

## Técnicas de caracterización de *Leishmania spp* y su aporte en la leishmaniasis.

Doménica Carolina Cannova.

### RESUMEN

La combinación de técnicas de análisis fenotípicos y genotípicos, donde se incluyen técnicas de análisis isoenzimáticos y las de biología molecular, ha permitido avanzar en uno de los aspectos más complejos en el estudio de la etiología de las leishmaniasis, como lo es la clasificación del parásito causante de esta enfermedad. Gracias a la comprensión y estudios de aspectos epidemiológicos, bioquímicos y biología molecular de la *Leishmania* la aplicación y análisis de estas técnicas ha sido de gran utilidad en la interpretación de los cambios en el comportamiento epidemiológico del parásito, así como en un correcto diagnóstico, pronóstico, selección adecuada de tratamiento, y medidas de control y prevención eficaz.

**Palabras clave:** *Leishmania*, Leishmaniasis, caracterización, técnicas, biología molecular.

### ABSTRACT

#### Techniques of characterization of *Leishmania spp* and their contribution to studying the etiology of Leishmaniasis.

The combination of phenotypic and genotypic analysis techniques, which include isoenzymatic and molecular biology analysis techniques, has led to the advance of one of the most complex aspects in the study of the etiology of leishmaniasis, which is classifying the disease-causing parasite. Thanks to the understanding and study of the epidemiological, biochemical and molecular biology of the *Leishmania*, implementation and analysis of these techniques have been very useful for the interpretation of changes in the epidemiological behavior of the parasite, as well as for a correct diagnosis, prognosis, selection of appropriate treatment and control measures, and effective prevention.

**Key words:** *Leishmania*, Leishmaniasis, characterization, techniques, molecular biology.

### INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son causadas por protozoarios flagelados del género *Leishmania* parásitos intracelulares obligados que infectan macrófagos de una amplia variedad de hospedadores mamíferos, entre ellos el hombre. En el humano causan un amplio espectro de enfermedades denominada leishmaniasis. Dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada en la infección y la respuesta inmunológica del hospedador, puede

cursar como entidades clínicas diferentes, que incluyen la forma cutánea (leishmaniasis cutánea) o la forma visceral (leishmaniasis visceral), esta última puede ser fatal especialmente en casos no tratados (1). De ahí que, la identificación del agente causal de la leishmaniasis es de vital importancia en la clínica y estudios epidemiológicos con la finalidad de realizar un correcto pronóstico, seleccionar el tratamiento adecuado e implantar medidas de control y prevención eficaz.

La clasificación de *Leishmania*, ha sido uno de los aspectos más complejos en el estudio de la etiología de esta protozosis, debido a la diversidad fenotípica y polimorfismo genético encontrado entre las especies del parásito (2). Adicionalmente, la complejidad epidemiológica de algunas áreas endémicas, con una distribución muy heterogénea de parásitos, la posibilidad de que los ciclos de transmisión de las diferentes especies se superpongan y varias especies pueden encontrarse en un mismo foco, estrechamente relacionado con desplazamiento de poblaciones humanas, pueden llevar a la dispersión de *Leishmania* más allá de su distribución ecológica tradicional.

Las primeras clasificaciones de las especies de *Leishmania* se basaron en diferentes criterios tales como, el patrón clínico de la enfermedad, la distribución geográfica, especies de reservorios, comportamiento en hámsters y en cultivo (3). Otro criterio biológico de diferenciación utilizado es la localización del desarrollo experimental de las promastigotas en el tubo digestivo de los flebótomos. *L. mexicana* (subgénero *Leishmania*) se ubica en región Suprapilaria", en cambio *L. braziliensis* y *L. peruviana* (subgénero *Viannia*) "región Peripilaria" (3). Sin embargo, la variación producida por estos criterios conllevó a la búsqueda de otros más uniformes, desarrollándose métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares que permiten obtener marcadores taxonómicos más precisos que se basan en las características intrínsecas de estos parásitos (4).

#### Técnica de caracterización por patrones Isoenzimáticos (Zimodemos).

Surge luego del descubrimiento de la electroforesis y de los métodos de coloración histoquímica, a mediados de los años 50, lo que permitió el descubrimiento de las isoenzimas, es decir enzimas con la misma función pero que presentan diferente movilidad cuando se someten a un campo eléctrico.

