

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección y caracterización molecular de *Leishmania* en
lesiones cutáneas de pobladores del Cantón Pedro Vicente
Maldonado**

Proyecto de investigación

Juan Francisco Delgado Chávez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 12 de mayo de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección y caracterización molecular de *Leishmania* en lesiones cutáneas de
pobladores del Cantón Pedro Vicente Maldonado**

Juan Francisco Delgado Chávez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata, Ph.D

Firma del profesor

Quito, 12 de mayo de 2016

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Juan Francisco Delgado Chávez

Código: 00101045

Cédula de Identidad: 1714286554

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2016

DEDICATORIA

A mi familia, por ser un apoyo incondicional en mi vida. Son un ejemplo para mí y cada día puedo ser una mejor persona gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología por las facilidades prestadas para la realización de este proyecto.

A mis profesores, por todas las enseñanzas y conocimientos a lo largo de mi carrera universitaria. Especialmente a Sonia Zapata por permitirme ser parte de este proyecto y por su constante preocupación y apoyo.

Al Dr. Pablo Zambrano y a todos los miembros del Centro de Salud de Pedro Vicente Maldonado por su ayuda en el trabajo de campo.

A mi familia y amigos por ser un pilar fundamental en mi vida y un apoyo incondicional

A Ale Gallegos por su apoyo, ayuda y paciencia durante la realización de este proyecto

RESUMEN

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades zoonóticas y antroponóticas (Kato et al., 2005). La leishmaniasis es causada por parásitos del género *Leishmania* perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Se transmite por la picadura de hembras del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo. En Ecuador se ha reportado leishmaniasis de tipo cutánea y mucocutánea, siendo la primera la más frecuente. Pedro Vicente Maldonado es una zona endémica de leishmaniasis con una población de 12,924 habitantes. Las especies identificadas causantes de leishmaniasis cutánea en la zona son *Leishmania Viannia(V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*. En 1999, se reportó la presencia de híbridos de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* en esta zona. Este estudio pretende caracterizar a nivel molecular las especies de *Leishmania sp.* en 39 muestras de lesiones cutáneas de pobladores de 5 localidades. El análisis molecular de las secuencias del gen de la proteína shock térmico, HSP70 mostró que la especie asociada a las lesiones de leishmaniasis fue *L. (V.) guyanensis*. Todas las secuencias mostraron 100% de homología (1422 bp). *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* son especies muy emparentadas, por lo que algunos autores las consideran una sola especie. No se pudo confirmar la presencia de híbridos,. Estos resultados contribuyen a entender la dinámica de transmisión del parásito en la población humana que se complementa con estudios en el vector y reservorios.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of zoonotic and anthroponotic diseases (Kato et al., 2005). It is caused by a parasite of the genus *Leishmania*. Leishmaniasis is transmitted to humans by the bite of infected female of genus *Phlebotomus* in the old world and *Lutzomyia* in the new world. In Ecuador you can find cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, the first one being the most common. Seven species of *Leishmania* are responsible for infections in Ecuador. According to Calvopiña et al. (2006), in Pedro Vicente Maldonado *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*. are present. Several molecular markers have been used in order to determine phylogeny of *Leishmania*. The heat shock protein has been described as a useful marker to determine phylogeny among species of *Leishmania sp* because it is among the most conserved proteins throughout evolution (Folgueira and Requena, 2007) (Fraga et al., 2010). Pedro Vicente Maldonado is an endemic leishmaniasis area with a population of 12,924 inhabitants. The main species causing cutaneous leishmaniasis in the area are *Leishmania (V.) panamensis* y *Leishmania (V.) guyanensis* (Bañuls et al., 1999). While vectors identified are *Lutzomyia trapidoi* and *Lutzomyia hartmanni* (Calvopiña et al., 2004). This study aims to characterize the species of *Leishmania sp*. but it will also allow understanding the dynamics of transmission of cutaneous leishmaniasis in Pedro Vicente Maldonado together with the analysis of vectors and reservoirs study. 39 samples of cutaneous leishmaniasis lesions were analyzed. Genetic variability could not be found among them. The heat shock protein was analyzed and concluded that the samples sequences are homogeneous and apparently clones corresponding to *L. guyanensis*. In addition, *L. guyanensis* y *L. panamensis* are closely related species. To determine genetic variability in these species some authors recommend using microsatellites. The genetic diversity among *L. guyanensis* y *L. panamensis* has been discussed and y *L. panamensis* has even been described as a subspecies of *L. guyanensis*. In Pedro Vicente Maldonado, confirmed *L. guyanensis* and *L. panamensis* vectors are *N. trapidoi* y *L. hatmanni*, while the possible vectors are *Psychodopygus panamensis* y *Psychodopygus carrerai thula*.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
CICLO DE VIDA	12
EL PARÁSITO	13
LEISHMANIASIS EN EL ECUADOR	14
VECTORES	15
RESERVORIOS	16
HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DE LEISHMANIASIS.....	16
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
A) OBJETIVO GENERAL:.....	19
B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	19
ÁREA DE ESTUDIO	20
MATERIALES	21
MÉTODOS	24
COLECCIÓN DE MUESTRAS	24
CULTIVO DEL PARÁSITO	25
EXTRACCIÓN DE ADN.....	26
AMPLIFICACIÓN DE ACTINA	27
AMPLIFICACIÓN DE ADN DE KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE.....	28
AMPLIFICACIÓN DE ADN DE HEAT SHOCK PROTEIN (HSP70)	28
ELECTROFORESIS DE ADN	28
SECUENCIAMIENTO.....	29
ANÁLISIS DE DATOS.....	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45
ANEXO 1: INFORMACIÓN SOBRE LOCALIDADES EN LAS QUE SE REALIZÓ COLECCIÓN DE MUESTRAS	45
ANEXO 2: MAPA DE LOCALIDADES EN LAS QUE SE REALIZÓ RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA ZONA DE PEDRO VICENTE MALDONADO	45
ANEXO 3: REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE B- ACTINA	46
ANEXO 4: CONDICIONES UTILIZADAS PARA PCR EN EL TERMOCICLADOR EN LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE B-ACTINA	46
ANEXO 5: REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE	46

