

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis de marcadores moleculares para la tipificación de *Leishmania spp.* circulantes en el departamento de La Paz, Bolivia**Analysis of molecular markers for typing of *Leishmania spp.* parasites circulating in La Paz department, Bolivia**

Óscar V. Cárdenas Alegría¹, Danitza Romero Calle¹, Efraín Salamanca Capusiri¹, José A. Santalla Vargas², Patricia Oporto Portugal², Daniela Arteaga Voigt³, María Teresa Alvarez Aliaga¹, Enrique Terrazas Siles (†)¹, Ninoska Flores¹, Alberto Giménez Turba¹

¹Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas – IIFB, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Instituto Nacional de Laboratorios en Salud – INLASA, Ministerio de Salud y Deportes. La Paz, Bolivia.

³Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Policía Boliviana. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Alberto Giménez Turba Ph.D. Av. Saavedra No 2224, Miraflores, 2ndo Piso.

Telf: 261-2431

E mail: agimenez@megalink.com

Recibido para publicación en: 26/04/12

Aceptado en: 27/06/12

RESUMEN

La identificación y diferenciación de especies de *Leishmania* es compleja por la similitud genética entre ellas, sin embargo el uso de técnicas moleculares ha facilitado este tipo de análisis. En el presente estudio se evaluó la capacidad de identificación y diferenciación de los complejos de *Leishmania* y *Crithidia* con distintos marcadores moleculares del Kinetoplasto: minicírculos (13A/13B), maxicírculos (Citocromo b) y la secuenciación del segmento cromosomal (7SL ARN). La amplificación del segmento del Citocromo b, permitió diferenciar entre los parásitos de los géneros *Leishmania* y *Crithidia*. La secuenciación del fragmento 7SL ARN permitió observar la similitud entre las secuencias de estos parásitos así como la construcción de árboles filogenéticos, que han permitido agrupar los parásitos del género *Leishmania* a nivel de subgénero y complejos, no obstante la diferenciación intra especie no fue posible. En base al análisis de secuenciación de 7SL ARN, de las nueve cepas de *Leishmania* aisladas a partir de pacientes procedentes de distintas regiones endémicas del departamento de La Paz, cinco cepas agruparon en el complejo *Leishmania (V.) braziliensis* y cuatro al complejo *Leishmania (L.) mexicana*. La utilización de este método molecular permite la diferenciación de las cepas circulantes de *Leishmania*, por lo que es una herramienta útil en la epidemiología de esta parasitosis.

Palabras Clave: *Crithidia*, *Leishmania*, tipificación, marcadores moleculares: 7SL ARN, Citocromo b, 13A/13B.

ABSTRACT

The identification and characterization of species of *Leishmania* parasites is complex, due to genetic similitude among them. However, molecular techniques have simplified this analysis. In this study, we evaluated the amplification of kinetoplast molecular markers amplified from minicircles (13A/13B), maxicircles (cytochrome b), and chromosomal sequencing (7SL RNA) using different strains of the *Leishmania* and *Crithidia* genera. The amplification of the cytochrome b segment differentiated the *Leishmania* and *Crithidia* genera. Genetic sequencing of the 7SL RNA fragment permitted observation of similarities between these parasites as well as phylogenetic tree construction, which made it possible to organize the *Leishmania* parasites at the subgenus and complex level, but no intra-species differentiation was found. The sequencing analysis of the nine strains of *Leishmania*, isolated from skin ulcers of patients from different endemic regions of the La Paz department in Bolivia, identified five strains among the *Leishmania (V.) braziliensis* complex type and four strains within the *Leishmania (L.) mexicana* complex type. The use of this molecular method allows the differentiation of the circulating strains of

Leishmania parasites, and it is therefore a useful tool to update the epidemiology of this parasitosis

Key Words: *Crithidia*, *Leishmania*, typing, molecular markers; 13A/13B; 7SL RNA; Cytochrome b.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un complejo de enfermedades infecciosas, de gran importancia epidemiológica y presenta múltiples manifestaciones clínicas (cutánea, muco-cutánea y visceral), causadas por protozoarios unicelulares del género *Leishmania* (amastigote y promastigote), transmitido al hombre mediante la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. El género *Leishmania* está constituido por diversos complejos y especies las cuales pueden variar dependiendo de su ubicación geográfica. La manifestación clínica no sólo depende del genotipo del parásito, también del estado inmunológico del paciente y su genoma^{1,2,3}. La identificación de las especies responsables de esta enfermedad permite determinar los brotes epidemiológicos, la distribución en regiones geográficas y predecir los futuros cambios en la transmisión de la enfermedad en un área determinada⁴.

La estructura genética poblacional de *Leishmania* tiene un análisis complejo, porque muchas especies presentan una limitada variabilidad genética en comparación con otras especies. La carga genética presente en los parásitos del orden Kinetoplastidae (cromosómico, kADN maxicírculos y minicírculos) es heterogénea, estas variaciones de carga genética se observa sobre todo entre especies de *Leishmania* pertenecientes al viejo y al nuevo mundo^{5,6,7}.

Por otro lado, se ha reportado la presencia de diferentes parásitos con morfología heterogénea dentro de un insecto, en consecuencia dada la infección original del vector al huésped existiría la inoculación de distintos tipos de parásitos, en proporciones diferentes y con características propias de estos⁸. Por tal razón, el aislamiento de los parásitos patógenos, a partir de los vectores, se ve influenciada por cultivos mixtos⁹, la toma de muestra a partir pacientes puede también corresponder a una mezcla de diferentes parásitos y de genotipos^{10,11}.