**Fundamento:** Se basa en que las diferencias de movilidad de las enzimas (isoenzima), están representadas en la secuencia de ADN y por tanto en su expresión proteica. Consiste en identificar patrones de enzimas mediante la separación en gel por electroforesis y posteriormente su visualización con reacciones de tinción apropiada. Finalmente se comparan con los patrones de los aislados de referencia para así identificarlos y caracterizarlos por zimodemos. Estas bandas pueden ser analizadas numéricamente mediante métodos estadísticos apropiados lo que permite observar la variabilidad de acuerdo a diferentes alelos o frecuencias genotípicas de loci que presentan distintos aislados de parásitos, lo cual ha sido un aporte importante en estudios taxonómicos (4).

Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Medicina. Departamento de Parasitología. Laboratorio de Leishmaniasis. Valencia, Edo. Carabobo. Venezuela.

**Correspondencia:** Doménica Carolina Cannova.

**E-mail:** dcannova@gmail.com y/o dcannova@uc.edu.ve

### Aportes en la caracterización de aislados de *Leishmania spp* mediante el análisis de Zimodemos.

Numerosos han sido los aportes en la caracterización de aislados de *Leishmania*, una de las primeras informaciones acerca de la ploidía de *Leishmania* fue gracias al análisis enzimático. Por otra parte, tanto en el Viejo Mundo como el Nuevo Mundo, se propone una nueva clasificación del género *Leishmania*, basado en el perfil enzimático lo que ha permitido elaborar un árbol filogenético que incluye los complejos relacionados fenotípicamente (5). Autores, mediante el uso de zimodemos han diferenciado aislados de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (6). Del subgénero *Viannia*, han detallado el papel que juegan los reservorios y sus vectores, mediante el aislado de los parásitos y su tipificación por zimodemos (7). En el Viejo Mundo, se logró separar *L. tropica* de *L. major*, por el análisis de zimodemos (8). Gran número de muestras de *Leishmania* del Nuevo Mundo se evaluaron mediante éste método, logrando agruparlas en 68 zimodemos (4). Al realizar el análisis numérico usando métodos fenotípicos y filogenéticos, se demostró que la clasificación propuesta por Lainson & Shaw, de subgénero *Viannia* y *Leishmania* representa un esquema válido, siendo agrupados los parásitos en 5 complejos fenotípicos, *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. guyanensis/L. panamensis/L. shawi*, *L. mexicana*, *L. major*, además de *L. chagasi*, causante de leishmaniasis visceral (LV) o Kalazar, en un único zimodemo más cercano a *L. major* que a otras especies de *Leishmania* (4).

La afinidad de *L. chagasi*, con *L. infantum* fue estudiada mediante la caracterizaron 10 aislados de LV mediante 15 sistemas enzimáticos y no encontraron diferencias entre ellas (9). Otros autores constataron que aislados de *L. chagasi* son de reciente introducción en América y que es similar a *L. infantum*, sugiriendo que fue una especie importada, apoyando la hipótesis de que *L. (L.) infantum* fue introducida por los perros de los conquistadores (10,11). Asimismo, verificaron que especies del subgénero *Viannia* son un grupo originario del Nuevo Mundo (10). Estudios realizados en Brasil, Guatemala, Guayana Francesa, Ecuador, Colombia, Panamá Perú Bolivia y Nicaragua han permitido evaluar el papel de reservorios y vectores en asociación con las especies americanas (12, 13, 14, 15). Han sido numerosos los estudios realizados en Brasil con el objeto de caracterizar aislados de leishmanias y corroborar la diversidad de aislados tanto entre regiones geográficas como dentro de una misma especie; ejemplo de ello es la variabilidad encontrada en *L. (V.) braziliensis* aisladas) de militares entrenados en el estado de Pernambuco, las cuales al ser comparada con la cepa de referencia zimodemo I, ésta presentó una variante por lo que se incorporó en un grupo aparte que denominaron zimodemo IOC-105 (16).