ANEXO 6: CONDICIONES UTILIZADAS PARA PCR EN EL TERMOCICLADOR EN LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE	47
ANEXO 7: REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE HEAT SHOCK PROTEIN (HSP70).....	47
ANEXO 8: CONDICIONES UTILIZADAS PARA PCR EN EL TERMOCICLADOR EN LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE HEAT SHOCK PROTEIN (HSP70)	48
ANEXO 9: CULTIVO EN MEDIO DE CULTIVO USHMARU DE MUESTRAS TOMADAS EN PEDRO VICENTE MALDONADO	48
ANEXO 10: GEL DE AGAROSA CON PRODUCTOS DE PCR DE ADN DE B-ACTINA	49
ANEXO 11: GEL DE AGAROSA CON PRODUCTOS DE PCR DE ADN DE KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE	49
ANEXO 12: GEL DE AGAROSA CON PRODUCTOS DE PCR DE ADN DE HEAT SHOCK PROTEIN	50
ANEXO 13: ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON SECUENCIAS PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE	51
ANEXO 14: VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA ENCONTRADA EN LAS SECUENCIAS DE ADN ALINEADAS DE HSP70. LAS BASES QUE SON IDÉNTICAS SE REPRESENTAN CON UN PUNTO. 1-15) MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO 16-18) MUESTRAS REFERENCIALES DEL GENBANK DE <i>LEISHMANIA PANAMENSIS</i>, <i>LEISHMANIA GUAYENSIS</i> Y <i>LEISHMANIA BRAZILENSIS</i> PARA HSP70, RESPECTIVAMENTE	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de pacientes con leishmaniasis: izquierda) visceral, centro) mucocutánea y derecha) cutánea.	12
Figura 2. Toma de muestra de biopsia de leishmaniasis cutánea en Pedro Vicente Maldonado por el Dr. Pablo Zambrano	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas clínicas de leishmaniasis y las especies de <i>Leishmania spp.</i> causantes de cada una.....	13
Tabla 2. Localización de las biopsias muestreadas y cantidad de cada una	30
Tabla 3. Rango de edad, cantidad y porcentaje de los participantes en el estudio .	30
Tabla 4. Género, cantidad y porcentaje de los participantes en el estudio.....	31
Tabla 5. Localidad de recolección, cantidad y porcentaje de las muestras colectadas....	31

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades zoonóticas y antroponóticas que afectan causando daño a nivel cutáneo, mucocutáneo o visceral (Kato et al., 2005). A nivel mundial, se estima que cada año se producen 1,3 millones de nuevos casos y entre 20 000 y 30 000 defunciones (OMS, 2015). Se encuentra distribuida en todos los continentes menos en la Antártida y se han reportado ciertos casos aislados en Oceanía. En América se han reportado casos desde el norte de Argentina hasta el sur de Texas (Jojoa, 2012) .

Esta enfermedad se presenta en 3 formas clínicas como se puede observar en la Figura 1. La leishmaniasis visceral es una enfermedad crónica y si no recibe el tratamiento apropiado puede ser mortal al destruir todos los órganos internos del paciente . La leishmaniasis mucocutánea generalmente es producida por *Leishmania braziliensis*, la característica principal de esta patología es la destrucción total o parcial de los tejidos de nariz, garganta y boca. La leishmaniasis cutánea es una de las enfermedades parasitarias más comunes a nivel mundial (Zerpa et al., 2002). Este tipo de lesiones se presenta generalmente en brazos, piernas y cuello, por ser zonas más expuestas al vector. Las lesiones de este tipo pueden curar sin necesidad de tratamiento después de meses e incluso años de un gran daño epitelial. (Calvopiña et al., 2012).



Fuente: Stanford University (web.stanford.edu)

Figura 1. Fotos de pacientes con leishmaniasis: izquierda) visceral, centro) mucocutánea y derecha) cutánea.

La gente que habita en zonas rurales está más expuesta a la enfermedad debido al contacto directo con el hábitat del vector. Actualmente la tasa de deforestación es muy alta con lo cual el vector se adapta a nuevos ambientes (Ampudia et al., 2014). En las zonas rurales, la malnutrición suele presentarse especialmente en niños, causando debilidad del sistema inmune y por lo tanto poca resistencia hacia la infección del parásito. Los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad influyen en el vector, al alterar su distribución y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente reportada. Las sequías, hambrunas, inundaciones y otras catástrofes naturales, causan el desplazamiento masivo de personas hacia zonas de transmisión de leishmaniasis (Ampuero et al., 2005)

Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito se presenta en dos estados en dos hospederos diferentes. Necesita de un hospedero invertebrado (flebotomo) y un vertebrado (mamífero). En el vector el parásito se encuentra como promastigote extracelular móvil; mientras que en el hospedador mamífero está como amastigote intracelular inmóvil. La transformación de un estado a otro se da por cambios en la temperatura y el pH (Kato, et al., 2010).

La picadura del vector activa el sistema inmune reclutando neutrófilos hacia el sitio de la infección, estos a su vez se encargan de fagocitar a los parásitos causantes de la infección. Sin embargo, el parásito tiene como objetivo principal la infección a los macrófagos, los cuales pueden infectarse por varias formas: por infección directa, por fagocitosis de los neutrófilos infectados y por infección silenciosa de los parásitos liberados tras la muerte apoptótica de los neutrófilos. Dentro del hospedador humano, el parásito empieza a reproducirse por mitosis causando lisis celular y las lesiones en los tejidos (Bras- Goncalves, et al., 2014).

El Parásito

La leishmaniasis es causada por parásitos del género *Leishmania* perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Dentro de este género se pueden distinguir a dos subgéneros: *Leishmania* que incluye a las especies que se desarrollan en el intestino anterior y medio del vector, y el segundo es *Viannia* que se desarrolla en el intestino posterior y medio (Lainson & Shaw, 1987). Las especies de *Leishmania* determinan el tipo de lesión que producirá. Como se muestra a continuación en la Tabla 1

Tabla 1. Formas clínicas de leishmaniasis y las especies de *Leishmania spp.* relacionadas

	Formas clínicas		
	Leishmaniasis cutánea	Leishmaniasis mucocutánea	Leishmaniasis visceral
Especies de	<i>L. (Viannia) guyanensis,</i> <i>L.(Leishmania) mexicana</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>

<i>Leishmania</i> <i>spp.</i>	<i>L.(L.) major</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L.(L.) tropica</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i>		
--	--	--	--

Leishmaniasis en el Ecuador

Se piensa que la leishmaniasis está presente en el Ecuador desde hace cien y hasta mil años antes de la conquista española. En Ecuador se puede encontrar leishmaniasis de tipo cutánea y mucocutánea, siendo la primera la más frecuente. Sin embargo, en su forma mucocutánea, se encuentra limitada a las 6 provincias de la región amazónica. Al ser más grave que el tipo cutáneo, la gente tiende a rechazar a los enfermos porque los tejidos se destruyen significativamente causando deformación en zonas sensibles como en ojos, nariz u orejas (Calvopiña et al., 2004)

En la actualidad la leishmaniasis cutánea se encuentra distribuida en 23 provincias de las 24 provincias del territorio ecuatoriano y se ha convertido en un problema muy serio de salud (Ampudia et al., 2014). Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), en el año 2014, se reportaron 935 casos a nivel nacional. Esta cifra representa un aumento del 22.25% con respecto a 2013, en donde los casos reportados fueron 809. Es importante recalcar que los casos reportados al MSP no representan la totalidad de casos presentes en Ecuador. Esto sucede porque la mayoría de las personas que sufren de la enfermedad, se encuentran en el campo sin acceso a un centro de salud y esperan la cura espontánea de

las úlceras o utilizan métodos alternativos como extractos de plantas, ungüentos, aceite de auto hirviendo, gasolina, etc (Ampudia et al., 2014).