Crithidia sp. es un parásito no patógeno para el humano, es utilizado para el análisis de especificidad y sensibilidad de distintos marcadores moleculares, por la estrecha relación genética que tiene con *Leishmania*^{12,13}. Marcadores moleculares como el miniexon, ADN ribosomal son capaces de diferenciar *Leishmania* de otros flagelados no patógenos, géneros como *Endotrypanum* y *Crithidia*¹⁴ y son considerados como "grupo externo" en el análisis filogenético, asimismo

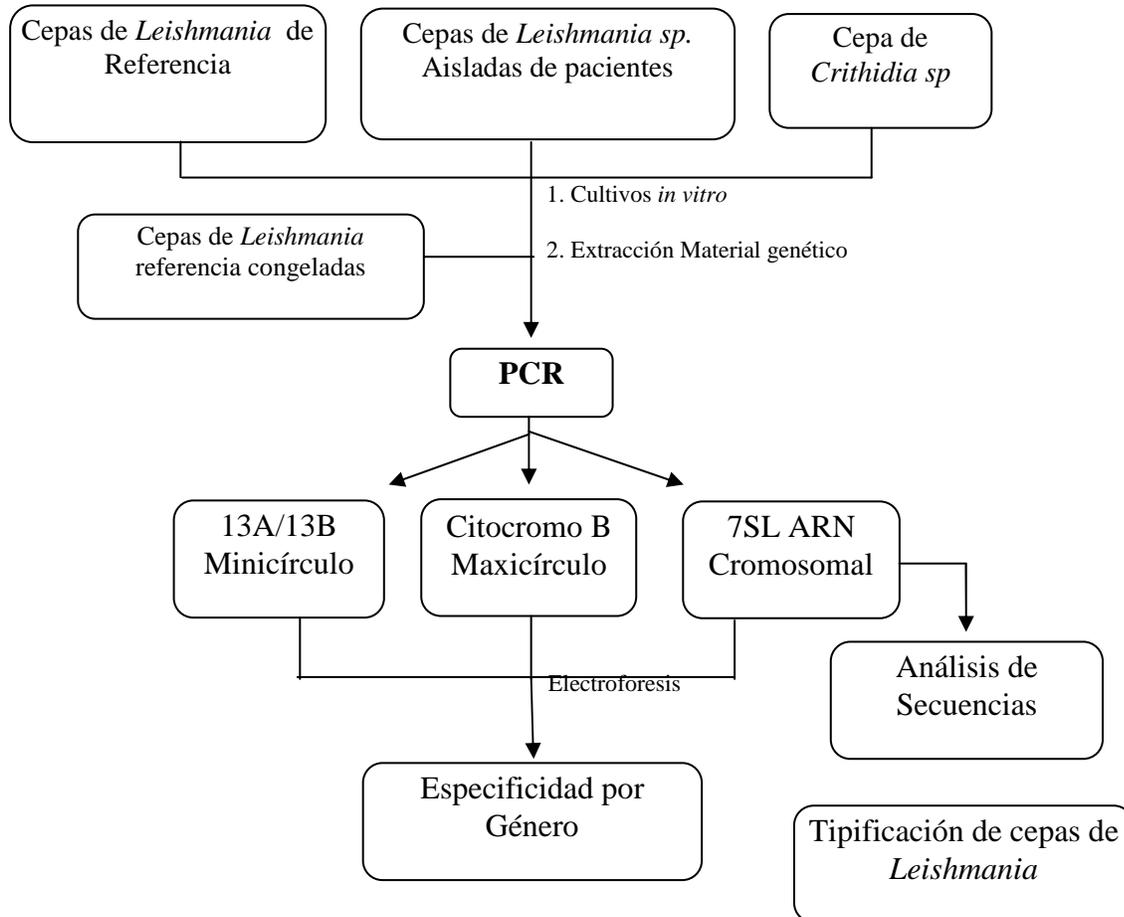
Crithidia sp. es un modelo para estudios genéticos comparativos evolutivos con *Leishmania*⁹.

Los parásitos de estos géneros presentan diferencias morfológicas que no son fáciles de diferenciar al microscopio óptico, como los choanomastigotes son similar a los promastigotes de *Leishmania*¹⁵; estos parásitos no patógenos pueden interferir en los cultivos de *Leishmania* y *Trypanosoma*, *Crithidia sp.* tiene la capacidad de sobrevivir en agua entre 30 a 48 horas por lo que tienen mayor éxito de ser aislados en los cultivos *in vitro*¹⁶.

La tipificación de *Leishmania* es generalmente realizada por isoenzimas siendo considerada como una prueba estándar para la caracterización de estas cepas^{17,18}. En los últimos tiempos el avance de la tecnología ha permitido mejorar la identificación y caracterización de este parásito, especialmente en los métodos moleculares, así como la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de segmentos conservados de los minicírculos (kADN), maxicírculos y otros^{19,20,21}. La utilización de la secuenciación de estos segmentos amplificados permite mejorar la tipificación, asimismo se observa el polimorfismo de simples nucleótidos (SNP's) de las distintas secuencias genéticas utilizadas, que constituyen una información útil en la tipificación de especies y análisis filogenético de *Leishmania sp.*²². En el presente estudio se realizó la amplificación por PCR para el análisis de los marcadores moleculares de minicírculos (13A/13B), maxicírculo (citocromo b) y la secuenciación de un segmento cromosómico 7SL ARN para la tipificación de *Leishmania*²³.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas. El presente trabajo tiene un diseño metodológico detallado en el Esquema 1 y se utilizaron 21 cepas (1 cepa de *Crithidia* y 20 cepas de *Leishmania*). De ellas, un total de 17 cepas fueron adaptadas a cultivo *in vitro* en el IIFB. Entre las cultivadas, 6 cepas de *Leishmania* fueron donadas por el Dr. Jorge Arévalo, de la Universidad Cayetano Heredia, a través del Instituto de Enfermedades Tropicales Alexander von Humboldt, Lima, Perú. Un total de 8 cepas de *Leishmania*, congeladas desde el año 1994, fueron donadas por la Dra. Celeste Rodríguez del Laboratorio de Inmunoparasitología del IBBA, Facultad de Medicina de la UMSA de las cuales solamente 4 cepas fueron utilizadas en este trabajo y además 9 cepas de *Leishmania* fueron aisladas a partir de úlceras cutáneas de pacientes provenientes de distintas regiones endémicas del departamento de La Paz, en el Laboratorio de Parasitología del INLASA (Tabla 1).