En Colombia, 76 *Leishmania* aisladas de humanos, perros y flebotomos fueron analizadas por patrones isoenzimáticos revelando la existencia de 16 zimodemos, divididos en cuatro complejos filogenéticos: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis/ panamensis* y *L. infantum*. Tres zimodemos se incluyen en el subgénero *Leishmania* y el otro en del subgénero *Viannia* (17).

La caracterización isoenzimática ha sido de gran importancia en la identificación de zimodemos asociados, tanto con la región geográfica como con las manifestaciones clínicas que se presentan. Estudios realizados en el Viejo Mundo, han evidenciado variantes enzimáticas asociadas a diferentes áreas geográficas (18, 19, 20).

En Venezuela, mediante el análisis enzimático junto con otros criterios clínicos, bioquímicos y biológicos se logró describir la especie *L. (L.) venezuelensis* (21). Así como en Colombia, Panamá y Venezuela: *L. (V.) colombiensis* (22, 23) y *L. (V.) equatorensis* sp., en Ecuador (24).

En relación a la caracterización de aislados de *L. infantum*, en el Mediterráneo se ha logrado describir 29 zimodemos de los cuales 25 han sido encontrados en humanos, destacándose la asociación de la forma clínica con la diferenciación de zimodemos, si se trata de pacientes inmunocompetentes o inmunosuprimidos. Estos estudios muestran a los zimodemos MON-27, MON-28, MON-77 y MON-187 como responsables de producir únicamente LV y los MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-78, MON-111 de leishmaniasis cutánea (LC). Otros zimodemos, sin embargo, se han involucrado tanto con LV como LC (MON-1, MON-34, MON-80 y MON-190), así como la coexistencia de dos zimodemos en el mismo hospedador humano, como MON-1 y MON-34, en un enfermo coinfectado con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (1).

La caracterización de cepas aisladas de pacientes inmunocompetentes han revelado que el zimodemo MON-1 es responsable del 90% de los casos de LV y del 20% de LC; otros zimodemos como el MON-27, MON-72, MON-111, MON-187 y MON-189, aparecen esporádicamente en sujetos inmunocompetentes y todavía no se han descrito en pacientes coinfectados con el VIH (25). En Venezuela, se han logrado caracterizar mediante análisis enzimáticos, *L. infantum* zimodemo MON-1 tanto en el estado Trujillo, como en Nueva Esparta, lo cual evidencia la amplia distribución de este zimodemo en el país (26,27).

A pesar de que el análisis por isoenzimas ha dado importantes aportes taxonómicos, en relación con la distribución geográfica, tipo de reservorio y hospedadores, el método tiene limitaciones, entre ellas el insuficiente crecimiento de parásitos en cultivo (propio de las características de algunos aislados) lo laborioso, gran consumo de tiempo y altos costos, lo cual lo hace poco factible en estudios a gran escala. Adicionalmente, se ha observado que no siempre permite discriminar la correlación entre la forma clínica, la preferencia entre hospedadores (28).

### Técnicas basadas en el Análisis de ADN del Parásito.

Con el propósito de mejorar el poder discriminatorio de los métodos convencionales de tipificación, se han desarrollado los métodos de biología molecular. Estos tienen como ventaja que actúan sobre las porciones invariables de ADN del parásito, independiente de los cambios morfológicos del protozoo en su ciclo de vida, así como de la respuesta inmune del hospedador, pudiéndose detectar tanto en infecciones activas como en las oligosintomáticas o asintomáticas. Estas técnicas se pueden clasificar en tres grandes grupos: a) Hibridación con sondas de ADN, b) Análisis del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes.

**Hibridación con sondas de ADN:** todos los ensayos de hibridación se basan en la gran especificidad de la interacción entre las bases complementarias. Para que la hibridación permita identificar en un genoma u otra muestra cualquiera de ácido nucleico, una secuencia particular, se requiere dos elementos básicos: a) la presencia de la secuencia diana en uno de los fragmentos, generalmente obtenidas con enzimas de restricción de la muestra de ácido nucleico. b) un fragmento

corto de ácido nucleico, llamada sonda, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana, marcado de forma que permita su detección (radiactivo, coloreado, fluorescente) (29). Para la caracterización de *Leishmania*, una de las regiones más utilizadas para la hibridación con sondas de ADN, ha sido la de los minicírculos del ADN del kinetoplasto (ADNk), por presentar secuencias conservadas y repetidas. Se ha podido identificar que los minicírculos del ADNk, en muchas especies de *Leishmania* posee un 80% de regiones conservadas constituida por cuatro o menos familias de minicírculos, es decir que cada familia de minicírculo está representada por más de 1000 copias, con unos 600 pb los cuales pueden servir como secuencias dianas (30).