Siete especies de *Leishmania* son responsables de infecciones en Ecuador: *Leishmania (Viannia) braziliensis* causante de leishmaniasis mucocutánea, *L. (V.) naiffi*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L.(L.) major-like*, de leishmaniasis cutánea. Por último, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, de leishmaniasis cutánea y mucosa (Olalla, et al., 2015).

Según Calvopiña et al. (2006), en Pedro Vicente Maldonado se han encontrado *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*. Además, en otro estudio en Ecuador, Bañuls. et al. (1999) describió híbridos entre *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*. provenientes de muestras colectadas en el país. .

Vectores

La enfermedad se produce por la picadura de un protozoario del género *Leishmania* de la familia *Trypanosomatidae* que se transmite por hembras del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo, con un gran índice de infestación en las Américas con más de 20 especies (Jojoa, 2012).

En Ecuador, se han reportado 76 especies de flebótomos que pertenecen a 17 subgeneros (Galati, 2010). Se consideran como vectores comprobados a: *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia ayacuchensis* (Zapata, et al., 2012). Se ha reportado a *Lu. serrana* como vector de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* en la Amazonía (Calvopiña, 2004). Además determinaron como posibles vectores a: *Lu. tortura*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. gomezi*, *Lu. flaviscutellata*, *Ps. carrerai thula*, y *Lu. castanea*. Por otra parte, se ha reportado que *Psychodopygus panamensis* es

vector natural de *L. panamensis* y *L. brazilensis* en Panamá, Ecuador, Colombia y Guatemala (Barreto, et al., 1997; Lainson, 2002)

Reservorios

Se han reportado varios hospederos tanto domésticos como silvestres. Los hospederos naturales de este parásito son roedores, marsupiales, osos perezosos, canidos y primates no humanos (Nieves y Pimiento, 2002). Mientras que el humano es un hospedero accidental. Animales domésticos como caballos y gatos han sido reportados como reservorios. Entre las especies silvestres que pueden ser reservorios están: ratas de agua (*Squamipes nectomys*), ratas negras (*Rattus rattus*), ratones de hierba (*Bolomys lasiurus*), ratones de pantano (*Holochilus scieurus*), ratones de campo (*Akodon arvieuloides*), oposums lanudos (*Marmosa sp.*) y zarigüeyas comunes (*Didelphis albiventris*) (Chaves et al., 2007). En Ecuador se ha reportado a oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*), perezoso (*Choloepus hoffmanni*), ardilla (*Sciurus vulgaris*), ardilla de cola roja (*Sciurus granatensis*), cusumbo (*Potos flavus*), gallinas (*Gallus gallus domesticus*), humanos (*Homo sapiens*), vacas (*Bos Taurus*) y perros (*Canus lupus*) como reservorios de *Leishmania* spp. (Roque & Jansen, 2014) (Anaguano et al., 2015).

Herramientas moleculares para detección de leishmaniasis

Se han utilizado varios marcadores para poder determinar filogenia de *Leishmania* como son: internal transcribed spacer (ITS) 1 y 2 del ribosoma, gen para el polipéptido catalítico de la polimerasa a (polA), el gen de la subunidad larga de RNA polimerasa II (rpoIILS), gen de la citocromo oxidasa II, gen de glicoproteína 63 (gp63), gen de

cisteína proteasa B (cpb), el mini-exon, 7SL RNA, el gen de citocromo b(cytB) y la heat shock protein (hsp70) (Rougeron et al., 2010) (Zerpa et al. 2002).

La proteína de shock térmico es una proteína es de mucha utilidad para el parásito, porque durante la transmisión tiene que soportar constantes cambios de temperatura y pH. En el insecto los promastigotes se encuentran de 22 °C a 28 C. Mientras que en el hospedero mamífero, en lesiones cutáneas la temperatura es de 31°C a 35°C y en lesiones viscerales es de 37°C aproximadamente (Folgueira et al., 2006). Es por lo tanto, importante que el parásito posea mecanismos de tolerancia al shock térmico (Zilberstein y Shapira, 1994). La proteína de shock térmico ha sido descrita como un marcador útil para determinar filogenia entre especies de *Leishmania sp* debido a que está entre las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución (Folgueira y Requena, 2007) (Fraga et al. , 2010).

Los genes que codifican las proteínas hsp70 también se utilizan ampliamente en estudios filogenéticos de diferentes parásitos, como *Cryptosporidium spp.* (Sulaiman et al., 2000; Langkjaer et al., 2007), *Babesia spp.* (Yamasaki et al., 2002; 2007), *Giardia spp.* (Arisue et al., 2002a), *Entamoeba spp.* (Arisue et al., 2002a), *Microsporidium spp.* (Arisue et al., 2002a) y *Blastocystis hominis* (Arisue et al., 2002).

El presente estudio pretende caracterizar a nivel molecular las especies de *Leishmania* en biopsias de lesiones cutáneas en habitantes de la zona de Pedro Vicente Maldonado. Con este estudio se demostraría cuales son las especies causantes de leishmaniasis en Pedro Vicente Maldonado, su diversidad genética y la posible presencia de híbridos descritos por Bañuls (1999) en la zona.

JUSTIFICACIÓN

Pedro Vicente Maldonado es una zona endémica de leishmaniasis con una población de 12,924 habitantes. Según el Ministerio de Salud Pública, en 2014 se reportaron 55 casos de leishmaniasis cutánea en la zona, sin tomar en cuenta los pobladores de zonas rurales, que no acuden a las dependencias del MSP para recibir tratamiento. La enfermedad es fluctuante debido a la variabilidad climatológica en tiempo e intensidad (Ampudia et al., 2014). Afecta principalmente a niños y causa desfiguraciones en la cara con un impacto social de aceptación en la población, principalmente en niñas (Zapata et al, 2012). De acuerdo a Ampudia (2014), la época del año en la que se presentan más casos de leishmaniasis en el Cantón de Pedro Vicente Maldonado es en la época de invierno. La época invernal se define como la época lluviosa y va desde noviembre hasta abril.

Actualmente existe un aumento en el número de casos de leishmaniasis cutánea, debido principalmente a la lotización de terrenos en la zona y la deforestación. Por lo cual, los vectores se están adaptando a nuevos hábitats y por lo tanto la gente tiene más contacto con los vectores.

Las principales especies causantes de leishmaniasis cutánea en la zona son *Leishmania (V.) panamensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*,. (Bañuls et al., 1999). Mientras que los vectores que se han identificado son *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni* (Calvopiña et al., 2004).