Esquema 1. Diseño metodológico para la tipificación de las cepas

|

Tabla 1. Listado de las distintas cepas utilizadas para el desarrollo del presente trabajo

Cepas	Código interno	Procedencia
<i>L. amazonensis</i> Clon 1 MHOM/BR/76/LTB-012	A	IIFB
<i>Crithidia</i> sp.	B	IIFB
<i>L. braziliensis</i> MHOM/Br/75/M2903(a)	1	IBBA-UMSA*
<i>L. braziliensis</i> de Paciente	4	IBBA-UMSA*
<i>L. amazonensis</i> IFLA/BR/67/PH8	5	IBBA-UMSA*
<i>L. braziliensis</i> M2904/C192/RJA	I	UCH**
<i>L. guyanensis</i> LP/52/R70	II	UCH**
<i>L. peruviana</i> LCA08/CIRIO/a/h	III	UCH**
<i>L. peruviana</i> LC2177/a/h/ R9	IV	UCH**
<i>L. braziliensis</i> HB86/c/4R5	V	UCH**
<i>L. braziliensis</i> LC2043/c/8 R7	VI	UCH**
INL-001-10	001	INLASA***-Caranavi
INL-002-10	002	INLASA-Coripata
INL-065-10	065	INLASA-La Asunta
INL-097-10	097	INLASA-Sorata
INL-329-10	329	INLASA-La Asunta
INL-377-10	377	INLASA-Cajuata
INL-413-10	413	INLASA-La Asunta
INL-435-10	435	INLASA-Cajuata
INL-436-10	436	INLASA-La Asunta

*Dra. Celeste Rodríguez Q. Laboratorio de Inmuno parasitología-UMSA

**Dr. Jorge Arévalo. Universidad Cayetano Heredia. IETA vH-Perú

***Instituto Nacional de Laboratorios de Salud, Ministerios de Salud y Deportes

(a y b)

Cultivo de los parásitos. Las cepas “I al VI”, “a” y “b” fueron adaptadas a cultivo *in vitro* en medio Schneider (pH 6,8) suplementado con Glutamina, CaCl₂ 6% (p/v), Bicarbonato de Sodio 40% (p/v), Gentamicina 200 mg/L y 5% de suero albumino bovino (los reactivos utilizados fueron adquiridos de SIGMA-Aldrich). Los cultivos fueron conservados en una estufa a 27° C²⁴. El mantenimiento de los cultivos fue vigilado, observando el movimiento y saturación de los parásitos a diario, a través del empleo de un microscopio óptico invertido (Zeiss, Axiovert 25). Para la observación de las características morfológicas se prepararon frotis y tinciones de Giemsa, para posteriormente ser observados al microscopio.

Extracción del material genético. Para la extracción del material genético se aplicó el método de precipitado por salado modificado²³, los cultivos de parásitos (~2mL) fueron centrifugados a 7.000 rpm por 10 minutos, se adicionó al precipitado 300µL de una solución de lisis (Guanidina 5M, EDTA 20mM, Tris-HCl pH 7,0, 40mM y Tween 20, 1%), se mezcló con ayuda de un vortex (Thermolyne). Esta suspensión fue incubada a 65° C por 15 minutos y posteriormente se agregó 200µL de una solución fría de acetato de sodio (3M, pH 7,5), a continuación se mezcló por inmersión. Las suspensiones fueron centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo, se adicionó etanol absoluto frío, los tubos con el sobrenadante fueron incubadas en hielo por 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm por 10

minutos. El precipitado fue lavado con etanol al 70% y la suspensión fue nuevamente centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto, repitiendo este último procedimiento tres veces. El precipitado fue secado a 55° C por 15 minutos, se resuspendió con 100µL del tampón TE (pH 8, EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM pH 7) y finalmente fue conservado a 4 °C hasta su utilización. La calidad del material genético obtenido fue evaluada a través de la observación por la electroforesis horizontal, se utilizó geles de agarosa (1%) teñidos con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL; PROMEGA) y se visualizó con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (Spectrolin). La cantidad de ADN fue determinada con las lecturas de absorbancia (260, 280 y 320 nm) con un espectrofotómetro Cintra 5 (GBC Scientific Equipment).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó el material genético en aquellas muestras que presentaban valores del índice de pureza dentro lo esperado (1,65 a 1,85)²³ y se realizó la optimización para los diferentes marcadores, así como el kinetoplasto: de minicírculos, de maxicírculos y ADN cromosómico del parásito. Los cebadores utilizados (IDT, USA) y las

condiciones optimizadas en un termociclador Eppendorf de las distintas PCR's se detallan en la Tabla 2; los productos obtenidos de las diferentes cepas evaluadas en el presente trabajo fueron observados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (2%), teñidos con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL; PROMEGA) y visualizados con un transiluminador a luz ultravioleta (Ultraline). Se utilizó un marcador de peso molecular de 0,1 a 1,5 kpb (100bp DNA ladder, PROMEGA).

Secuenciación de los productos de PCR fragmento 7SL ARN. Los productos obtenidos de la amplificación del segmento 7SL ARN, fueron sometidos a la purificación y amplificación, se utilizaron los protocolos de Applied Biosystems para la secuenciación. Los cebadores utilizados para la reacción de secuenciación del fragmento 7SL ARN fueron: M13 Forward, 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' y M13 Reverse, 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'²⁴ y la secuenciación fue realizada en un analizador genético ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabla 2. Características de las secuencias de los cebadores y las condiciones de amplificación para el desarrollo de la PCR.

