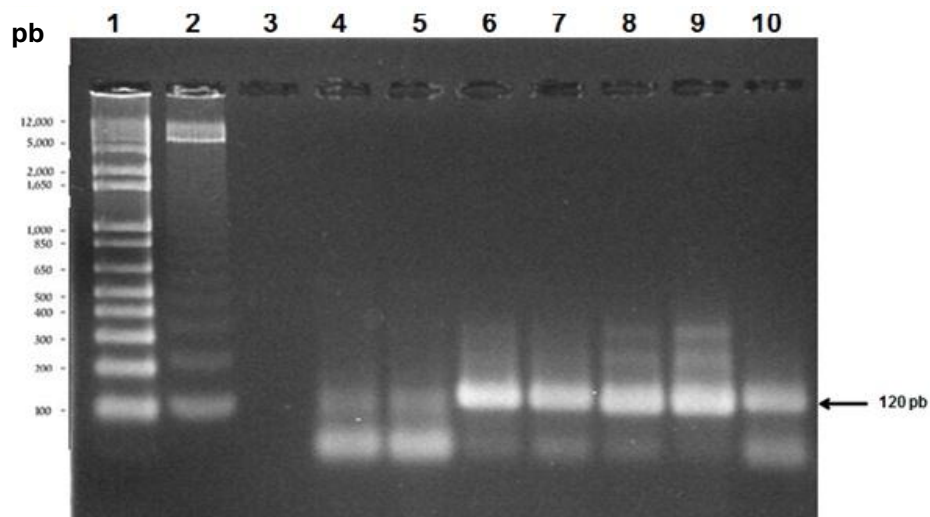


Figura 24. Electroforesis del PCR ADNk con los oligos Hmod 1-3 (género *Leishmania*) para analizar una muestra clínica (ADN extraído del hisopado de la paciente Y. S.). Amplificación en Termociclador MJ research PTC-200. Gel de agarosa 2%, electroforesis a 50V por 60 min y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: MPM 123 pb; 3: vacío; 4: H₂O C.G.; 5: H₂O C.B; 6: *L. (V) panamensis* 1169; 7: *L. (V) braziliensis* M2903; 8: *L. (L) chagasi* PP65; 9: *L. (L) mexicana* BEL21; 10: ADN Y. S.

La figura 24 muestra el resultado del análisis de la primera muestra de tejido de lesión LC. Se puede observar el producto esperado de 120 pb para todas las muestras tanto en las cepas de especies de referencia del subgénero *Viannia* (carriles 6 a la 9), así como para la muestra clínica del paciente Y.S (carril 10). Sin embargo detectamos producto de 120 pb en los controles negativos de agua (carriles 4 y 5).

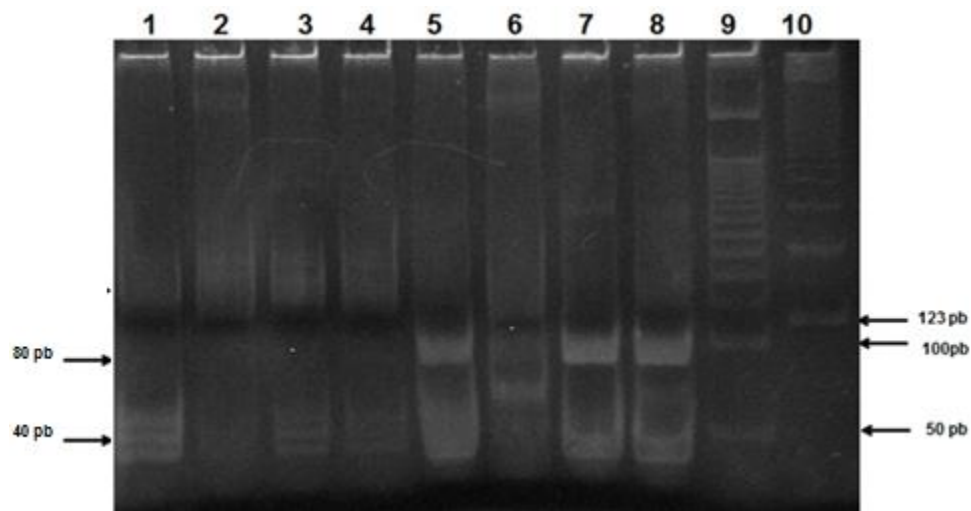


Figura 25. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos Hmod 1-3 (género *Leishmania*) y su digestión, para analizar una muestra clínica (ADN extraído del hisopado de Y. S.). Los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae* III por reacción, a 37 °C por 4 horas. Gel de poliacrilamida 8%, electroforesis realizada a 100V por 50 min y tinción con bromuro de etidio. 1: muestra de Y. S.; 2: *L. (L) mexicana* BEL21; 3: *L. (V) braziliensis* M2903; 4: *L. (V) panamensis* 1169; 5: Digestión (Y. S.); 6: Digestión (*L. m* BEL21); 7: Digestión (*L. b* M2903); 8: Digestión (*L. p* 1169); 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

Aun considerando la presencia de ADNk en los controles negativos del primer ensayo con muestra de pacientes, se procedió a avanzar en la normalización de las condiciones de la digestión del con la enzima *Hae* III utilizando los productos obtenidos en las muestras de la figura 25.

La figura 25 se observan las bandas de 80 pb y 40 pb esperadas de la digestión *Hae* III del fragmento de 120 pb para las muestras de *L. (V) braziliensis* M2903 (carril 7). Igual patrón se obtuvo para *L. (V) panamensis* 1169 (carril 8), así como la muestra de ADN de paciente Y. S. (carril 5). En la cepa de referencia de *L. (L) mexicana* BEL21 (carril 6) se obtuvo un fragmento de 70 pb.

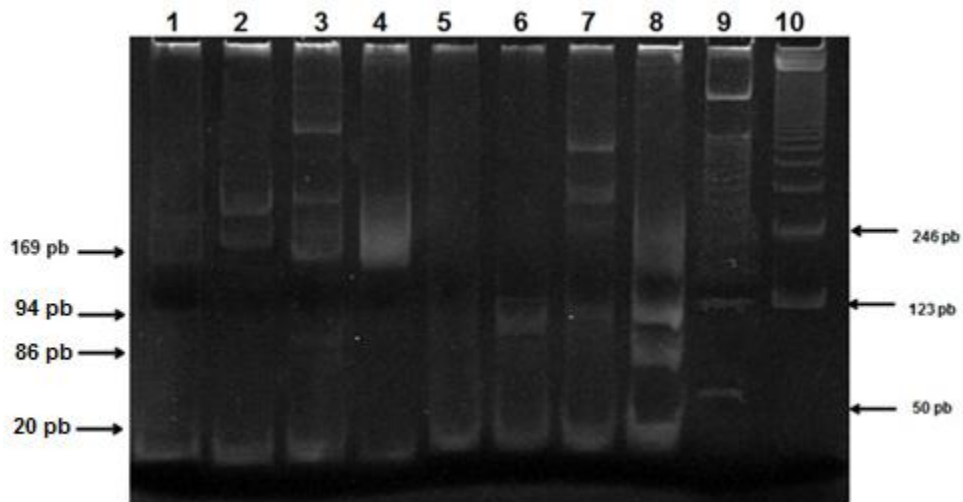


Figura 26. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*) y su digestión, para analizar una muestra clínica (ADN extraído del hisopado de Y. S. Los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae III* por reacción, a 37 °C por 4 horas. Gel de poliacrilamida 8%. Electroforesis realizada a 100V por 45 min y tinción con bromuro de etidio. 1: muestra de Y. S.; 2: *L. (L) mexicana* BEL21; 3: *L. (V) braziliensis* M2903; 4: *L. (V) panamensis* 1169; 5: Digestión (Y. S.); 6: Digestión (*L. m* BEL21); 7: Digestión (*L. b* M2903); 8: Digestión (*L. p* 1169); 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