**Fundamento:** Se basa en la mezcla sencilla de ácidos nucleicos muestra o diana no marcado, con una sonda de secuencia conocida, marcada, bajo condiciones experimentales que permitan el apareamiento entre bases complementarias. Si la sonda o el ADN diana son de doble hebra, han de ser previamente desnaturalizados, generalmente por calor o por tratamiento alcalino. Una vez mezcladas, se permite la renaturalización en la cual, se pueden formar híbridos entre la sonda y la diana. Posteriormente se detectan los híbridos formados mediante métodos apropiados (29).

#### **Aportes en la caracterización de aislados *Leishmania* spp., mediante el uso de hibridación con sondas de ADN.**

En la clasificación de *Leishmania*, este método ha permitido separar *L. braziliensis* de *L. mexicana*, lográndose incluir dentro del subgénero *Viannia* las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (31). Aunque en menor proporción, también se han caracterizado aislados de *Leishmania* mediante sondas de ADN genómico (ADNg), seleccionándose clones a partir de genotecas de ADNg y ADN complementario (ADNc) con fines diagnóstico y taxonómico; concretamente la sonda pDK20 para la diferenciación entre *L. donovani* y *L. infantum*, y la sonda Lbj38 para *L. brasiliensis* en el Nuevo Mundo (32, 33, 34). Adicionalmente, se destaca la sonda del 7-059 la cual permitió diferenciar *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) donovani/L. (L.) infantum*. La aplicación de esta misma sonda permitió en España, identificar *L. (L.) infantum* como responsable de un caso de leishmaniasis mucocutánea y a *L. major* como causante de leishmaniasis mucocutánea difusa en Sudán (35, 36). En la India se logró demostrar el polimorfismo entre aislados de *Leishmania donovani* que causa LV con los que causan Leishmaniasis dérmica post-kalazar (LDPK), con el uso la sonda LdP13 que corresponde al gen de la subunidad 28S de ARNr de un aislado de *L. donovani* (37).

**Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).** La forma más directa de detectar polimorfismo es la secuenciación del ADN, pero por costo y disponibilidad, se suele acudir a otras técnicas entre las que se encuentra, el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), donde intervienen enzimas de restricción las cuales presentan una gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta (de 4 a 6 nucleótidos) de ADN duplex y la consiguiente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas del ADN llamado sitios de restricción. La cantidad de bandas (patrones) que puedan aparecer entre las especies e incluso dentro de la misma especie podrían indicar la proximidad o lejanía filogenética entre las cepas en estudio (29).

**Fundamento:** se basa en la detección de variaciones de la secuencia de ADN (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción (29).

#### **Aportes en la caracterización de aislados de *Leishmania* spp. mediante uso de RFLP.**

En los tripanosomátidos en general, y en *Leishmania* en particular, la técnica se ha venido realizando digiriendo el ADNk previamente separado del ADNg y los patrones de fragmentos obtenidos se denominan esquizodemos, útiles en estudios de caracterización del parásito. A través de zimodemos y esquizodemos en aislados de *Leishmania* procedentes de pacientes y perros con leishmaniasis cutánea (LC) y visceral (LV) de diferentes áreas endémicas en Brasil, los aislados del foco de LC de Rio de Janeiro fueron identificados como *L. braziliensis braziliensis* y el de LV como *L. donovani*, al realizar los análisis de zimodemos y esquizodemos se verificó que los aislados de LC eran idénticos a los de otro foco (Jacarepaguá y, en relación a los aislados de LV que la misma cepa del parásito circulaba tanto en la población humana como en la canina (38).

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes:**

la técnica de reacción en cadena de la polimerasa es una amplificación *in vitro* del ADN, considerada hoy en día una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética. El objetivo es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirecta, de un ARN. Tiene muchas ventajas, entre ellas, el que no es necesario purificar previamente la muestra original, se puede utilizar homogenatos, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos a ADN, etc. Si embargo, a excepción de PCR-RAPD, el requisito indispensable para desarrollar la técnica es conocer la secuencia de la región de ADN (o ARN) de interés para amplificar.