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Ubicación	Material Genético	Tamaño pb	PCR	Nº de ciclos
13 A ¹³	GTGGGGGAGGGGCGTTC T	Región no variable	kADN minicírculo	120	94°C 5', 94°C 1', 60°C 30", 72°C 50", 72°C 5'	25
13 B	ATTTTACACCAACCCCC AGT					
LCBF1 ⁴⁷	GGTGTAGGTTTTAGTY TAGG	Citocromo b (<i>Cyt b</i>)	kADN maxicírculo	860	95°C 10', 94°C 1', 50°C 1'30", 72°C 1'30", 72°C 10'	35
LCBR2	CTACAATAAACAACAT AATATRCAATT					
TRY7SL ²⁴ For1.M13	GTAAAACGACGGCCAGT GCTCTGTAACCTTCGGG GGCT	7 SL ARN	Cromosoma	~250	95°C 5', 95°C 1', 66°C 1', 72°C 1', 72°C 3'	25
TRY7SL Rev1.M13	CAGGAAACAGCTATGAC GGCTGCTCCGTYNCCGG CCTGACCC					

Análisis de las secuencias. Los productos obtenidos de las secuencias “forward” y “reverse” de cada muestra fueron alineadas con la secuencia de referencia de *L. tarantolae* (Nº de Acceso GenBank AY781796.1) a través del programa BioEdit Sequence Alignment Editor²⁵. Se verificaron los electroferogramas de los sitios variables en las secuencias analizadas y se editaron las secuencias para obtener secuencias consenso. Se identificó el porcentaje de similitud con las secuencias depositadas en el banco de genes, para esto se utilizó el “nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)”, del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la página web www.ncbi.nlm.nih.gov.

Se elaboró un fichero de texto con las secuencias obtenidas del fragmento del gen 7SL ARN y las depositadas en el GenBank de las diferentes especies de *Leishmania*, *Crithidia* y de *T. brucei*, se utilizó el método CLUSTAL W para el múltiple alineamiento con el programa BioEdit. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 4²⁶.

RESULTADOS

Se realizó el cultivo axénico de los diferentes parásitos de *Leishmania sp.* y *Crithidia sp.* en laboratorios del IIFB, ambos géneros de parásitos fueron cultivados en

similares condiciones de crecimiento, obteniéndose a las 72 horas abundante cantidad de promastigotes y choanomastigotes de *Leishmania sp.* y *Crithidia sp.*, respectivamente. En el caso del cultivo de choanomastigotes de *Crithidia sp.* se observó una mejor adaptación al medio de cultivo. Al mismo tiempo se observó en los cultivos de *Crithidia* la formación de una fina película (biofilm), que no se presenta en los cultivos de *Leishmania*.

A los diferentes cultivos se aplicó el método de extracción de precipitado por salado y se obtuvo aproximadamente 300 µg/ml del material genético a partir de $\sim 10^6$ parásitos por mililitro de cultivo. Todas las cepas presentaron valores promedio de 1,7 del índice de pureza, sin embargo se excluyeron cuatro cepas del estudio provenientes del IBBA, debido a que los valores del índice de pureza de estas cepas no estaban dentro lo esperado, considerándose como material genético de pobre calidad. Se optimizaron los protocolos de la PCR para los diferentes marcadores 13A / 13B, *Cyt b* y 7SL RNA, obteniéndose los productos en los tamaños esperados de cada marcador (Figura 1), Posteriormente se evaluaron las distintas cepas de *Leishmania sp.* y de *Crithidia sp.* con cada uno de los diferentes marcadores, encontrándose que solamente el marcador del maxicírculo *Cyt b*, logró diferenciar al género *Leishmania sp.* de *Crithidia sp.* (Tabla 3).

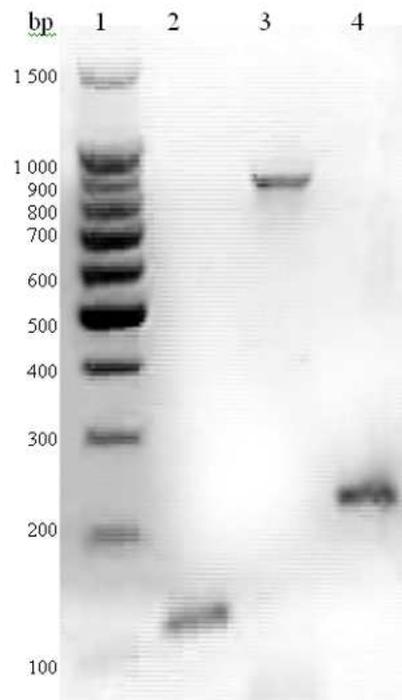


Figura 1: Electroforesis de los diferentes marcadores amplificados que se detallan a continuación: 1. Marcador de peso Molecular 100bp DNA ladder, 2 Marcador del minicírculo 13 A/13 B de 120 pb, 3 marcador del maxicírculo *Cyt b* de 860 pb, 4 marcador cromosómico 7SL ARN de ~ 250 pb.

Tabla 3. Resultados de la amplificación de los diferentes marcadores moleculares con las distintas cepas de *Leishmania* y *Crithidia*.

Cepas	13A/13B Minicírculo	Citocromo b Maxicírculo	7SL ARN Cromosoma
1	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
a	+	+	+
b	+	-	+
I	+	+	+
II	+	+	+
III	+	+	+
IV	+	+	+
V	+	+	+
VI	+	+	+

+ Presencia de banda - Ausencia de banda

Los productos secuenciados del fragmento 7SL ARN de las distintas cepas de *Leishmania* y de *Crithidia* fueron analizados con los programas descritos anteriormente, se encontró la diferenciación de los géneros, subgénero y se logró agrupar en los distintos complejos a los

parásitos estudiados. Es así que las secuencias de las cepas “I al VI, 1 y 4” presentaron una alta similitud (99%) con las especies del complejo *L. (V.) braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*) y la cepa “II” fue identificada como *L. guyanensis* (Figura 2).