Este estudio pretende caracterizar las especies de *Leishmania sp.* pero también va a permitir entender la dinámica de transmisión de la leishmaniasis cutánea en esta zona junto con el estudio del parásito en vectores y reservorios

OBJETIVOS

a) Objetivo General

- Caracterizar a nivel molecular *Leishmania sp.* en 39 lesiones de habitantes de los pueblos: Pedro Vicente Maldonado, Paraíso Escondido, El Cisne, La Celica, Salcedo Lindo del Cantón Pedro Vicente Maldonado

b) Objetivos Específicos

- Obtener biopsias de lesiones de leishmaniasis cutánea de pacientes
- Cultivar el parásito en medio USHMARU
- Extraer ADN y amplificar una región (120bp) de los minicírculos del kinetoplasto
- Amplificar y secuenciar un segmento del gen de la proteína de shock térmico (hsp70) (1422 pb) para identificar la especie de *Leishmania* presente en la lesión

ÁREA DE ESTUDIO

Todos los individuos que fueron parte del estudio aceptaron y firmaron un formulario de consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito. El permiso de bioética es el N° 2014-025M. Las personas mayores de edad firmaron el consentimiento informado como aprobación para ser parte del estudio y en pleno conocimiento de riesgos, beneficios y objetivos del proyecto. En caso de menores de edad, los padres firmaron el consentimiento informado y aceptaron la participación del menor en el estudio.

La colecta de muestras se realizó en el cantón Pedro Vicente Maldonado al noroccidente de la provincia de Pichincha y en 5 recintos aledaños como se muestra en el Anexo 1 y en el Anexo 2. Las colectas se realizaron entre el 21 de mayo de 2015 y el 31 de enero de 2016 en las diferentes localidades.

El análisis molecular del proyecto se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Parasitología de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

MATERIALES

Colección de muestras

- Formulario de consentimiento informado
- Bisturí
- Algodón
- Alcohol Antiséptico
- Guantes de látex
- Pinzas
- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7)
- Tubos eppendorf 1,5 ml
- Hielo seco

Extracción de ADN

- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7)
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20mM pH 8, HCl 100mM pH 8)
- Proteínasa K (Invitrogen)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Etanol al 100%, etanol al 70%,
- Buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)
- Microcentrifugadora Eppendorf
- Vórtex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Baño María Shel LAB
- Tubos eppendorf 1,5ml

- Micropistilo plástico
- Micropipetas (Labnet)

Amplificación De ADN

- H₂O para PCR
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 2mM
- Primer JW11 (50uM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3'
- Primer JW12 (50uM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3'
- Primer HSP70sen
(50uM): 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3'
- Primer HSP70ant
(50uM): 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3'
- Primer B-actina F (50uM)
5'CGGAACCGCTCATTGCC3'
- Primer B-actina R (50uM)
5'ACCCACACTGTGCCCATCTA 3'
- Taq Polimerasa (GoTaq ®)
- Muestras de DNA de biopsias de leishmaniasis cutánea
- Termociclador BioRad
- Tubos eppendorf de 0,2m

Electroforesis en Gel de Agarosa

- Cámara de electroforesis horizontal (C.B.S Scientific CO)
- TBE 1X

- 54g de TRIS Base (Promega)
- 27.5g de ácido bórico (Acros Organics)
- 20mL de EDTA pH8 [0.5M]
- 5000mL agua destilada estéril
- Agarosa LE
- Bromuro de etidio (molecular SIGMA biology)
- 28
- Amplicones (JW11-JW12;HSP70sen-HSP70ant)
- Micropipetas (Labnet)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Balanza analítica (ae ADAM AQT-600)
- Microondas (Panasonic USP 4,942,516)
- Parafilm

Secuenciamiento

- Amplicones JW11-JW12
- Amplicones HSP70sen-HSP70ant

Análisis de datos

- Software:
 - PRE GAP,
 - GAP,
 - MEGA,
 - National Center for Biotechnology Information

MÉTODOS

Colección de muestras

La colección de muestras se realizó en pacientes de 1 a 25 años con lesiones sugestivas de infecciones con leishmaniasis cutánea en la población de Pedro Vicente Maldonado y recintos aledaños, como se detalla anteriormente en la sección “Área de estudio”. Se seleccionó a pacientes únicamente con lesiones recientes y que no hayan recibido tratamiento anteriormente. Todos los procedimientos se realizaron junto al Dr. Pablo Zambrano, epidemiólogo del subcentro de Pedro Vicente Maldonado.

El proceso para la obtención de las muestras fue el siguiente. Primeramente, se observó si los nodos o úlceras presentes en los individuos eran sugestivas de ser leishmaniasis cutánea. Después, se evaluó posibles infecciones sobreañadidas en la úlcera; de ser este el caso, no era una muestra recomendable para el estudio porque sería necesario tratar la úlcera con antibióticos antes.

En segundo lugar, eligió los extremos de las úlceras para tomar las muestras, debido a que los amastigotes se encuentran principalmente en la capa de la dermis.

Como siguiente paso, realizó cortes transversales con bisturí en la lesión. Se desinfectó la lesión con gasa o algodón estéril con alcohol al 70% y se esperó a que seque, debido a que el alcohol no debe entrar en la lesión abierta

Por último, se hizo un corte superficial de 1mm de profundidad en el borde de la lesión utilizando un bisturí y sosteniéndolo con firmeza con el dedo pulga e índice. Se realizó un corte hacia arriba del borde de la lesión con el bisturí evitando el sangrado. Se aplicó una gasa estéril con alcohol y se tapó la herida. En la Figura 2. se puede observar una

foto de la toma de muestra.

Se almacenó las biopsias en PBS 1x y se las transporto en frío hasta el Laboratorio de Parasitología de la Universidad San Francisco de Quito.

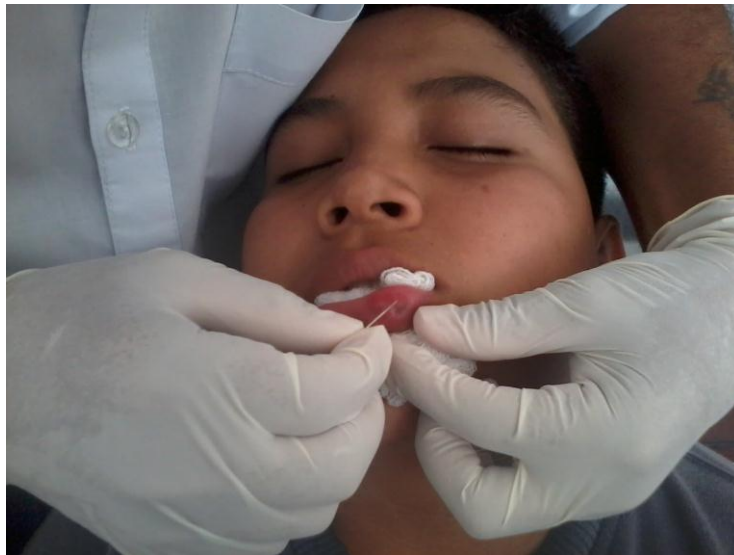


Figura 2. Toma de muestra de biopsia de leishmaniasis cutánea en Pedro Vicente Maldonado por el Dr. Pablo Zambrano

Cultivo del parásito

Se cultivó el parásito en medio de cultivo USHMARU que es un medio bifásico que consta de una fase sólida compuesta por Base de Agar Sangre, BBL suplementado con sangre de conejo desfibrinada al 15% (v/v) y Pen –Strep al 1% (v/v) El medio fue vertido en un tubo para que tome forma de pico de flauta y almacenado a 4 °C.