Proseguimos con la aplicación del ensayo PCR-RFLP ADNk oligonucleótidos LeishF3/LeishB3. La figura 26 muestra los resultados, donde se observan las bandas correspondientes al producto esperado de alrededor de 169 pb para todas las muestras de *Leishmania* subgénero *Viannia* (carriles 3 y 4) y la muestra del paciente Y. S. La muestra de *L.(L) mexicana* BEL 21 (carril 2) generó un fragmento mayor a 200 pb y una banda de 385 pb.. Las digestiones *Hae* III de

estos productos (carriles 5 al 8) generaron los siguientes patrones: *L. (V) braziliensis* M2903 (carril generó dos bandas de 94 pb, y 20 pb; *L. (V) panamensis* 1169 (carril 8) generó tres fragmentos de 86 pb, 76 pb y 20 pb, que pudiese ser interpretado como una digestión parcial; *L. (L) mexicana* BEL 21 (carril 6) mostró bandas de 86 pb y 20 pb. La muestra de Y. S. (carril 5) no generó un patrón específico, posiblemente fue degradada inespecíficamente al agregar el tampón de la enzima con MgCl₂.

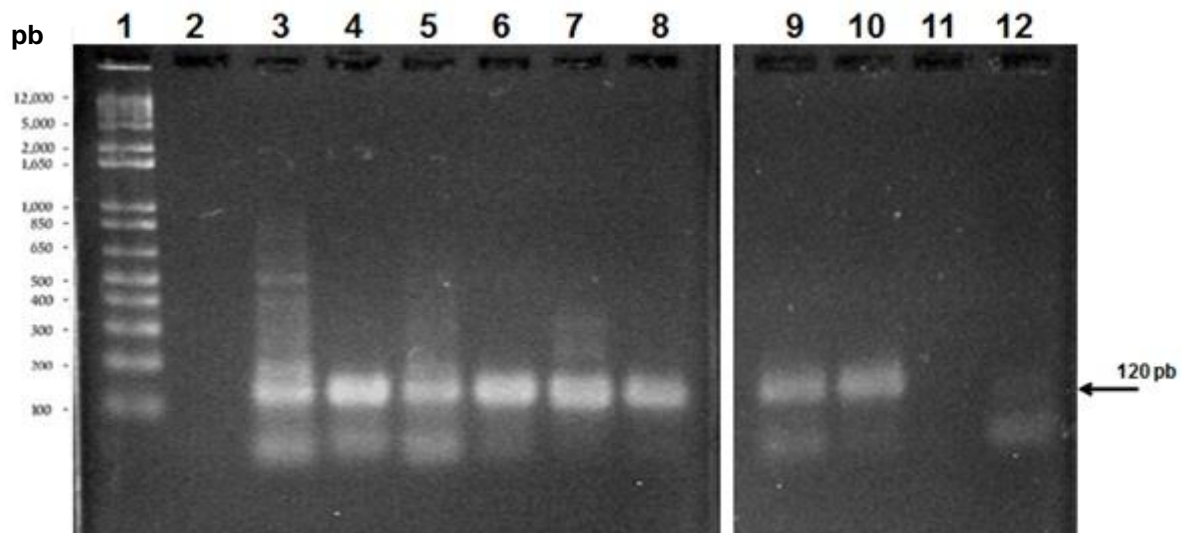


Figura 27. Electroforesis del PCR ADNk con los oligos Hmod 1-3 (género *Leishmania*) para analizar seis muestras clínicas. Amplificación en Termociclador MJ research PTC-200. Gel de agarosa 2%. Electroforesis a 50V por 60 min y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: vacío; 3: ADN R. P.; 4: ADN M. E.; 5: ADN A. S.; 6: ADN M. P.; 7: *L. (L) mexicana* BEL21; 8: *L. (V) panamensis* 1169; 9: ADN D. C.; 10: ADN O. S.; 11: H₂O C.B; 12: H₂O C.G.

Continuamos el análisis de las seis muestras de ADN extraído de tejido de hisopado de pacientes, siguiendo el mismo protocolo, primero PCR ADNk Hmod1-3 género *Leishmania* con el PCR-RFLP ADNk (volpini y col., y luego en

PCR-RFLP ADNk LeishF3/LeishB3 para subgénero *Leishmania*. La figura 27 muestra el resultado del PCR ADNk Hmod1-3 sobre las muestras de paciente (carriles 3 al 7 y carril 9) . Se puede observar el producto esperado de 120 pb para todas las muestras de cepas de referencia del género *Leishmania*: *L.(L) mexicana BEL 21* (carril 7) y *L.(V) panamensis 1169* (carril 8), así como en todas las muestras de pacientes. Sin embargo se detectó la presencia de ADN contaminantes uno de los controles negativos utilizado para realizar el PCR (carril 12). Estas mismas muestras fueron corridas en geles de acrilamida 8% sin digerir (figura 28 A) y digeridas con la enzima *Hae III* (figura 28 B). En todas las muestras controles positivos (figura 28A, carriles 7 y 8) y pacientes (figura 28A , carriles 2 al 6) se puede observar la presencia del producto esperado de 120, con la excepción de la muestra clínica R. P. (figura 28A, carril 1).

Las digestiones *Hae III* de los amplicones de 120 pb generaron fragmentos descritos de la siguiente manera: Los controles de *L. (V) panamensis 1169* produjo fragmentos de 80 pb y 40 pb y en *L. (L) mexicana BEL21* no se observó fragmento alguno (figura28 A, carril 7), Las muestras de pacientes M. E., A. S., M. P y D. C. y O.S. generaron fragmentos de 80 pb y 40 pb (figura28 A, carriles 2, 3, 4, 5 y 6) acordes con infección por *L. braziliensis*; la muestra de R. P. fue observada (figura28 A, carril 1).