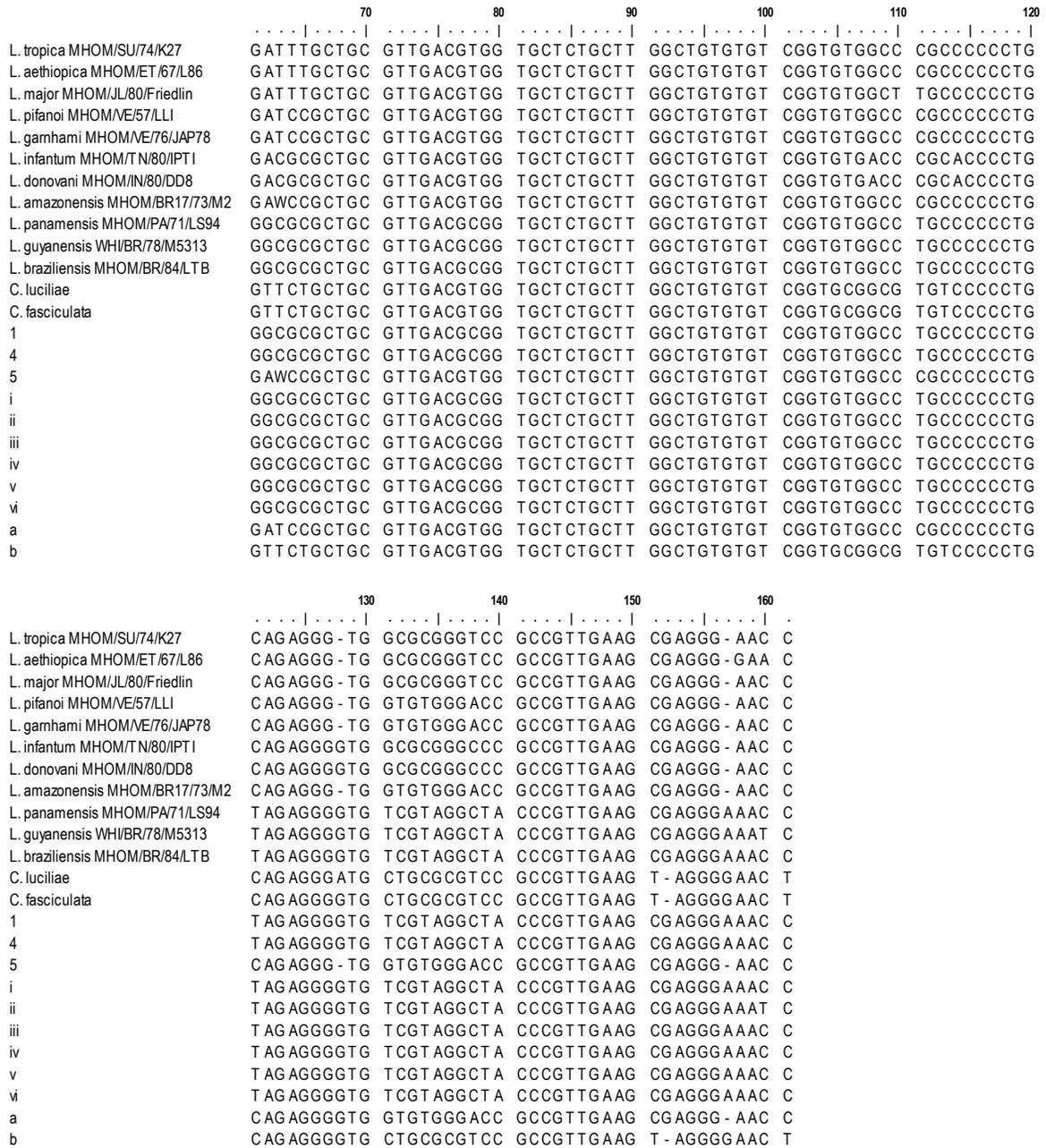


Figura 2. Alineamiento múltiple de las secuencias del segmento de 7SL ARN de las diferentes secuencias de las cepas analizadas y las secuencias obtenidas del GenBank-NCBI.

Las secuencias del segmento 7SL ARN pertenecientes a las cepas “a” y “5” presentaron semejanza con *L. amazonensis* y por lo tanto estas secuencias agruparon con las diferentes especies del sub-género *Leishmania* pertenecientes al complejo de *L. (L.) mexicana* (Figura 2). Con respecto a la cepa “b” la secuencia presentó un 99% de similitud con *Crithidia sp.* La presencia de dos especies *C. fasciculata* y *C. luciliae* en este género se diferencian entre estas por la variación nucleotídica en la posición 127; para *C. fasciculata* la presencia de una guanina (G), y una adenina (A) para *C. luciliae* en esa posición (Figura 2), la cepa “b” una semejanza con la especie de *C. fasciculata*. El polimorfismo de los nucleótidos del fragmento 7SL ARN está presente en distintas posiciones, estas variaciones nucleotídicas son

particulares para cada especie parasitaria; asimismo, en las posiciones 100 hasta la 150 existe mayor variación, aparentemente este sitio pertenece a un dominio de la molécula 7SL ARN²⁷, estas variaciones permitió la construcción del árbol filogenético (Figura 3), en donde, se observa la agruparon de los distintos complejos de *Leishmania*, género *Crithidia* y la diferenciación de algunas especies de cada complejo. La aplicación del método de secuenciación del segmento 7SL ARN, realizando la tipificación de 9 cepas aisladas a partir de úlceras cutáneas se observó que 5 de las 9 cepas agruparon en el complejo de *L. (V.) braziliensis* (mucocutánea) y el restante de las cepas (4 de 9) al complejo de *L. (L.) mexicana* (cutánea), ver Figura 3, encontrándose valores de similitud de 98 a 100%.