La toma de la muestra para el cultivo, se realizó con una jeringuilla de 5mL con aguja calibre 21. Se pinchó el borde de la lesión y se giró la aguja firme y repetitivamente con el fin de poder aspirar suavemente el tejido, tirando del émbolo sin sacar la aguja. A medida que se aspira el material de la lesión la solución en la jeringuilla se vuelve turbia. El material obtenido se inoculó en el medio colocando 0,5mL del aspirado. Se mantuvo los cultivos a 22°C máximo 25°C.

La examinación de rutina de los cultivos se realizó cada 3 días. Si se observó contaminación con hongos o bacterias era necesario realizar subcultivos inmediatamente en medios de cultivo fresco con antibiótico. Con una pipeta Pasteur estéril, se tomó 2 a 3 gotas en medio fresco cuando los parásitos incrementaron en número y se los transfirió a medio nuevo. Se añadió aproximadamente 0,5 mL de PBS1x fresco en los tubos de cultivo para que la fase acuosa se mantenga. Los cultivos primarios que permanecieron sin crecimiento después de dos a tres semanas de cultivo, de todas maneras se subcultivaron en medio fresco de cultivo, se incubaron juntos al tubo primario y si después de dos semanas no se presentaban crecimiento ni en el subcultivo ni en el tubo primario, se descartaban.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de las biopsias colectadas mediante el protocolo de CTAB descrito por Saghai-Marroof, et al., (1984) pre estandarizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Primero se realizó tres lavados consecutivos a las muestras con 500 µl de PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄. 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7) para lavar la sangre de las biopsias. Luego se eliminó el PBS 1X y se agregó 700 µl de CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8). Con un micropistilo plástico se trituró la muestra completamente mediante maceración mecánica del material y se agregó 20 µl de proteinasa K. La mezcla se homogenizó en un vórtex y se incubó por 2 horas a 65°C, agitando cada 15 minutos para facilitar la ruptura de las membranas celulares (Kieleczawa, 2006).

Una vez terminada la incubación se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se agregó 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló invirtiendo el tubo vigorosamente hasta formar una emulsión. Luego se centrifugó las muestras a 12000 rpm por 5 minutos, con esto se obtuvo dos fases, la inferior u orgánica (cloroformo/isoamílico) y la superior o acuosa que tiene el ADN en suspensión y una interfase blanca que contiene proteínas celulares. Se transfirió aproximadamente 500 µl del sobrenadante a un tubo nuevo previamente rotulado. En este punto fue crucial no topar la interfase para evitar la contaminación con proteínas celulares. A continuación se agregó 1000 µl de etanol al 100% a -20°C y se invirtió delicadamente el tubo tres veces. Esto se dejó toda la noche a -20°C sin movimiento (Kieleczawa, 2006).

Al siguiente día se centrifugó la muestra a 13200 rpm por 11 minutos y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Luego se lavó el pellet de ADN adicionando 1000 µl de etanol al 70% y se invirtió delicadamente. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Una vez realizados los lavados se dejó la muestra secando por 15-20 minutos en un tubo Eppendorf boca abajo sobre un papel absorbente. Finalmente se resuspendió la muestra en 50 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA) y se almacenó a -20°C (Kieleczawa, 2006).

Amplificación de actina

Se amplificó una región de 330 (pb) de una región conservada del gen de la B-actina como control interno. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: Primer B-actina F (50uM) 5'CGGAACCGCTCATTGCC3' y Primer B-actina R (50uM) 5'ACCCACACTGTGCCCATCTA 3'. El volumen final de cada reacción fue 10 µl. Las condiciones de PCR están descritas en el Anexo 3 y Anexo 4.

Amplificación de ADN de kinetoplasto de tripanosomatidae

Se amplificó una región de 120 (pb) de una región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de Tripanosomatidae. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: JW11: 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3' y JW12: 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3' (Nicolas, et al., 2002). El volumen final de cada reacción fue 30 µl. Las condiciones de PCR están descritas en el Anexo 5 y Anexo 6.

Amplificación de ADN de HSP70

Se amplificó una región de 1422 (pb) de una región de proteína de heat shock protein (hsp70) del citoplasma. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: HSP70sen: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' y HSP70ant: 5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (García. et al., 2014) . El volumen final de cada reacción fue 30 µl, para la cual se usó 10 µl de ADN. Las condiciones de PCR están descritas el Anexo 7 y Anexo 8.

Electroforesis de ADN

Para visualizar el tamaño de los amplicones se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio (0.01%). Primeramente, se armó la cámara de electroforesis horizontal. Posteriormente, se pesó 1.5 g de agarosa y se los disolvió en 100 ml de buffer TBE1x en un Erlenmeyer por medio de calentamiento en microondas, asegurándose de que no se evapore y que tampoco se vierta el contenido del Erlenmeyer. Se homogenizó la mezcla y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que el calor del frasco sea tolerable al tacto. Luego se agregó 2 ul de bromuro de etidio y se vertió la mezcla sobre el molde de solidificación de la cámara de electroforesis. Se

colocó el peine para pocillos y se dejó enfriar durante 15 minutos. Después de ese tiempo, se retiró el peine y se colocó TBE 1X sobre el gel. Para cargar las muestras en el gel, se colocó 8 ul de cada muestra en cada pocillo. Finalmente, se colocó un ladder de 100 bp y se corrió la electroforesis a 80V durante 40 minutos (Irwin & Janssen, 2001).

Secuenciamiento

Todos los productos de PCR se enviaron a secuenciar en Functional Bioscience en Wisconsin, Estados Unidos. En total se enviaron 6 muestras para la región del kinetoplasto de Tripanosomatidae y 15 para Heat Shock Protein.

Análisis de datos

Se utilizaron los programas PREGAP y GAP para la alineación y limpieza de las secuencias enviadas por Functional Bioscience. El software MEGA se utilizó para alinear secuencias, determinar polimorfismos y construir árboles filogenéticos. Con la base de datos del NCBI se pudo comparar las secuencias para determinar las especies a las cuales pertenecen.