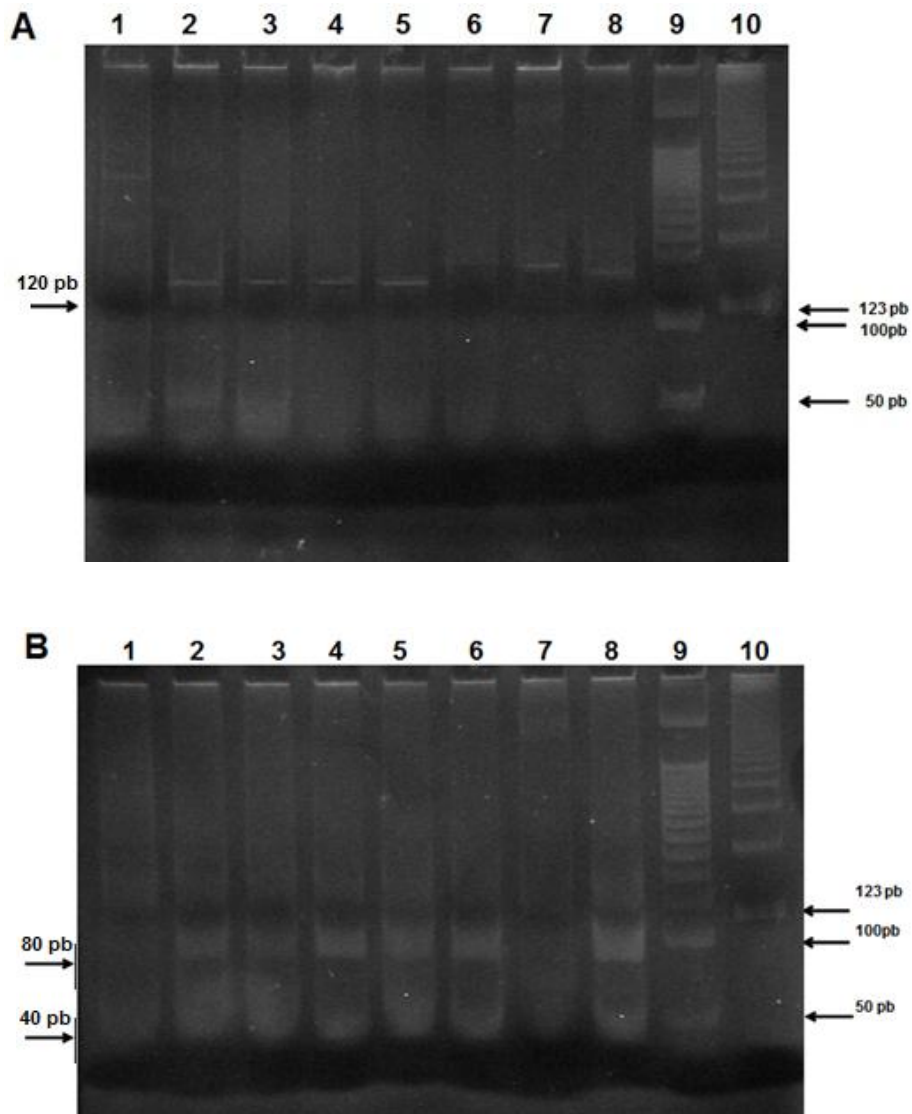


Figura 28. Análisis por PCR ADNk Hmod 1-3 de seis muestras de pacientes con LC. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos Hmod 1-3 (género *Leishmania*) **A** y su digestión con la enzima *Hae* III **B**, para analizar seis muestras clínicas. Los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae* III por reacción, a 37 °C por 4 horas. Electroforesis realizada a 100V por 45 min. Gel de poliacrilamida 8% y tinción con bromuro de etidio.

A: amplicones de: 1: R. P.; 2: M. E.; 3: A. S.; 4: M. P.; 5: D. C.; 6: O. S.; 7: *L. (L) mexicana* BEL21; 8: *L. (V) panamensis* 1169; 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

B: Digestiones *Hae* III 1: R. P.; 2: M. E.; 3: A. S.; 4: M. P.; 5: D. C.; 6: O. S.; 7: *L. m* BEL21; 8: *L. p* 1169; 9: M PM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: M PM 123 pb.

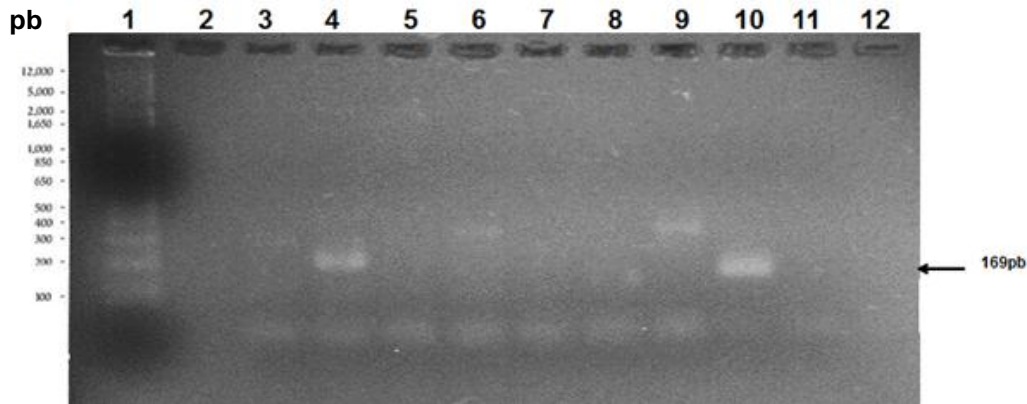


Figura 29. Electroforesis del PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*) para analizar seis muestras clínicas. Amplificación en Termociclador MJ research PTC-200. Gel de agarosa 2%. Electroforesis a 50V por 60 min y tinción con bromuro de etidio. 1: MPM 1kb plus; 2: vacío; 3: ADN R. P.; 4: ADN M. E.; 5: ADN A. S.; 6: ADN M. P.; 7: ADN D. C.; 8: ADN O. S.; 9: *L. (L) mexicana* BEL21; 10: *L. (V) panamensis* 1169; 11: H₂O C.B; 12: H₂O C.G.

El análisis de las muestras de pacientes con el PCR ADNk subgénero *Viannia* se muestra en la figura 29 y el PCR-RFLP con la enzima *Hae* III en la figura 30.

En la figura 29 observamos que se evidenció la presencia de las bandas correspondientes al producto esperado en el PCR ADNk LeishF3/LeishB3 de alrededor de 169 pb para el control positivo de *L.(V) panamensis* 1169 (carril 10) y solo para muestra de M. E. (carril 4), adicionalmente se observaron bandas inespecíficas de mayor tamaño para las muestras R. P. (carril 3), M. P. (carril 6), y para el control de *L. (L) mexicana* BEL21 (carril 9).

La digestión *Hae* III de los amplicones de 169 pb (figura 30) generó los siguientes patrones de bandas: el control *L. (V) panamensis* 1169 generó fragmentos de 110 y 39 pb (carril 8), compartidas por el control *L. (L) mexicana* BEL21 el cual produjo bandas de 100 y 39 pb (carril 7). La muestra de R. P. no

presentó ninguna banda (carril 5), la muestra de M. E generó un patrón de dos bandas de 90 y 39 pb (carril 6).

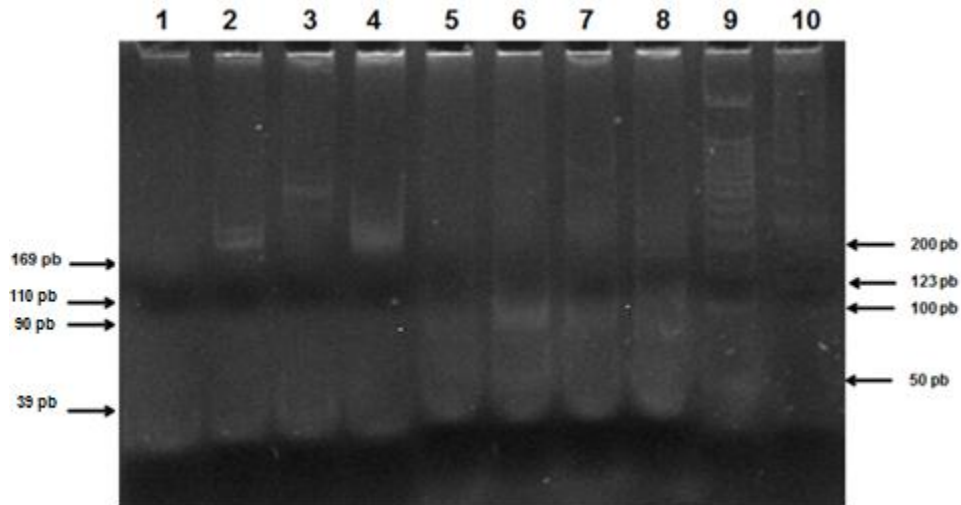


Figura 30. Electroforesis de los productos del PCR ADNk con los oligos LeishF3 y LeishB3 (subgénero *Viannia*) y su digestión, para analizar seis muestras clínicas. Los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de enzima *Hae* III por reacción, a 37 °C por 4 horas. Gel de poliacrilamida 8%. Electroforesis realizada a 100V por 50 min y tinción con bromuro de etidio. 1: ADN de R. P.; 2: ADN de M. E.; 3: *L. (L) mexicana* BEL21; 4: *L. (V) panamensis* 1169; 5: Digestión (R. P.); 6: Digestión (M. E.); 7: Digestión (*L. m* BEL21); 8: Digestión (*L. p* 1169); 9: MPM 50 pb 1/10 (PROMEGA); 10: MPM 123 pb.