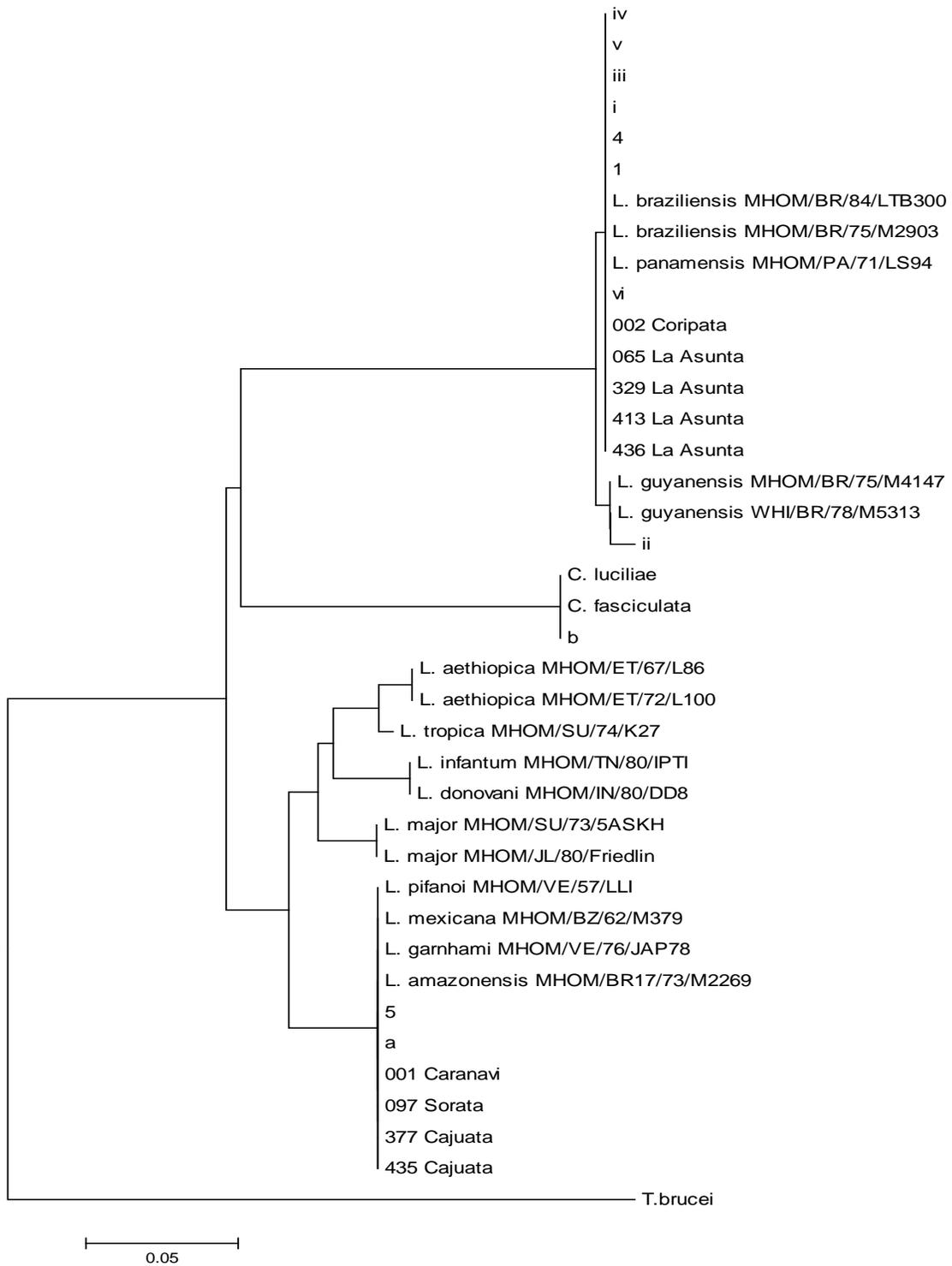


Figura 3. Árbol filogenético construido con las secuencias de las cepas analizadas y las obtenidas del GenBank-NCBI del segmento de 7SL ARN, con el método Neighbor-Joining y distancias evolutivas con el método de Kimura 2-parámetros, se utilizó como “outgroup” a *T. brucei*.

DISCUSIÓN

En el desarrollo del trabajo se realizó el cultivo de parásitos de choanostigotes de *Crithidia* y promastigotes de *Leishmania* en el medio de Shneider presentan similares morfologías, sin embargo se observaron diferencias entre estos parásitos, es así, *Crithidia sp* tiene la capacidad de realizar la formación de biofilm que se adhiere a la superficie de las cajas de cultivo²⁷, principalmente en los cultivos mantenidos por tiempos prolongados (más de 72 horas). Los parásitos del género *Crithidia sp.* son fáciles de cultivar, tienen un crecimiento acelerado, no es indispensable la utilización de suero en el medio de cultivo y no se requiere precauciones especiales de bioseguridad en el manipuleo en contraste a *Leishmania sp*^{9,28}.

Con respecto a la obtención del material genético la cantidad y calidad dependió de la conservación de las cepas, el factor tiempo y la forma de conservación de los microorganismos podrían influenciar en la obtención del material genético extraído, por otro lado es necesario considerar para una mejor identificación y/o caracterización de microorganismos patógenos la cantidad, calidad y tipo del material genético a analizar, genético del núcleo (cromosomal), del kinetoplasto (maxicírculo, minicírculos).

El análisis mediante la PCR de los distintos marcadores 13A/13B, *Cytb* y 7SL RNA, se encontró que solamente el marcador del maxicírculo *Cytb* logró diferenciar a nivel de género; aunque los cebadores 13A/13B son ampliamente utilizados para la identificación de *Leishmania* en muestras de pacientes, hospederos intermediarios y vectores en diferentes estudios^{13,29,30} que amplifican segmentos conservados de los minicírculos, se ha reportado la existencia de reacción cruzada con la región intergénica del cromosoma 8 de humanos (*Homo sapiens* NCBI-Nº Accession: AC026765)³¹. Por otro lado, el mecanismo de replicación y segregación a las células hijas de los minicírculos en el kinetoplasto es aleatorio, por lo tanto la nueva descendencia podría ser diferente una de otra³²; además no todos los segmentos de los minicírculos son útiles para la determinación por PCR debido al bajo número de copias de los mismos, lo que influiría en la identificación y caracterización de los parásitos aislados³³, el mantenimiento de cultivos a largo plazo constituiría uno de los principales factores que propician este tipo de variaciones y afecta también a la virulencia de *Leishmania*³⁴. Por otra parte es necesario indicar la similitud genética y fenotípica que presenta *Crithidia* con *Leishmania*^{35,36,37,38}, sobre todo en las secuencias de los minicírculos y podrían haber influenciado en el resultado obtenido por la PCR. Con respecto al análisis del marcador de maxicírculo *Cytb* de

Leishmania ha permitido constituir un potencial marcador para la identificación de este parásito y de otros no patógenos al humano, permite también la diferenciación intraespecie en el caso que se realice la secuenciación de este marcador^{39,40,41,42}, estableciéndose como un marcador útil para la identificación, diferenciación y análisis filogenético de *Leishmania sp*, no se encontró reacción cruzada con el material genético humano⁴³, no obstante, es importante considerar la heteroplasmia presente en el kinetoplasto del parásito^{44,45,46}.