RESULTADOS

En el estudio participaron 39 personas con edades entre 4 y 25 años. Se obtuvieron 39 muestras de biopsias de humano de lesiones frescas de leishmaniasis cutánea localizadas en diferentes sitios del cuerpo (pie, glúteo, brazo, labio, oreja, codo, pierna, espalda, mano, rodilla, quijada, mejilla, hombro) como se muestra a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Localización de las biopsias en los paciente y número de muestras

Localización de la lesión	Número de muestras
Pie	6
Glúteo	1
Brazo	10
Labio	1
Oreja	1
Codo	1
Pierna	8
Espalda	1
Mano	5
Rodilla	1
Quijada	1
Mejilla	2
Hombro	1
Total	39

Las edades de las personas se muestran a continuación en la Tabla 3., donde se puede ver que la mayoría de los individuos del estudio tenían entre 4 y 11 años con 82%, 15% entre 12 y 19 y solo una persona tenía entre 20 y 27 años que representa el 3%.

Tabla 3. Distribución de la muestra por edad

Edad	Número de muestras	Porcentaje
4-11	32	82
12-19	6	15
20-27	1	3

Total	39	100
--------------	----	-----

En cuanto al género, se puede observar en la Tabla 4 que el 59% de los individuos eran hombres y el 41% eran mujeres.

Tabla 4. Distribución de la muestra por género

Género	Número de muestras	Porcentaje
Masculino	23	59
Femenino	16	41
Total	39	100

La colecta se realizó en cinco localidades. En la Tabla 5 se puede ver que la mayoría de las muestras provenían del reciento El Cisne (41%) seguido por Pedro Vicente Maldonado con 36 % y Paraíso Escondido, La Celica y Salcedo Lindo con 8% cada una.

Tabla 5. Distribución de muestras por localidad

Localidad	Número de muestras	Porcentaje
Pedro Vicente Maldonado	14	36
Paraíso Escondido	3	8
El Cisne	16	41
La Celica	3	8
Salcedo Lindo	3	8
Total	39	100

Se realizó el cultivo de 3 pacientes con leishmaniasis cutánea. Se obtuvo crecimiento a las dos semanas desde la inoculación del medio, como se muestra en el Anexo 9. Los cultivos no pudieron proliferar por agotamiento del medio

Las 39 muestras amplificaron la actina lo que confirmó la buena calidad del ADN y la ausencia de inhibidores de la PCR como se muestra en el Anexo 10.

De igual manera, todas las muestras amplificaron la región conservada de los

minicírculos de ADN del kinetoplasto de Tripanosomatida, lo cual demostró la presencia de ADN de *Leishmania sp.* en las biopsias con las condiciones de PCR detalladas en el Anexo 5 y Anexo 6. Los resultados del secuenciamiento de 6 muestras confirmaron la presencia de *Leishmania (Viannia)* en las lesiones como se muestra en el Anexo 11. Las muestras fueron elegidas de cada localidad de colección y de diferentes partes corporales en donde se presentó la lesión.

La amplificación de la región de la heat shock protein fue positiva para las 39 muestras, como se observa en el Anexo 12. Se enviaron 15 muestras a secuenciar, tomando en cuenta diferentes edades, localización en el cuerpo del paciente, sitio de colecta. El análisis de las secuencias de las muestras de la amplificación de la hsp70, demostró que las muestras eran homogéneas y que correspondían a *L. (V.) guyanensis*, debido principalmente a 3 Single Nucleotido Polimorfism (SNP) que diferencian a *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*. No se identificó la presencia de híbridos (ver Anexo 14).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los datos, la mayoría de los participantes (82%) se encuentra entre 4 y 11 años. Estos datos se pueden explicar por el hecho de que los niños no han tenido contacto previo con el parásito y por lo tanto la sintomatología es más fuerte en ellos creando. Mientras que en las personas adultas el parásito ha inducido una respuesta que no sólo controla la infección primaria, pero también da lugar a inmunidad de por vida ante una reinfección, haciendo que la sintomatología se presente de manera más leve (Scott et al., 2004).

En cuanto al sexo de los participantes, se encontró que la mayoría eran hombres. De acuerdo a la bibliografía se dice que los hombres son una de las poblaciones más expuestas al vector por su trabajo en actividades agrícolas, extracción de madera, caza, pesca. Sin embargo, en este caso hay que tener en cuenta que la mayoría de los participantes son niños y por lo tanto no trabajan. Por el contrario, juegan en las afueras de sus hogares pasado el medio día, cuando el vector se presenta e infecta. Se encuentran con sus extremidades descubiertas, por lo tanto las picaduras del vector se dan en esas zonas corporales principalmente (Ampuero et al., 2005).

Se realizaron los cultivos de 3 muestras y estos no pudieron seguir creciendo debido al retraso en los subcultivos. Como se detalla en la metodología, se debe hacer subcultivos cada 15 días conservando el tubo original. Sin embargo, se ha encontrado que después de cierto tiempo y de una sucesión de pases, los parásitos son más exigentes en las condiciones necesarias para su crecimiento. Los requerimientos nutricionales de *Leishmania*, indican que estos parásitos son auxótrofos de ácido fólico y uterina, pero las concentraciones adecuadas de estos compuestos varían entre especies. Es por esto

que, por ejemplo, en ciertos casos se necesitan concentraciones altas de ácido fólico y en otros una concentración alta puede ser perjudicial para el crecimiento del parásito en el medio. Es esencial, por lo tanto, tener un medio especializado para la especie que se desea cultivar y no utilizar un medio genérico (Steiger & Steiger, 1997).

Con la reacción de PCR de B-actina se pudo comprobar la ausencia de inhibidores en los ADN, ya que al amplificar esta región del gen de la B-actina se observaron bandas claras en el tamaño esperado. Los inhibidores que se podrían presentar en estos casos son inhibidores propios de las muestras como el hierro presente en la hemoglobina y la formación de sales por la extracción (Schrader et al. 2012)

La amplificación de ADN de kinetoplasto de tripanosomatidae fue exitosa en todas las muestras. Este marcador permitió detectar la presencia de *Leishmania (Viannia)* en las biopsias. El kinetoplasto es una región de ADNm extracromosómico formando por una red concatenada de maxicírculos y minicírculos. En este caso se amplifica una región conservada de los minicírculos y los resultados sugieren que en este caso se está amplificando una región de los minicírculos conservada entre subgéneros y por lo tanto nos permite discriminar entre los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)* (Ceccarelli et al., 2014).