8. Diseño propuesto de un flujograma de pruebas moleculares para la identificación progresiva desde el nivel de género hasta el de complejo/especie

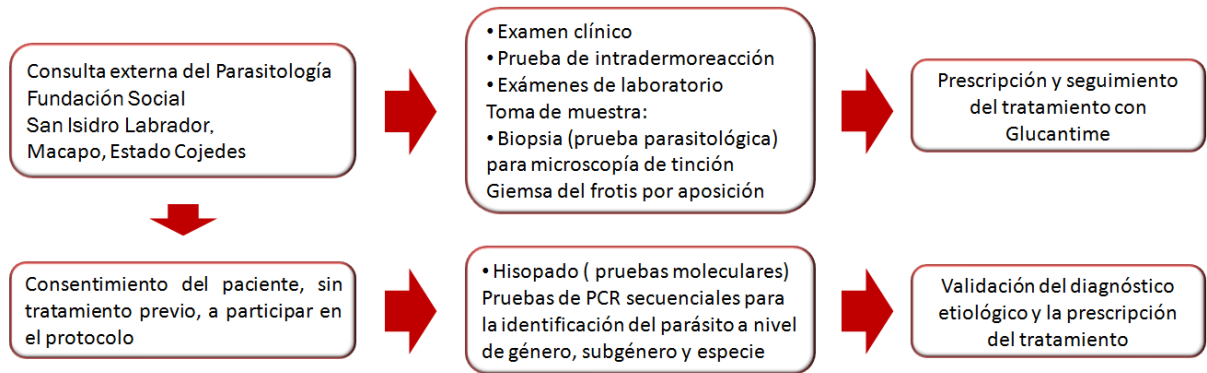


Figura 31. Flujograma del proceso de atención del paciente en la consulta externa de parasitología de la fundación social San Isidro Labrados, Macapo, Edo. Cojedes incluyendo las pruebas realizadas (Guevara y col.; 2013).

La figura 31 muestra el proceso de atención de paciente en la consulta de parasitología de la fundación San Isidro en la localidad de Macapo; llevando a cabo un diagnóstico por dos vías distintas y que conducen a la prescripción del tratamiento: un examen clínico de los síntomas seguido de la realización de una prueba inmunológica que proporciona resultados en poco tiempo (prueba de intradermoreacción), prosiguiendo con el análisis mediante pruebas parasitológicas. Este análisis es acompañado con la aplicación de pruebas moleculares sensibles y específicas que permitirán identificar taxonómicamente al parásito.

Nivel de identificación

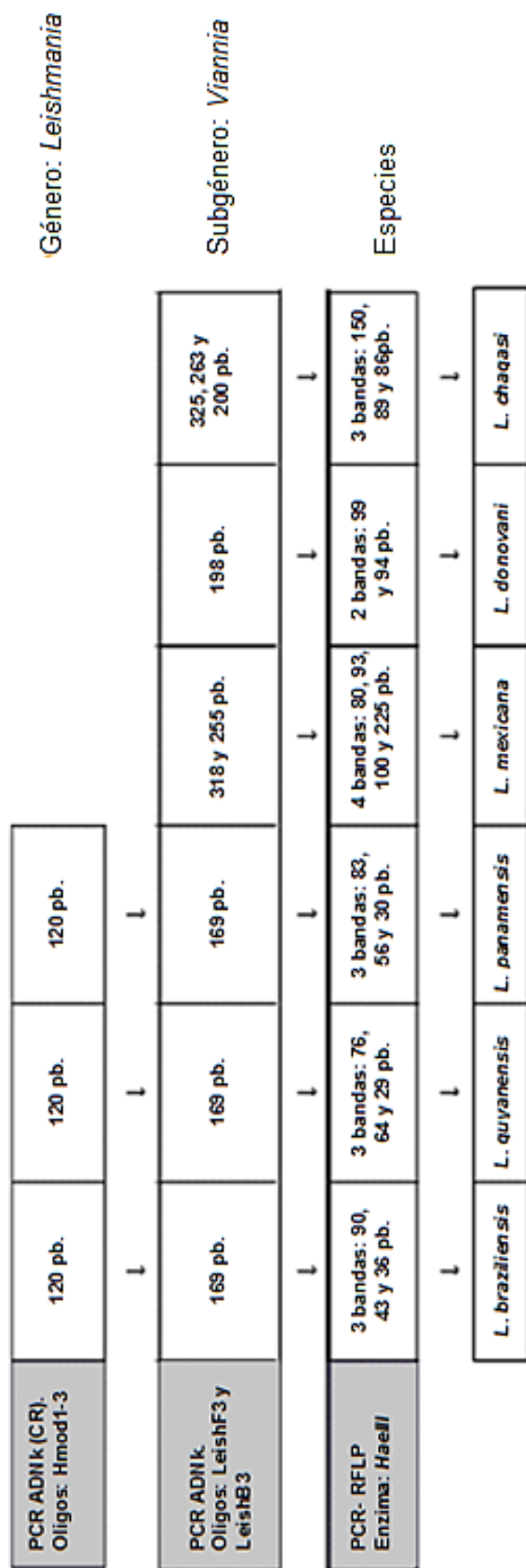


Figura 32. Flujoograma propuesto de diagnóstico molecular del parásito *Leishmania*, agente etiológico de la Leishmaniasis Cutánea Americana (Volpini y col., 2003).

Considerando el nivel de discriminación de las pruebas de PCR punto final dirigidas al ADNk mc como blanco reportadas en la literatura (tabla 4) , entre las que se encuentran el PCR Hmod1-3 y el PCR-RFLP ADNk (Volpini y col., 2003), así como los dos ensayos normalizados y evaluados en este trabajo proponemos el esquema secuencias de evaluación molecular de las muestras de pacientes descrito en la figura 32 para ser incorporado en el esquema de trabajo en la consulta de parasitología de la fundación San Isidro Labrador de la población de Macapo en el diagnóstico de la LC (figura 31). Este esquema propone identificar taxonómicamente al parásito desde el nivel de género, mediante una prueba de PCR ADNk empleando los oligos Hmod1/Hmod2/Hmod3 que reconoce al género *Leishmania*; procediendo luego con un ensayo de PCR ADNk utilizando los oligos LeishF3 y LeishB3 para identificar al subgénero *Viannia*; y finalmente podemos utilizar el PCR-RFLP de Volpini y col 2003 en conjunto con la prueba PCR-RFLP ADNk LeishF3/B3.