Los productos amplificados del marcador cromosómico 7SL ARN en las cepas de *Leishmania sp.* y *Crithidia sp.* fueron sometidos a la secuenciación, la utilización de este marcador fue considerada para la identificación por secuenciación de *Leishmania sp.* por presentar abundante copias de este gen en el genoma del parásito, existen dominios conservados del 7SL RNA entre los componentes de los Trypanosomatidae, la similitud intra-especie de las secuencias (81 a 100%) permite identificar al parásito a nivel de género, distinguir los complejos y especies de *Leishmania*²⁴, la evaluación de las distintas cepas utilizadas en este estudio mediante la secuenciación permitió la identificación y la diferenciación de estas. Con relación a la identificación de las seis cepas (I al VI) concedidas por el Instituto de Enfermedades Tropicales Alexander von Humboldt de la Universidad Cayetano Heredia, Lima Perú, ellas fueron identificadas con los marcadores isomerasa manosa fosfato (MPI), cistein proteinasa B (CPB) y la proteína de choque térmico 70 (HSP70), se determinó que las cepas "I, V" y "VI" son *L. braziliensis*, las cepas "III" y "IV" son *L. peruviana* y la cepa "II" se trata de la especie *L. guyanensis*, de acuerdo las indicaciones realizadas por el Dr. Jorge Arevalo. Además se logró la caracterización de cepas a nivel de especie, sin embargo en las cepas "III" y "IV" identificadas como *L. peruviana* no fueron identificadas a este nivel, ya que en la base de datos del 7SL ARN no existe la secuencia particular de esta especie; en el segmento analizado de las cepas presentan similares secuencias entre las especies de *L. braziliensis* y *L. panamensis*, en la secuencia de *L. guyanensis* presenta una variación en la posición 160 de timina (T) por citosina (C) que es particular de esta especie.

La variación genética encontrada entre los complejos de *Leishmania* dificulta la identificación y diferenciación de las distintas especies patógenas de *Leishmania*. Estudios comparativos entre los genomas de *Leishmania* identificaron pocos genes específicos propios de algunas especies (*L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, aunque estas especies se han separando hace 15 a 50 millones de años). Por otro lado es necesario considerar la búsqueda de un marcador molecular permita analizar a los clones

de las poblaciones en una misma especie^{11,47}. Las poblaciones clonales del parásito esta relacionada con el tipo de reproducción de *Leishmania*⁴⁸, por otra parte, es importante el intercambio genético que sufren estos parásitos^{49,50}, el intercambio genético es crucial para la sobrevivencia del parásito. Los híbridos pueden permitir la adaptación a nuevos nichos ecológicos, vectores y hospederos incluyendo humanos y animales domésticos^{49,50}. La diversidad de las cepas en las distintas áreas geográficas refleja la plasticidad de estos parásitos al adaptarse a diferentes especies de vectores (o poblaciones de estos); la incorporación de marcadores moleculares robustos podría permitir mejorar la determinación de la diversidad genética de varias especies de *Leishmania* que circulan en la naturaleza^{51,52}.

La utilidad de métodos moleculares tiene mucha importancia en los estudios de epidemiología de esta enfermedad en Bolivia, por lo tanto es importante considerar la utilización de distintos métodos moleculares, además del uso de cepas no patógenas similares genéticamente a *Leishmania* para la evaluación de marcadores moleculares utilizados en la identificación y diferenciación de este parásito.

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos: UMSA-ASDI-SAREC: “Enfermedades Infecciosas”, UMSA/IDH-2009. “Desparasitación de Niños en Escuelas Rurales”, UMSA-ASDI 2009 “Valoración Química y Biológica de Extractos Acuáticos de la especie *Galipea longiflora*” y el proyecto AECI A/024457/09 de Francisco Bolás Fernández, (UCM) y Ma. Auxiliadora Dea “Control de la Leishmaniosis en Bolivia: Evaluación *in vitro* de la sensibilidad/resistencia de cepas autóctonas de *Leishmania spp.* a los tratamientos convencionales”, por parte del financiamiento. A las instituciones: IRD por ofrecer la beca para la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas de la UMSA. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA), la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (FCFB) de la UMSA y el Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Policía Boliviana por el apoyo en el uso del secuenciador de la FCFB.

REFERENCIAS

1. Dedet J P, Pratlong Fr, Lanotte G, Ravel C. The Parasite. Clin in Dermatology 1999;17:261–268.
2. Hide M B, Kamhawi S, Bras-Gon R, Sundar S and Bañuls A L. Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. Ency Infec Diseases 2007;87-123.
3. Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. Nature 2006;7: 294-305.
4. Volpini C, Marques M J, Lopes S S, Machado C G, Mayrink W and Romanha A J. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. European Soc Clin Microbiol Infec Diseases 2006;12(8):815–818.
5. Souza W de, Attias M, Rodrigues J C F. Review: Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). The Int J Biochem & Cel Biol. 2009; 41: 2069–2080.
6. Peacock C S, Seeger K, Harris D, Murphy, Ruiz Jeronimo C, Quail M A., Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream M A, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf S L., Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge D P., Oyola S O., Hilley J D, Brito L O, Tosi L R O, Barrell B, Cruz A K, Mottram J C, Smith D F & Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genetics 2007;39(7):839-847.
7. Vallejo G. Estudio comparativo entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico Molecular de la tripanosomiasis Americana. Actual. Biol1998;20(68):43-56.
8. Yurchenko V Y, Lukes J, Jirku M, Maslov. Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. Int J Syst and Evol Microbiol 2009;59:893-909.
9. Podlipaev Sergei A. Insect Trypanosomatids: the Need to Know More. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(4): 517-522.
10. Bañuls A.L., Hide M., Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. Int J Parasitol 1999; 29:1137-1147.
11. Criscione C, Poulin R and Blouin M. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. Mol Ecol 2005;14:2247-2257.
12. Morales M A., Cruz I, Rubio J M, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F and Alvar J. Relapses versus Reinfections in Patients Coinfected with *Leishmania infantum* and Human Immunodeficiency Virus Type 1. J Infec Diseases 2002; 185: 1533–7.
13. Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, El-Safi S, Almoustafa Al-Basheer A, Arévalo J, Miranda-Verástegui C, Leclipteux T, Mertens P, Dujardin J C, Herdewijn P and Büscher P. A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of *Leishmaniasis*. J Infec Diseases 2008;198:1565–72.
14. Paiva B R, Secundino N F C, Nascimento J C, Pimenta P.F.P., Galati E.A.B., Andrade J H.F., Malafrente R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Trop 2006;99:252–259.

15. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B and Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *J of Clin Microbiol* 1998;36(7):1989–1995.
16. Buck G, Berriman M, Donelson J, El-Sayed N, Kissinger J, Simpson L, Tait A, Teixeira M and Beverley S. Pathogenomics of Trypanosomatid parasites. White Paper 2007;1-33.
17. Spanakos G, Piperaki E T, Menounos P G., Tegos N, Fliemetakis A, Vakalis N C. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trop Med Hyg* 2008; 102:46-53.
18. Asgari Q, Hossein MM, Mehrabani D, Oryan A, Reza H G, Mohammad O S and Paykari H. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Southern Iran: A molecular, isoenzyme and morphologic approach. *J Res Med Sc* 2007; 12(1)7-15.
19. Castilho TM., Shaw J, Floeter-Winter LM. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol* 2003;41(2):540–546.
20. Chocholová E, Jirků M, Lukeš J. A diagnostic assay based on variable Intergenic Region distinguishes between *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. *Folia Parasitol* 2008;55:75–78.
21. Cárdenas OA. Análisis de los marcadores genéticos de minicírculos (13 A/13 B), maxicírculos (*Cyt B*) y cromosómico (7 SL ARN) para la identificación y diferenciación molecular de especies de *Leishmania spp.* a partir de cultivos *in vitro*. UMSA; 2011.
22. Sereno D, Semestre J. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis in vitro*. *Parasitol. Res.* 1997;83:401-403.
23. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Sym Ser* 1999; 41:95-98
24. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2009;24:1596-1599.
25. Zelazny AM, Fedorko DP, Neva LFA., et al. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania spp.* *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2005;72(4): 415–420
26. Oliveira LMF, Soares MJ, Souza W. Ultrastructure of the Adhesion of *Crithidia guilhermei* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to Plastic Coverslips: Formation of Fibrous Matrix Around the Cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92(4):549-552.
27. Calderón AO, Chinchilla M, Avendaño A, et al. Cinética multiplicativa de clones de *Crithidia fasciculata* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en un sistema de cultivo *in Vitro*. *Parásitol. Latinoam* 2006;61:32–36.
28. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, et al. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1435–1439.
29. Lachaud L, Marchegui HS, Chabbert E, et al. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40(1): 210–215
30. Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* Kinetoplast DNA and post-genome consideration in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2005;72(4):423–429.
31. Simpson L, Thiemann OH., Savilli N, et al. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2000;97(13):6986-6993.
32. Lambson B, Barker DC. Basic molecular tools: Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Trop Med Hyg* 2002;96:75-180.
33. Pandey K, Yanagi T, Dev PB, et al. Characterization of *Leishmania* isolates from Nepalese patients with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2007;100:1361–1369.
34. Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism (RNA editing/mitochondrial rRNA/Bodo caudatus/Trypanosomatidae). *Proc. Natl. Acad. Sci* 1993;90:11608-11612.
35. Moreira D, López G, Vickerman K. An update view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Sys Evol Microbiol* 2004;54:1861-1875.
36. Maslov DA, Podlipaev SA, Luke J. Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(3):397-402.
37. Stothard JR. Future Trypanosomatid Phylogenies: Refined Homologies, Supertrees and Networks. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95(4):523-526.
38. Marco JD, Uezato H, Mimori T, et al. Are cytochrome b gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus Enzyme Electrophoresis for identifying *Leishmania spp.* From Argentina?. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):256–260.
39. Luyo AG, Uezato H, Oshiro M, et al. Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitol* 2004; 128: 483–491.
40. Foulet F, Botterel F, Buffet P, et al. Detection and Identification of *Leishmania* Species from Clinical Specimens by Using a Real-Time PCR Assay and Sequencing of the Cytochrome b Gene. *J Clin Microbiol* 2007;45(7):2110–2115.
41. Asato Y, Oshiro M, Kaung MC, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol* 2009;121:352–361.
42. Myint CK, Asato Y, Yamamoto Y, et al. Polymorphisms of cytochrome b gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis in Pakistan. *Jap Dermatol Ass* 2008;35:76-85.
43. Flegontov PN, Strelkova MV, Kolesnikov AA. The *Leishmania major* maxicircle divergent region is variable in different isolates and cell types. *Mole & Bioch Parásitol* 2006;146:173–179.
44. Flegontov PN, Zhirenkina EN, Gerasimova ES, et al. Selective amplification of maxicircle classes during the life cycle of *Leishmania major*. *Mol & Bioch Parásitol* 2009;165:142–152.

45. Lynn MA, McMaster WR. Leishmania: conserved evolution – diverse diseases. *Trends Parasitol* 2008;24:103-105.
 46. Rougeron V, DeMeeus T, Hide M, Etienne W, et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *PNAS* 2009;106(25):1024-1029.
 47. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, et al. Demonstration of Genetic Exchange During Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. *Science* 2009;324:265-268.
 48. Hide M, Bañuls AL. Species-specific PCR assay for *L. infantum/L. donovani* discrimination. *Act Tropica* 2006;100:241–245.
 49. Miles MA, Yeo M, Mauricio IL. *Leishmania* Exploit Sex. *Science* 2009;324:187-188.
 50. Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, et al. *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. *BMC Infect Diseases* 2006;6:1-9.
 51. Rodríguez GI, Marín C, Vargas F, Córdova O, et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Exp Parasitol* 2006;112:44–51.
 52. Cupolillo E, Regina BL, Toaldo CB, et al. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3126–3132.
-