La PCR tiene dos objetivos fundamentales: a) la amplificación propiamente dicha, para disponer de cantidad suficiente como para utilizarlo, con distintos fines; b) para detectar en muestras con pequeñas cantidades del ADN una secuencia específica o diana. **Fundamento** La amplificación de un fragmento de ADN hasta obtener millones de copias del mismo, utilizando una enzima polimerasa termoestable, generalmente es usada la *Taq* polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, pero también la *Tth*, aislada de *Thermus thermophilus*. Esta técnica está basada fundamentalmente, en las siguientes propiedades de los ácidos nucleico: desnaturalización, hibridación específica y replicación de la hebra sencilla por una ADN polimerasa (29). La técnica PCR directa presenta una alta sensibilidad, sin embargo, con el propósito de mejorarla cada vez más han surgido variantes de la misma, tales como: la Hot-start-PCR, (de comienzo en caliente); L-PCR (PCR larga); PCR anidada; PCR semianidada; PCR múltiple; PCR hibridación; PCR-RAPD, PCR-RFLP, PCR en tiempo real; entre otras. A continuación se describirán, brevemente, sólo algunas de estas variantes, que han sido utilizadas en la identificación y caracterización de aislados de *Leishmania* (29).

#### **Aportes en la caracterización de aislados de *Leishmania* spp., mediante uso de PCR y sus variantes:**

han sido numerosos los cebadores (primer) complementarios de dianas que caracterizan las distintas especies de leishmanias, una de las secuencias más utilizadas son las regiones minisatélites del ADNg, de ADN no codificantes. En *Leishmania* se han desarrollado marcadores específicos de secuencias

microsatélites; 13 fueron diseñados para *L. major*, 16 para *L. trópica* y 20 para *L. donovani*, así como, 11 marcadores de microsatélites independientes diseñados para *L. infantum*, encontrándose polimorfismo entre las especies e intraespecies de *L. infantum* MON-1. Adicionalmente, se ha podido relacionar la variación o polimorfismo de estas secuencias con el área geográfica de procedencia y detectar infección natural en el vector (28, 39, 40).

Una de las primeras variantes que se utilizó en estudios de genotipificación de *Leishmania* fue la PCR-Hibridación. Con la aplicación de esta técnica se logró distinguir entre los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, esto es un gran aporte para el pronóstico de la enfermedad, ya que se podrá distinguir entre los aislados que sólo causan lesiones cutáneas y los que tiene afinidad por las mucosas (41).

La PCR múltiple también ha sido utilizada para la identificación y caracterización de diferentes especies de *Leishmania* en un solo paso, obteniéndose distintos tamaños de producto amplificado lo cual se asocia con las especies involucradas. La diana más utilizada en esta técnica son las de mini-exon, la cual es una secuencia de 25 a 39 nucleótidos añadido post-transcripcionalmente ("trans-splicing"), al extremo 5' de los ARNs mensajeros de todos los tripanosomatídeos. Los genes nucleares que portan el mini-exón están organizados en tándem de 200-250 pb separados por regiones intergénicas con secuencias altamente conservadas. La amplificación de estas regiones de *L. donovani* mediante PCR ha permitido elaborar sondas y cebadores específicos de especies. Se logró así detectar esta especie de *Leishmania* como agente etiológico de leishmaniasis dérmica post-kalazar. De igual manera, diferenciar las especies más frecuentes en el Nuevo Mundo: *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. chagasi* (42). Por otra parte, ha sido muy útil la identificación de aislados que infectan naturalmente vectores en distintas regiones. En estudios realizados en el Estado Sucre, Venezuela, se logró comprobar la infección natural de *Lutzomyia ovallesi* y *L. gomezi* con cepas del subgénero *Viannia* y *Leishmania*, circulando ambas en una misma localidad, además este trabajo permitió sugerir que *L. gomezi* puede ser un vector importante en la transmisión en esa área endémica mediante el empleo de PCR múltiple con cebadores de secuencias del mini-exón (43). Así mismo, al evaluar una secuencia del gen de  $\beta$  tubulina ( $\beta$ 500) y otra nuclear de 280 pb (L280) de *Leishmania*, como marcadores moleculares para diagnóstico de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, utilizando PCR-múltiple, se demostró alta sensibilidad-especificidad y su potencial en estudios epidemiológicos (44).