Discusión

En el tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea generalmente los métodos de diagnóstico molecular no constituyen la primera opción para el médico tratante. Tradicionalmente se procede con el diagnóstico clínico y parasitológico que incluye la observación de los síntomas clínicos reconociendo el espectro de las manifestaciones clínicas de la enfermedad en el paciente, seguido de métodos parasitológicos directos como la observación al microscopio de los parásitos en frotis de tejidos obtenido de biopsias del bordes de lesiones o de aspirados, teñidos con Giemsa. Esta es la metodología utilizada frecuentemente en regiones endémicas para la LC, secundada en ocasiones por el cultivo de promastigotes. Estos métodos, si bien son específicos al identificar a las formas amastigotas en los macrófagos, no proveen información especie-específica y por lo tanto, no son útiles para orientar la quimioterapia en áreas donde las infecciones son causadas por diferentes agentes etiológicos que se superponen.

En una segunda instancia suelen utilizarse métodos más sensible con la finalidad de detectar e identificar al parásito *Leishmania* tales como: la electroforesis isoenzimática para detectar patrones especie específicos, el empleo de anticuerpos monoclonales, la hibridación *in situ*, la cario tipificación molecular, entre otras. Sin embargo y comparados con las pruebas de PCR, muchos de estos métodos se caracterizan por requerir grandes cantidades de material de muestra, involucran un proceso técnico prolongado e inclusive pueden presentar dificultades al momento de interpretar los resultados.

Hasta la fecha se han desarrollado y descrito diversos ensayos de PCR basados en la amplificación del ADNk, con resultados remarcablemente satisfactorios en cuanto a su sensibilidad y especificidad (ver tabla 4) (Bensoussan y col., 2006; Vega-López, 2003). A pesar de lo anterior, existen una serie de dificultades y obstáculos que aún no hacen práctico la inclusión de protocolos de diagnósticos moleculares eficaces y simplificados, en formatos estandarizados, para su implementación en zonas endémicas donde la enfermedad afecta de forma recurrente a la población.

Teniendo en cuenta el punto previo, en este estudio iniciamos el desarrollo de pruebas moleculares con la recopilación de secuencias de mc (completas o parciales que incluyeran la CR completa o parcial) de aislados de especies del subgénero *Viannia* (ver tabla 6, 7, 8 y 9), para luego avanzar en el desarrollo de una prueba de PCR-RFLP sobre el ADNk que nos permitiría identificar a las especies incriminadas en causar la LC en nuestro país y el resto del continente. El propósito final propuso incluir a este ensayo en un protocolo dirigido a la identificación progresiva del parásito infectando a la muestra desde el nivel de género hasta los complejos taxonómicos y/o especies; lo cual es esencial para el diagnóstico, entendimiento epidemiológico y la orientación para las medidas de control de esta enfermedad.

La posterior alineación de las secuencias de mc y la determinación de los sitios de hibridación de los iniciadores LeishF3 y LeishB3 a utilizar en los ensayos de PCR ADNk, nos permitió observar el % de identidad entre estos sitios de hibridación de los iniciadores y las secuencias de mc (ver tabla 6, 7, 8 y 9). Los

valores de % de identidad nos permitió estimar la posibilidad de éxito en el empleo de los iniciadores LeishF3 y LeishB3 en la prueba de PCR ADNk para conseguir la amplificación de la región blanco en el mc de los aislados de las diferentes especies infectantes a humanos en el subgénero *Viannia*. En general observamos una mayor % de identidad en las secuencias reconocidas por el oligo LeishF3 respecto al sitio de hibridación del oligo LeishB3 (ver tabla 6), acorde con el modelo propuesto de diversidad de las secuencias del mc donde se propone que el % de identidad entre las secuencias de las diversas clases de minicírculos presentes en un parásito y entre diferentes aislados de una especie, comienza como 100% en la CR y va disminuyendo hacia la dirección de 5' (ver fig 7). Particularmente para la especie *L. (V) braziliensis* el oligonucleótido LeishB3 presentó un bajo % de identidad con el sitio de hibridación del respecto a las otras tres especies analizadas del parásito, lo cual tendría como resultado una relativamente menor cantidad del producto amplificado y la necesidad de utilizar menores temperaturas de hibridación para la síntesis del fragmento entre LeishF3 y LeishB3, potencialmente disminuyendo la sensibilidad de la prueba para esta especie de *Leishmania*. En la optimización de la temperatura de hibridación para el ensayo PCR ADNk LeishF3/LeishB3 fue necesario elegir 50 °C como la temperatura a la cual todas las cuatro especies del subgénero *Viannia* ensayadas produjeron el amplicón esperado de 169 pb en promedio, fragmento ausente en las especies del subgénero *Leishmania* evaluadas (figuras 22 y 23).

La búsqueda de sitios de restricción de las regiones del mc entre los sitios de hibridación de los oligos LeishF3 y LeishB3 para cada secuencia de mc

analizadas (ver tabla 10 y figura 13) permitió identificar las enzimas de restricción *Hae* III y *Taq* I como útiles en el desarrollo del ensayo PCR-RFLP ADNk mc. La búsqueda de sitios de restricción polimórficos en las especies pertenecientes al subgénero *Viannia*, ampliando la región para incluir a las secuencias flanqueantes a la CR del mc delimitada por los oligonucleótidos LeishF3/LeishB3, reveló la presencia de un sitio adicional para la enzima *Hae* III, al descrito por Volpini y colaboradores en el 2003.

La digestión con la enzima *Hae* III permite teóricamente reconocer entre las cuatro especies a *L. (V) braziliensis*, *L. (V) peruviana*, y el conjunto de *L. (V) panamensis* y *L. (V) guyanensis* (complejo guyanensis) a partir de la diferencia entre el número y tamaño de los fragmentos producidos y visualizados durante la electroforesis (esquema resumido en la Figura 13) (2 sitios, produciendo fragmentos de 98, 39 y 14 pb para *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. (V) panamensis*) ; 1 sitio, produciendo fragmentos de 98 y 69 pb para *L. (V) peruviana*). Adicionalmente, el polimorfismo con la enzima *Taq* I podría discriminar entre *L. (V) braziliensis* y el conjunto de *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. (V) peruviana*, debido a que *L. (V) braziliensis* presenta un solo sitio de restricción para esta enzima ausente en las tres especies *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. (V) peruviana*. Otra consideración a partir de la figura 12 es que la digestión mixta utilizando ambas enzimas *Hae* III y *Taq* I permitiría distinguir por sus patrones a las cuatro especies (tabla 11, (*L. (V) braziliensis*: 4 fragmentos, de 65-59, 59-40, 41-39 y 35-14 pb; *L. (V) panamensis*: entre 5 y 3 fragmentos, de 57-40, 85-40, 58-37, 40-21 y 31-10 pb; *L. (V) guyanensis*: 3 fragmentos, de 92, 41 y

30 pb; y *L. (V) peruviana*: 2 fragmentos de 98 y 69 pb). Es importante considerar en este ensayo

En la búsqueda y el análisis de las secuencias de mc en las bases de datos disponible observamos una sub-representación de secuencias de mc provenientes de diversos aislados de todas las especies de *Leishmania* descritas (figura 3), particularmente en el subgénero *Viannia*. Sería recomendable incrementar la data de secuencias incluyendo varias cepas de cada especie y de diferentes regiones geográfica que permitan validar junto con los ensayos de laboratorio, el análisis de especificidad de un ensayo como el aquí evaluado.