Aparentemente, la homogeneidad de las muestras analizadas con hsp70 muestra que se trata de clones que corresponden a *L. (V.) guyanensis* debido principalmente a 3 SNPs que diferencian a *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*. De acuerdo a lo descrito por García. et al, 2014, se describe a la proteína de shock térmico como útil para poder discriminar a las especies de *Leishmania* del neotrópico. Fraga. et al. en 2010 realizaron

un estudio con la proteína de shock térmico. Decidieron utilizar la hsp70 para determinar la diversidad genética y posteriormente secuenciar los amplicones producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Encontraron que la filogenia de *Leishmania*, no se componía de 17 especies como se había descrito con MLEE y RFLP anteriormente. Por el contrario, solo se distinguen 8 especies en este estudio: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis*. Se describe a subespecies como por ejemplo: *L. (L.) donovani infantum*, *L. (V.) guyanensis panamensis*, y *L. (V.) braziliensis peruviana*. Esto explica lo encontrado en los análisis, en donde se ve que *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* son especies muy emparentadas . Bañuls et al. y Fraga et al. coinciden en que *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* son especies muy emparentadas que en el caso del primer autor lo describe como un híbrido y en el caso del segundo autor describe a *L. (V.) panamensis* como una subespecie de *L. (V.) guyanensis*. Este hallazgo concuerda con los hallazgos de Berzunza-Cruz, M. et al. (2002) con ITS, en donde también se describe a *L. (V.) guyanensis panamensis*.

Actualmente, la filogenia del género se encuentra en discusión. Aunque, no se puede modificar una clasificación filogenética basado en un solo gen. Se debe llegar a un consenso en el que se haya demostrado por muchas técnicas y genes target, esta filogenia. Sin embargo, cada vez más varios autores sugieren que la clasificación de *Leishmania* debe replantearse. Es necesario que se realicen más estudios al respecto y que sirvan para que se pueda llegar a una filogenia concluyente y basada en marcadores moleculares más exactos y dejar de utilizar MLEE y RAPDS como referencia.

En Pedro Vicente Maldonado, Bañuls. et al. en 1999 describió híbridos entre *L. guyanensis* y *L. panamensis*. en el cantón de Pedro Vicente Maldonado. Sin embargo, en las muestras analizadas no se encontraron híbridos. Algunos autores sugieren y reportan el uso de microsátélites como marcadores útiles para estudios de variabilidad genética con especies como *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* (Rougeron et al., 2010).

Las especies que se encontraron en el área de estudio, tanto en el presente estudio como en la bibliografía, son *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* y se han descrito como sus vectores comprobados a *Ny. trapedoi* y *Lu. Hatmanni*. Palacios (2015) confirma en el área de estudio a *Ny. trapedoi* y *Lu. hatmanni* como vectores y sugiere a *Pintomyia serrana*, *Psychodopygus panamensis* y *Psychodopygus carrerai thula* como posibles vectores.

Palacios hizo estos hallazgos debido a que se encontró que todas las especies antes mencionadas eran antropofílicas y además se alimentaban de los reservorios, entre los confirmados están vacas, perezosos, caballos, entre otros. Encontró que *Psychodopygus panamensis* se alimenta de animales domésticos como por ejemplo perros. Adicionalmente, según información de un contacto personal de Sonia Zapata, se ha encontrado vacas y caballos que presentan lesiones sugestivas de leishmaniasis cutánea.

Actualmente se está analizando al parásito presente en los vectores en Pedro Vicente Maldonado y se ha encontrado que las secuencias de *Leishmania* en el vector son similares a las que encontramos en el presente estudio. De esta manera se confirman a

los vectores, tanto a los confirmados como a los posibles, y además a las especies de *Leishmania* asociadas a leishmaniasis cutánea en la zona de estudio.

Con la información obtenida en este estudio junto con la información de los reservorios y el estudio del parásito en el vector, se pretende un mejor entendimiento de la dinámica de transmisión de la enfermedad en la Pedro Vicente Maldonado, que es una zona endémica de Leishmaniasis.

CONCLUSIONES

Se encontró que las secuencias de las muestras analizadas eran homogéneas y correspondían a *L. (V.) guyanensis*. Además, se descartó la presencia de híbridos en las mismas.

La mayoría de las muestras se colectaron de lesiones en niños de 4 a 11 años porque su sistema inmunitario nunca ha estado expuesto al parásito y por lo tanto no han creado inmunidad ante la infección del parásito.

Junto con el estudio de vectores y reservorios se sugiere a *Psychodopygus panamensis* y *Psychodopygus carrerai thula* como vectores de *L. (V.) guyanensis* en el cantón Pedro Vicente Maldonado.

RECOMENDACIONES

Con el fin de lograr resultados más representativos es necesario ampliar el tamaño de la muestra y además en la misma zona del noroccidente de Quito ampliar el área de estudio. La colecta debería realizarse en diferentes meses al año. Pero es importante que siempre se mantengan los mismos parámetros principalmente el tipo de lesión y los lugares del cuerpo del paciente en donde se presenta la lesión.

Además, es muy importante probar otros marcadores con el fin de determinar si los resultados sobre la variabilidad genética se deben a la naturaleza del marcador, es decir que este sea o no polimórfico. Porque solo de esta manera se podrá determinar si la clasificación actual de *Leishmania spp.* requiere ser actualizado. Algunos autores recomiendan utilizar microsatelites para variabilidad genética entre *L. guyanensis* y *L. panamensis*.

Juntar la información de este estudio juntos con la de los vectores y las preferencias tróficas, contribuye al entendimiento de la dinámica de transmisión en Pedro Vicente Maldonado. Y sería interesante comparar la información con la de otras zonas endémicas de leishmaniasis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ampudia, M. J., & Terán, E. (2014). Prevalencia de Leishmaniasis cutánea en el Cantón de Pedro Vicente Maldonado en el periodo de tiempo 2012 y 2013 . Universidad San Francisco De Quito, Colegio de Ciencia de la Salud. Quito: Universidad San Francisco De Quito.
- Ampuero, Julia, Urdaneta, Margarita, & Macêdo, Vanize de Oliveira. (2005). Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Cadernos de Saúde Pública*, 21(1), 161-170.
- Anaguano, D, Ponce, P, Baldeón M, Santander, S, Cevallos, V. Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Tropica*. 2015, 152: 116
- Arisue N, Sánchez LB, Weiss LM, Muller M, Hashimoto T. Mitochondrial- type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int* 2002a;51:9-16.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* 2002;49:42-3.
- Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol* 2009;121:352- 61.
- Bañuls, A. y otros, 1999. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador are *Leishmania panamensis* and *Leishmania guyanensis* distinct taxa. *American society of tropical medicine and hygiene*, Volumen 61, pp. 838-845.
- Barreto, M., Burbano, M. & Barreto, P., 1997. Nuevos registros de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y triatominos (Hemiptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. *Colombia médica*, 28(3), pp. 116-122.
- Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa T, Pérez-Montfort R, et al. (2002) Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 88: 918–925.
- Bras Goncalves Rachel, Petitdidier Elodie, Pagniez Julie, Veyrier Renaud, Cibrelus P., Cavaleyra Mireille, Maquaire S., Moreaux J., Lemesre Jean-Loup. Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*. *Infection Genetics and Evolution*, 2014, 24, p. 1-14. ISSN 1567-1348

- Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, et al. Leishmania isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. BMC Infect Dis. 2006;13;6:139. doi:10.1186/1471-2334-6-139.
- Calvopiña et al (2012). Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha – Ecuador. Rev Fac Cien Med (Quito); 37: 31-38
- Calvopiña, M., Armijos, R.X., Hashiguchi, Y. 2004. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador. Current status of knowledge. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 99(7): 663-672
- Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M (2014) Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. PLoS ONE 9(2): e88845.
- Chaves, L. & Pascuala, M., 2006. Climate cycles and forecast of cutaneous leishmaniasis, a nonstationary vector borne disease. Plos Meidine.
- Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. Mol Biochem Parasitol 1997;89:149-59.
- Dávila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:651-4.
- Flegontov PN, Strelkova MV, Kolesnikov AA: The *Leishmania* major maxicircle divergent region is variable in different isolates and cell types. Mol Biochem Parasitol 2006; 146:173-79.
- Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. Parasitology 2006;134:1-9.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev 2007;31:359-77.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infection, Genetics and Evolution , 238-245.
- García L, Kindt A, Bermúdez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arévalo J, et al. Culture- independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR- based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol 2004;42:2294-7.