Con el objeto de mejorar cada vez más la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR-ADNk, se incorporaron las enzimas de restricción luego de la amplificación, de esta forma se evalúa el polimorfismo de los fragmentos originado post-amplificación (PCR-RFLP).

Para obtener la clasificación de las especies y su polimorfismo tanto inter como intraespecíficos, se han utilizado secuencias de regiones intergénicas de la subunidad pequeña del ARNr, que ha dado excelentes resultados en la caracterización de *Leishmania* en el Nuevo y Viejo Mundo, a nivel de reservorios como en la evaluación de la diversidad intraespecífica de aislados del vector (45, 46).

Otro tipo de análisis es el uso de PCR-Nested (anidada), en la cual se busca amplificar con cebadores específicos para las regiones intergénicas de gen de la subunidad pequeña del

ARNr, en una primera PCR, pero se aumenta su especificidad al realizar una segunda PCR para amplificar el producto de la primera PCR con cebadores internos de esta región, esto se ha hecho para identificar y clasificar *L. infantum* además de permitir realizar diagnóstico precozmente (47). La variante de la PCR-RAPD, tiene la ventaja de no requerir conocimiento de la región que se desea amplificar, sencillamente se diseñan primer cortos (10-12 pb) de manera aleatoria; los patrones de banda han sido muy útiles en la identificación de la variedad inter e intra especie del *Leishmania*, demostrándose en numerosos estudios este polimorfismo en *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. shawi*, *L. colombiensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, muchos de estos estudios han sido orientados para correlacionar el polimorfismo genético con el origen geográfico y las formas clínicas de la enfermedad (48). Investigadores venezolanos, analizaron 9 aislados procedentes de pacientes con LC y LV, identificando como agente causal a *L. colombiensis*. Al utilizar PCR-RAPD mostraron dos grupos genéticamente separados, uno con aislados de pacientes de LV y otro de LC. Esto demostró la correlación entre el polimorfismo genético y las formas clínicas de la enfermedad (49). También esta técnica ha sido utilizada para mostrar variabilidad de los aislados de *L. infantum* en inmunocompetentes e inmunocomprometidos (pacientes con VIH) en el Mediterráneo (30).

En conclusión se puede señalar que los protozoarios del género *Leishmania* presentan una alta variedad de especies las cuales poseen características bioquímicas y moleculares que permiten caracterizarlas desde el punto de vista fenotípico y genotípico. Hoy día se cuenta con múltiples técnicas y análisis que pueden ser empleadas para la identificación y clasificación taxonómica de *Leishmania* spp, así como su relación con las áreas geográficas y la presentación clínica de la enfermedad. Estas técnicas van siendo cada vez más específicas y sensibles gracias a la comprensión y estudio de la biología molecular del parásito y a la combinación de varias técnicas de análisis que permiten la optimización de su empleo. Se ha demostrado que los aislados de *Leishmania* tanto las del Viejo Mundo como del Nuevo Mundo presentan un alto grado de polimorfismo inter e intra específico. Esto expresa que la plasticidad del genoma de *Leishmania* puede deberse al reagrupamiento de cromosomas y/o a la respuesta evolutiva y adaptativa que los organismos vivos presentan con el objetivo de preservar la especie.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alvar J., Cañavate C., Gutiérrez-Solar B., Jiménez M. Laguna F., López-Vélez R., et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:298-39.
2. Zemanova E., Jirku M., Mauricio IL, Miles MA., Lukes J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70:613-7.
3. Lainson R. and Shaw J.J.,. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis en W.H.R. Lumsden and D.A.Evans (eds) *biology of Kinetoplastida.* London:academic Press. 1979; p. 1-120.
4. Cupolillo E., Momen H., Grimaldi G Jr., Genetic diversity in natural populations of new world *Leshmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:663-668.
5. Rioux JA., Lanotte G., Serres E., Pratloug F., Bastein P. & Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65:111-125.