La normalización del ensayo definió 50°C como la temperatura de hibridación a la cual todas las especies del subgénero *Viannia* amplifican el fragmento específico de 169 pb delimitado por los oligonucleótidos LeishF3/LeishB3. Excepto por la temperatura de hibridación, ratificamos las condiciones de incubación del ensayo (número de pasos, temperaturas de elongación y desnaturalización, concentración de reactivos) definidas por Lacruz 2011, las cuales establecieron una fase de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos; continuando con 40 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, una fase de hibridación a 50 °C por 1 minuto, y una fase de extensión a 72 °C por 1 minuto; prosiguiendo con una fase de extensión final a 72 °C por 10 minutos; concentración final de MgCl₂ 2 mM y dNTPs a 2µM.

La especificidad de esta prueba PCR ADNk empleando los oligos LeishF3 y LeishB3 se llevó a cabo empleando muestras de cepas de referencia disponibles

en la colección de ADNs de Kinetoplastidios del Laboratorio de Genética Molecular, particularmente con ADNs pertenecientes a especies del subgénero *Viannia* y algunas especies del subgénero *Leishmania* (tabla 5). Solo las especies *L. (V) braziliensis* M2903, y *L. (V) panamensis* 1169 y *L. (V) guyanensis*, del subgénero *Viannia* generaron el producto esperado de alrededor de 169 pb.

El diseño del flujograma para la identificación molecular progresiva de especies de *Leishmania* subgénero *Viannia* propuesto en este trabajo consideró los ensayos basados en la secuencias del mc ADNk, inicialmente los que amplifican la región conservada asociada a la replicación del minicírculo, región CR, común a todas las especies del género *Leishmania*. El siguiente nivel de discriminación estuvo dirigido a la identificación a nivel de subgénero, identificando a las especies del subgénero *Viannia*. Si bien existen pruebas basadas en el espaciador intergénico ribosomal (Guevara y col., 1994) que identifican a este subgénero, el contar con una prueba confirmatoria de igual o mayor especificidad y sensibilidad representa una alternativa deseable en los procesos de diagnóstico. En este sentido proponemos la inclusión del PCR-ADNk oligonucleótidos LeishF3/LeishB3 cuyas condiciones fueron normalizadas en este trabajo en el esquema descrito en la figura 32.

Para la identificación a nivel de especies incluimos como referencia la prueba PCR-RFLP ADNk sobre la CR (Volpini y col., 2003) la cual nos permitieron establecer las condiciones de digestión con la enzima *Hae* III utilizando las cepas de especies de referencia de *Leishmania* del subgénero *Viannia* y *Leishmania*. Igualmente confirmamos los patrones reportados para *L.(V) braziliensis* con dos

bandas de 80 pb y 40 pb, y describir el patrón de *L.(V) guyanensis* (100 pb y 20 pb) y *L.(V) panamensis* (120 pb, no digerido) no evaluadas anteriormente. De esta manera confirmamos la identidad de nuestras cepas de referencia. Llama la atención el comportamiento con este ensayo de la cepa LBT300 de *L.(V) braziliensis*, que no fue digerida por la enzima *Hae* III, manteniéndose el fragmento originalmente amplificado de 120 pb.

En cuanto al ensayo PCR-RFLP ADNk con los oligos LeishF3/LeishB3 ensayamos la generación de los patrones propuestos a partir de los análisis *in silico* con la enzima *Hae* III (figura 13) evaluados en geles de poliacrilamida.

Todo el esquema de la figura 32 fue aplicado apropiadamente al ADN de las cepas de referencia y luego a las siete muestras de ADN aislado de tejido obtenido de hisopado de lesiones cutáneas de pacientes quienes acudieron a la consulta parasitológica de la fundación San Isidro Labrador y quienes accedieron voluntariamente a participar en el ensayo. En todos los casos fue posible identificar el patrón de *L.(V) braziliensis* y a ésta como la especie infectante, La confirmación de esta identificación la ofreció el ensayo PCR-RFLP ADNk descrito por Volpini y col 2003.

El ensayo PCR-RFLP ADNK oligonucleótidos LeishF3/LeishB3 generó para todas las muestras de especies de referencia en el subgénero *Viannia* una banda de cercana a 169 pb (figuras 22 y 23) y patrones con la enzima *Hae* III que revelan la existencia de al menos 2 sitios de corte para RFLP sobre el ADN de las muestras de *L. (V) braziliensis* LTB-300, *L. (V) guyanensis* M4147, *L. (V)*

panamensis LS-94 y *L. (V) braziliensis* M2903. Sin embargo es necesario continuar con la normalización de las condiciones de la digestión para lograr una digestión completa y afinar las condiciones de corrida que permitan claramente discriminar los patrones de bandas generados para cada especie.

Deben continuarse los esfuerzos por desarrollar e incrementar la aplicabilidad de pruebas de diagnóstico molecular que sean eficaces y específicas en la identificación del parásito *Leishmania*; y por ende, se resalta la necesidad de incrementar la información genética disponible acerca de las diversas especies de *Leishmania*, y particularmente las pertenecientes al subgénero *Viannia* al ser las causantes de la leishmaniosis cutánea americana, que presenta un preocupante y elevado nivel de incidencia de casos en nuestro país.

Conclusiones

1. El análisis *in silico* de secuencias de mc ADNk en el género *Leishmania* subgénero *Viannia* permitió la ubicación de un total de 42 secuencias conteniendo la CR del mc, incluyendo los tres bloques conservados CBS1, CBS2 y CBS3 cubriendo cuatro especies con los siguientes registros: 5 para *L. (V) guyanensis*, 1 para *L. (V) peruviana*, 22 para *L. (V) panamensis* y 14 para *L. (V) braziliensis*.
2. El resultado de esta búsqueda mostró una subrepresentación de todas las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, donde con frecuencia el registro de diferentes números de acceso se origina de una misma cepa, evidenciando una cobertura deficiente de las diferentes regiones del continente Americano, así como de la diversidad biológica de las cepas circulando en la naturaleza.
3. Las secuencias de los oligonucleótidos LeishF3 y LeishB3 fueron ubicadas en las regiones flanqueantes a la secuencia de la CR en las cuatro especies del subgénero *Viannia*, LeishF3 presentando cada una de las secuencias analizadas, una identidad entre el 81,25% - 100% mientras que LeishB3 mostró una identidad mucho menor, entre 33,33% - 94,44%, acorde con el modelo de variabilidad de secuencias en la estructura del mc en el género *Leishmania*.
4. Diseñamos un ensayo PCR-RFLP ANDk utilizando a las enzimas *Hae III* y *Taq I*, el cual preside la posibilidad de diferenciar cada una de las especies

del subgénero *Viannia*, *L. (V) braziliensis*, *L.(V) guyanensis*, *L.(V) panamensis* y *L. (V) peruviana*.