6. Miles, M.A., Povoia, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., and Shaw, J.J. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980; 74: 243-252.
7. Evans DA., Lanham SM., Baldwin CI. & Peters W. The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous Leishmaniasis acquired in Belize. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78:35-42.
8. Aljeboori TI., and Evans DA.. *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoresis isoenzyme patterns II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74:178-184.
9. Moreno G, Rioux J-A, Lanotte G, Pratlong F, Serres E Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In *Coll Int CNRS/INSERM 1984, Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier. 1986; p. 105-117.
10. Momen H., Pacheco RS., Cupolillo E, Grimaldi Jr G.. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. *Biol Res* 1993; 26:249-55.
11. Killick-Kendric R., Rioux JA., Lanotte G. Leany AI.. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1980; 74:563-565.
12. Braga RR., Lainson R., Shaw JJ., Ryan L Silveira FF. Leishmaniasis in Brazil: XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dog, and the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80:143-145.
13. Desjeux P. & Dedet JP. Isoenzyme characterization of 112 *Leishmania* isolates from French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83:610-612.
14. Chouicha NG., Lanotte G., Pratlong F., Cuba CA., Velez ID. & Dedet JP.. Phylogenetic taxonomy of *Leishmania (Viannia) braziliensis* based on isoenzymatic study of 137 isolates. *Parasitol.* 1997;115: 343-348.
15. Calvopina M., Armijos RX., D Marco J., Uezato H., Kato H., Gomez EA., et al., *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation *BMC Infect Dis.* 2006; 6:139-147.
16. Andrade MS., Brito MEF., Thomaz S., Lima B., Almeida EL., Albuquerque EL., et al. Leishmanioses tegumentaria americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, en área de treinamento militar na zona de Mata de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38:229-233.
17. Thomaz-Soccol V., Velez ID., Pratlong F., Agudelos S., Lanotte G & Rioux JA. Enzymatic polymorphism and phylogenetic relationships in *Leishmania* Ross, 1903 (*Sarcomastigophora*: Kinetoplastida): a case study in Colombia. *Syst Parasitol* 2000; 46:59-68.
18. Le Blancq SM., Schnur LF., Schlein Y An Apparent *Leishmania* association of enzyme variants of *Leishmania major* with specific geographical areas in Israel. *Bull Soc Pathol Exotique.* 1983; 76:543-548.
19. Garin JP., Peyramond D., Piens MA., Rioux JA., Godfreys DG., Lanotte G. et al. Presence de *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor 1914 au Mali. Identifications enzymatique d'une souche d'origine humaine. *Ann Parasitol Human Comp* 1985; 60: 93-94.
20. Izri M.A, Belazzoug S., Pratlong F., Rioux J.A. Isolement de *Leishmania major* chez *Phlebotomus papatasi* Briska (Algérie) fin d'une épopée écoépidémiologique. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée.* 1992;67:31-32.
21. Bonfante-Garrido, R.. New subspecies of *Leishmaniasis* isolate in Venezuela Xth international congress of Tropical Medicine and Malaria. Manila. 1980; p.203.
22. Kreuzer RD., Corredor A., Grimaldi Jr. G., Grogl M., Rowton ED., Young DG., et al. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals and *Phlebotomine* sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:662-6765.
23. Delgado O., Castés M., White AC., Kreuzer RD.. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:145-147.
24. Grimaldi GJ., Kreuzer RP., Hashiguchi Y., Gomez EA., Mimory T., Tesh RB. Description of *Leishmania equatoriensis* sp. N. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87:221-228.
25. Gallego M., Pratlong F., Riera C., Muñoz C., Ribera E., FISA R., et al., Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Caralonia (Spain). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: 45-47.
26. Moreno G., Scorza JV., Añez N. *Leishmania infantum* en el estado Trujillo, Venezuela. *Acta Cient Venez* 1990; 41:27.
27. Zerpa O., Pratlong F., Ulrich M., Convit J. Isolation of *Leishmania infantum*, Zymodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:901-902.
28. Bulle B., Millon L., Bart JM., Gállego M., Gambarelli F., Portús M., et al., Practical approach for typing strain of *Leishmania infantum* microsatellite analysis. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 3391-3397.
29. Luque J & Herráez A. Clonación acelular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería genética. Ediciones Harcourt, S.A Primera edición., Madrid España. 2005; 186-196 469 pp.
30. Jiménez MI. Variabilidad de *Leishmania (Leishmania) infantum* en España. Tesis Doctoral. 1994; p.226 [www.ucm.es/eprints/view/creators/Morales\\_Hern=E1ndez\\_Miguel\\_C1ngel.html](http://www.ucm.es/eprints/view/creators/Morales_Hern=E1ndez_Miguel_C1ngel.html) Consultada: 15/05/2007.
31. Morales MA., Epidemiología molecular de la co-infección con *Leishmania* y HIV Tesis Doctoral. 2002; p.115. Disponible: [www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26238.pdf](http://www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26238.pdf) consultado: 16/05/2007.

32. Lanotte G., Rioux JN., Maazoun R., Pasteur N., Pratloug F., Lepar J. Application de la méthode numérique a la taxonomie du genre *Leishmania* Ross, 1903; a propos de 146 souches originaire de l'ancien Monde utilisation du alezymes. Corollaires epidemiologiques et phylétiques. Ann Parasitol Humanie et Comparee 1981; 56:575-592.
33. Van Eys, G.J., Guizani, I., Ligthart, G.S., & Dellagi, K. A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. Exp. Parasitol. 1991;72:459-463.
34. Rodríguez N., De Lima H., Rodríguez A., Brewster & Baker DC. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellite. Parasitol 1997;115:349-358.
35. Alvar J., Ballesteros JA., Soler R., Benito A., Van Eys GJJM., Schonone GJ. & Caher B. Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. Am J. Trop Med Hyg 1990;43:614-618.
36. Abdel-Hameed AA., Ahmed BO., Mohamedani AA., El-Harith A., Van Eys 1990. A case of diffuse cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania major*. Trans R Soc Trop Med Hyg 84:535-536.
37. Sreenivas G., Raju S., Singh R., Selvapandiyam A., Duncan R., Sarkar Nakhasi, et al. DNA polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmania donovani* that cause kalaazar from those that cause kalaazar dermal leishmaniasis in humans. J Clin Microbiol 2004;42:1739-1741.
38. Lopes VG., Momen H., Grimaldi G. Marzochi CA. Pacheco KS., Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. J Parsitol 1984;70:89-98.
39. Ochsenreither S., Kuhls K., Schaar M., Presber W. & Schönian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. J Clin Microbiol 2006; 44:495-503.
40. Aransay A.M., Scoulica E. & Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. App Environ Microbiol 2000;66:1933-1938.
41. Rodriguez N., Guzman B., Rodas A., Takiff H., Bloom BR. & Convit J Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis and species hybridization. J clin Microbiol 1994;32: 2246-2252.
42. Harris E., Kropp G., Belli A., Rodriguez B. & Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol 1998; 36:1898-1995.
43. Jorquera A., González R., Marchan-Marcano E., Oviedo M., Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia spp.* captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100:43-46.
44. Orué A., Hidalgo M., De Abreu N., Luis L., García H., Rodriguez N. et al. Marcadores moleculares en *Kinetoplastida*: secuenciación diagnóstica de DNA nuclear de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* y el desarrollo de un ensayo múltiple de PCR (Multiplex PCR) en la identificación del parásito. Mem Inst Biol Exp 2005;4:121-124.
45. Schnur L.F., Nasereddin A., Eisenberg C.L., Jaffe C., El Fari M., Asmi K., et al., Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a Judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. Am J Trop Med Hyg 2004;70:364-372.
46. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig HDFH., Presber W., et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diag Microbiol and Inf Dis. 2003; 47:349-358.
47. Cruz I., Cañavate C., Rubio JM., Morales MA., Chicharro C., Laguna F., et al., A nested polymerase chain reaction (LN-PCR) for diagnosis and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. Trans R soc Trop Med Hyg 2002;96:185-186.
48. Schriber A., Schriber ALF., Góes-Neto A., Guimaraes LH., Carvalho LP., Almeida RP., et al., Multiclinal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. Infect Immun 2004;72:508-514.
49. Rodríguez-Bonfante C., Bonfante-Garrido R., Grimaldi G., Momen H., Cupolillo E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolate from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. Infect Genet Evol, 2003; 2:119-24.