5. Fue posible determinar las condiciones de amplificación para el PCR-ADNk subgénero *Viannia*, utilizando los oligonucleótidos LeishF3/LeishB3, incorporando 50°C como la temperatura de hibridación y manteniendo el resto de las condiciones de incubación y ciclaje así como las concentraciones finales de los reactivos (MgCl₂, dNTPs y oligonucleótidos) reportadas por Lacruz 2011.
6. Normalizamos las condiciones del PCR-ADNk (Volpini y col., 2003) para la identificación de especies confirmando el patrón reportado para *L. (V) braziliensis* y describiendo un nuevo patrón para *L. (V) guyanensis*, *L.(V) panamensis* y *L. (L) mexicana*.
7. Diseñamos un flujograma para la identificación molecular de especies de *Leishmania*, agente etiológico de la Leishmaniasis Cutánea Americana, el cual analiza progresivamente la ubicación desde género, subgénero hasta la identificación de la especie,
8. Identificamos a *Leishmania braziliensis* como la especie presente en la infección en una de las siete muestras de ADN aisladas de tejido obtenido de hisopado de lesiones cutáneas de pacientes que asistieron a la consulta de parasitología de la Fundación San Isidro Labrador de la población de Macapo, Municipio Limas Blanco, Estado Cojedes.

9. Es necesario precisar las condiciones óptimas de la digestión *Hae* III en el ensayo PCR-RFLP ADNk LeishF3/LeishB3 para lograr los patrones teóricamente predichos del análisis *in silico*.

Consentimiento informado



PROYECTO
G-2007001442

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO: Desarrollo, adaptación, validación y transferencia de tecnologías para el diagnóstico molecular de enfermedades transmisibles a través de la Red Venezolana de Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos.

INVESTIGADORES RESPONSABLES: Alicia Jaqueira, Clara Martínez, Hernán Carrasco, Paloma Guetara, Elizabeth Ferrer, Anabel Ramos, Miguel Ángel Chiarillo, Belkis Yolá Alejo de Noya, Teresa Abate, Hectorina Rodulfo, Mirella De Donato, Albino Wade y Rafael Hernández.

INSTITUCIONES PARTICIPANTES: Universidad de Oriente; Instituto de Investigaciones en Biofarmacia y Ciencias Aplicadas (IBCA) y Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS) Universidad Central de Venezuela; Instituto de Biología Experimental (IBE) e Instituto de Medicina Tropical (IMT) Universidad de Carabobo; Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado; Decanato de Ciencias de la Salud Instituto Nacional de Higiene y Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Ligadas.

El objetivo general de este estudio es diseñar y validar diversos protocolos para la detección de material genético de parásitos en matrices biológicas humanas, animales y de insectos hematófagos permitiendo la identificación de los patógenos y el diagnóstico de:

La Enfermedad de Chagas
La leishmaniasis
La Malaria
La Chikunguña
La Tripanosomiasis

El estudio se basa en pruebas de amplificación de ADN desarrolladas o adaptadas en los diferentes laboratorios de investigación que conforman la red de diagnóstico molecular de estas enfermedades. Estas pruebas responden de manera directa a la demanda y planes de trabajo que han sido establecidos por la Misión Ciencia para la transferencia de estas tecnologías a nivel nacional, para apoyar a los eventos de Salud Pública vinculados al diagnóstico, control clínico y epidemiológico de estas enfermedades del Ministerio del Poder Popular Para La Salud, órgano rector en esta materia.

Dado que usted habita en una zona donde se conocen casos de la enfermedad leishmaniasis, solicitamos que participe en este proyecto de investigación. Su colaboración consistirá en responder a las preguntas de una encuesta clínico-epidemiológica y en donar, de forma voluntaria, una muestra de sangre y/o tejido de piel la cual se utilizará en el proceso de la evaluación y validación de las pruebas.

Si usted está de acuerdo, se le hará la encuesta y le pediremos permiso para tomar una muestra de sangre y/o tejido de piel. Estas muestras serán utilizadas para el diagnóstico de la



PROYECTO

G-2007001442

enfermedad leishmaniasis mencionada en el tercer párrafo de este documento y así desarrollar el objetivo general de este estudio.

Las muestras serán tomadas por personal capacitado siguiendo las medidas higiénicas y de bioseguridad pertinentes. El riesgo de que pueda salir lastimado o de infección durante la colecta de la muestra de sangre y/o tejido de piel es mínimo, pero es posible que sienta algún dolor o incomodidad, pero la sensación pasará rápidamente.

Con la(s) muestra(s) donada(s) por usted realizaremos el diagnóstico parasitológico de la enfermedad leishmaniasis, dándole a conocer el resultado personalmente y por escrito sin ningún costo económico. En el caso de que las pruebas resulten positivas, usted será remitido a un centro de salud con un informe del diagnóstico para ser incluido en los programas de control seguimiento y tratamiento de la enfermedad, debidamente autorizados por el Ministerio del Poder Popular para la Salud u otro ente de posible autorización.

Con las muestras donadas se procederá a realizar los protocolos de diagnóstico molecular seleccionados e identificar la especie de los parásitos en las muestras que resulten positivas.

La información y el material biológico obtenido serán utilizados para cumplir con los fines de esta investigación. Cualquier investigación adicional que se realice usando su muestra tendrá como objetivo mejorar las pruebas de diagnóstico existentes y evaluar la efectividad de la terapéutica de las parasitosis que se estudian, contando para ello con el aval de un Comité de Bioética, el cual es una comisión que vigila la investigación médica para proteger los derechos y el bienestar de los voluntarios participantes.

Toda la información relacionada con este proyecto será confidencial. Los datos de los participantes serán mantenidos en completo anonimato y la información recogida no podrá ser utilizada en su perjuicio.

Su participación en este estudio es de manera voluntaria. Usted puede decidir formar o no parte del mismo. Se le proporcionarán los teléfonos y direcciones de los investigadores e Instituciones participantes para que se comunique en el momento que lo considere necesario.

Bibliografía

- **Arevalo, J., Ramirez, L., Adai, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verastegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, S., Chappuis, F., Dujardin, J-C., Llanos-Cuentas, A. 2007.** Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *The Jour. of Infect. Dis.* **195**:1846–51
- **Bañus, A-L., Hide, M., y Prugnonle, F. 2007.** Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *ADV. IN. PARA.* Vol 64.
- **Belli, A., Rodriguez, B., Aviles, H., Harris, E. 1998.** Simplified Polymerase Chain Reaction detection of new world. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 102–109.
- **Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L., Jaffe, C. 2006.** Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *JOUR. OF CLINIC. MICROBIO.* **4**: 1435–1439
- **Cáceres O., y Montoya Y. 2002.** Diseño y evaluación de tres oligonucleótidos para la detección de *Leishmania* por PCR. División de Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima - Perú. Lima, Perú.

- **Cardoso da Graça, G., Volpini, A., Sierra, G., Neto, N., Hueb, M., Porrozzi, R., Boité, M., Cupolillo, E. 2012.** Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **107**: 664-674
- **Chrusciak-Talhari, A., Dietze, R., Moreira da Silva, R., Gadelha, E., Penna, G., Roberto, P. 2011.** Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.***84**: 255- 60.
- **Corrêa, J., Brazil, R., Soares, M. 2005.** *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus – A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **100**: 587-592
- **De Lima, A-C., Zampieri, R-A., Tomokane, T-Y., Laurenti, M-D., Silveira, F-T., Corbett, C-E., Floeter-Winter, L-M., Gomes, C-M. 2011.** *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. *Parasitol Res.* **108**:1525-31
- **Disch, J., Junqueira, M., Orsini, M., Pirmez, C., Claudia de Oliveira, M., Castro, M., Rabello, A. 2005.** *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diag Microbiol and Infect Dis.* **51**: 185 – 190.

- **Espitia, C., Zhao, W., Saldarriaga, O., Osorio, Y., Harrison, L., Cappello, M., Travi, B., Melby, P. 2010.** Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol.* **11**: 31.
- **Félix, J., Oletta, L., Ana, C., Carvajal Saul, P. 2011.** Leishmaniasis Consideraciones generales y epidemiológicas. *Red de Soc Cient Med Ven.* Alerta Epidemiologica N° 195
- **Fernandes, O., Bozza, M., Pascale, J., B de Miranda, A., Lopes, U., y Degrave, W. 1996.** An Oligonucleotide Probe Derived from kDNA Minirepeats is Specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **91**: 279-284
- **Fichoux, Y., Quaranta, J-F., Aueuvre, J-P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D., Kubar, J. 1999.** Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1953–1957.
- **Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Quispe, K., y Dujardin, J-C. 2004.** Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J Clin Microbiol.* **42**: 2294–2297
- **Gomes, E., Felinto de Brito, M., Mendonça, M., Werkhauser, R., Coutinho, E., Souza, W., Militão de Albuquerque, M., Jardim, M.,**

- Abath, F.2002.** Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. *JOUR. OF CLIN. MICROBIO.***10:** 3572- 3576
- **Goto, H., Angelo, J., Lindoso, L. 2010.** Current diagnosis and treatment of cutaneous and muco - cutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **8:** 419–433
 - **Guevara, P., Lacruz, A., Jorquera, A., Pozo, A., Boza, M., Nuñez, J., Payares, G., Sanoja, C., Reyes, M. 2012.** El diagnóstico molecular aplicado a la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas: el desarrollo de pruebas y su transferencia tecnológica. *Memorias del Instituto de Biología Experimental.* vol.6: 00-00 (en prensa)
 - **Guevara, P., Reyes, P., Boza, M., Contreras, E., García, R., Jorquera, A., Pozo, A., Aguilar, C.M., Borges, E., Fernández, H., Espinoza, M., Chiurillo, M., Urrutia, A. 2013.** Leishmaniasis: Pruebas moleculares aplicadas al diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania* sp. en una zona endémica del Estado Cojedes. *Sociedad Parasitológica Venezolana.* XXXII JORNADA “J.W.TORREALBA”
 - **Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., Agabian, N. 1998.** Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *J Clin Microbiol.***36:** 1989–1995.
 - **Guevara, P. 2009.** informe técnico proyecto Misión Ciencias G-2007001442.

- **Guevara, P. 2009.** informe técnico proyecto Misión Ciencias G-2007001442, subproyecto parásitos.
- **Lacruz, A. 2011.** Desarrollo de un ensayo de amplificación LAMP para la identificación de *Leishmania* spp. Y el diagnóstico de leishmaniasis. Tesis de Licenciatura. División de Estudios Básicos Sectoriales de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- **Luyo-Acero, G-E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., Gomez-Landires, E., Hashiguchi, Y., Nonaka, S. 2004.** Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*. **128**:483-491
- **Minodier, P., Parola, P. 2007.** Cutaneous Leishmaniasis Treatment. *Travel Med Infect Dis*.**5**: 150-8
- **Monteiro de Andrade, H., Barbosa, A., Lopes dos Santos, S., Volpini, A., Marques, M., Romanha, A. 2006.** Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology*. **140**: 231- 238
- **Nieves, E., Villarreal, N., Rondón, M., Sánchez, M., Carrero, J. 2008.** Evaluación de conocimientos y prácticas sobre la leishmaniasis tegumentaria en un área endémica de Venezuela. *Biomédica*.**28**: 347- 56.

- **Guevara, P., Rojas, E., Gonzalez, N., Vicente, J., Anez, N., Valera, M., and Ramirez, J. 1994.** Presence of *Leishmania braziliensis* in Blood Samples from Cured Patients or at Different Stages of Immunotherapy. *CLIN AND DIAG LAB IMMUN.* **4:** 385 - 389
- **Pirmez, C., Vália da Silva, T., Neto, M., Maria da Cruz, A., Goncalves da Costa, S., Catanho, M., Degrave, W., Fernandes, O. 1999.** Use of PCR in Diagnosis of Human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *JOUR. OF CLIN. MICROBIO.* **37:**1819–1823
- **Ramos., J.M. y Segovia, M. 1997.** Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis. *Revista española de quimioterapia.* **1:** 26
- **Reithinger, R. y Dujardin, J-C.2007.** Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *JOUR. OF. CLIN. MICROBIO.* **1:** 21- 25.
- **Rodríguez-Morales, A., Pascual-González, Y., Benítez, J., López-Zambrano, M., Harter-Griep, R., Vilca-Yengle, L., Cárdenas, R. 2010.** Asociación entre la incidencia de leishmaniosis cutánea y el índice de desarrollo humano y sus componentes en cuatro estados endémicos de Venezuela. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* **27:** 22- 30
- **Rogers, W. y Wirth, D. 1987.** Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergence. *Proc. Nati. Acad. Sci.* **84:** 565-569

- **Saraiva, L., Filho, A., Sde, S., Andrade, A., Melo, M. 2010.** The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105:** 1033-9
- **Vega-López, F. 2003.** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect Dis.* **16:**97–101.
- **Volpini, A., Passos, V., Oliveira, G., Romanha, A. 2003.** PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica.* **90:** 31–37
- **Viana de Andrade, R., Massone, C., Barbosa de Lucena, M., Talhari, A., Talhari, S., Augusto de Oliveira, J., Carlos de Lima, L. 2011.** The use of polymerase chain reaction to confirm diagnosis in skin biopsies consistent with American tegumentary leishmaniasis at histopathology: a study of 90 cases. *An Bras Dermatol.* **86:**892-6.
- **WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. 2010.** Control of the leishmaniases. *WHO Technical Report Series.* **949**
- **WORTMANN, G., HOCHBERG, L., HUO-HSU, H., SWEENEY, C., ZAPOR, M., ARONSON, N., WEINA, P., OCKENHOUSE, C. 2005.** Rapid identification of *Leishmania* complexes by a Real-Time PCR Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73:** 999–1004

- Yurchenko, V., Merzlyak, E., Kolesnikov, A., Martinkina, P., Vengerov, Y. 1999. Structure of *Leishmania* Minicircle Kinetoplast DNA Classes. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1656- 1657

Consultas en línea:

- <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx> [Consulta: 17 de mayo de 2012]
- <http://www.uniprot.org/taxonomy/5688> [Consulta: 17 de mayo de 2012]
- http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/25/orgentec/autoimmunodiagnostik.vlu/Page/vsc/en/ch/25/orgentec/diagnostik_elisa_varianten_en.vscml.html [consulta: 3 de julio de 2012]
- <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo15.htm> [consulta: 23 de julio de 2012]).
- http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13 [consulta: 3 de julio de 2012]
- http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Laboratorio_TPN8.pdf [Consulta: 23 de julio de 2012]
- <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap35.asp> [consulta: 3 de julio de 2012]
- http://www.ungefcm.gq:8081/datas/agentesbiologicos/contenidos/generales/bibliografia_basica/microcap82.pdf [consulta:26 de julio de 2012]
- <http://www.foodsafetywatch.com/public/1050print.cfm> [Consulta: 9 de Julio de 2012]

- http://www.espanol.pcrlinks.com/variantes/nested_pcr.htm [consulta: 26 de julio de 2012]
- <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/realtimempcr.html>
[Consulta: 9 de Julio de 2012]
- <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html> [consulta: 11 de julio de 2012])
- <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>[consulta: 5 de Enero de 2013]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>[consulta: 20 de Enero de 2013]
- www.Arsa.ddbj.nig.ac.jp/html/[consulta: 20 de Enero de 2013]