- Galati EAB: Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae Vol. I. 2010, Brasil. Press, Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São, São Paulo, SP
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;295:1852-8.
- Irwin, N. & Janssen, K., 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3era ed. Nueva York: Ferdowsi University of Mashhad.
- Jojoa, S. J. (2012). *Detección molecular de Leishmania spp en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Bogota: Universidad Nacional de Colombia.
- Kato , H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopina, M., Marco, J., Barroso, P., et al. (2005). Detection And Identification Of Leishmania Species Within Naturally Infected Sand Flies In The Andean Areas Of Ecuador By A Polymerase Chain Reaction . *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 87-93.
- Lainson, R. & Shaw, J., 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in latin america. *Macmillan Journals LTD*, 273(5664), pp. 595-600.
- Lainson, R. & Shaw, J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution of leishmania. 1 ed. Londres: Killick- kendricks.
- Lainson, R. S. J., 2002. New World Leishmaniasis: The Ecology of Leishmaniasis and the Diversity of Leishmanial Species in Central and South America. *World Class Parasites*, pp. 11- 31.
- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. Molecular and phylogenetic characterization of Cryptosporidium and Giardia from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 2007;134:339-50.
- Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, et al. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus Leishmania and their phylogeny. *Parasitology* 2004;128:483-91.
- Nicolas, L., Prina, E., Milon, G. & Lang, T., 2002. Real-Time PCR for detection and quantitation of Leishmania in Mouse Tissues. *Journal of clinical microbiology* , 40(5), pp. 1666- 1669.
- Nicolas, V. y otros, 2012. Assessment of Three Mitochondrial Genes (16S, Cytb,CO1) for Identifying Species in the Praomyini Tribe (Rodentia: Muridae). *PLoS ONE*, 7(5).
- Nieves, E. & Pimenta, P., 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of Leishmania viannia Braziliensis and Leishmania Amazonensis in the sand fly

- Lutzomyia migonei. The american society of tropical medicine and hygiene, 67(6), pp. 640-647.
- Olalla , H., Velez, L., Kato, H., Hashiguchi, K., Caceres, A., Gomez, E., y otros. (2015). An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986–2012. *Acta Tropica* , 119-126.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Centro de prensa. Recuperado el 11 de Abril de 2015, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Palacios, E. (2015). *Identificación Molecular de las Preferencias Tróficas de flebótomos colectados en 5 provincias ecuatorianas*. Universidad San Francisco de Quito, Departamento de Biotecnología del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014;3:251–62.
- Rougeron V, De Meeus T, Hide M, Waleckx E, Dereure J, et al. (2010) A battery of 12 microsatellite markers for genetic analysis of the *Leishmania (Viannia) guyanensis* complex. *Parasitology* 137: 1879–1884.
- Saghai-Marroof M. A., K. M. Soliman. A. Jorgensen and R. W. Allard, (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8014-8019.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113:1014–1026
- Scott, P., Artis, D., Uzonna, J. and Zaph, C. (2004), The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunological Reviews*, 201: 318–338. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00198.x
- Simpson AM, Suyama Y, Dewes H, Campbell DA, Simpson L. Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also contain small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:5427-45.
- Steiger RF, Steiger E 1977. Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requirements. *J Protozool* 24: 437-441.
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2385-91.

- Vela, G. (2014). *Variación genética de Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) en cuatro zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador*. Universidad San Francisco de Quito, Departamento de Biotecnología del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C, Shaw SE, Aktas M, Yabsley MJ, et al. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of Babesia parasites from dogs. *Vet Parasitol* 2007;145:217-27.
- Yamasaki M, Tajima M, Lee KW, Jeong JR, Yamato O, Maede Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of Babesia gibsoni heat shock protein 70. *Vet Parasitol* 2002; 11:123-9.
- Zapata S, Mejía L, Le Pont F, León R, Pesson B, Ravel C, Bichaud L, Charrel R, Cruaud C, Trueba G and Depaquit J. 2012. A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Biomed Central. Parasites & vectors*. (5):144
- Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fisher SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of Leishmania spp. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:415-20.
- Zerpa , O., Borges , R., Loyo Nahir, Galindo , W., Belisario, D., Rodríguez, N., et al. (2002). Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Dermatología Venezolana* , 106-110.
- Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:449-70.

ANEXOS

Anexo 1: Información geográfica sobre las localidades donde se realizó la colección de muestras

Localidad	Altitud (msnm)	Coordenadas
Pedro Vicente Maldonado	612	0° 5'8.40"N 79° 3'17.64"O
El Cisne	518	0°11'8.10"N 79° 2'20.40"O
Salcedo Lindo	478	0°13'38.52"N 79° 2'12.54"O
La Celica	521	0° 9'23.58"N 79° 4'1.02"O
Paraíso Escondido	128	0° 5'49.32"N 79°11'9.48"O

Anexo 2: Mapa de localidades en las que se realizó recolección de muestras en la zona de Pedro Vicente Maldonado



Anexo 3: Reacción de PCR para la amplificación de ADN de B-actina ajustada a una reacción de 10 ul

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H2O PCR		4.92
Buffer	1x	2
MgCl ₂	25 mM	0.6
Dntps	2 mM	1
Actina F	50 mM	0.2
Actina R	50 mM	0.2
Taq	5u	0.08
ADN		1

Anexo 4: Condiciones de PCR para la amplificación de ADN de B-actina

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	50 segundos	1 ciclo
Desnaturalización cíclica	92 °C	50 segundos	35 ciclos
Primer annealing	45 °C	50 segundos	
Extensión	72 °C	50 segundos	
Extensión final	72 °C	2 minutos	1 ciclo

Anexo 5: Reacción de PCR para la amplificación de ADN de kinetoplasto de tripanosomatidae ajustada a una reacción de 30 ul

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H2O PCR		10.8
Buffer	1x	6
MgCl ₂	25 mM	6
Dntps	2 mM	3
JW11	50 mM	0.45
JW12	50 mM	0.45
Taq	5u	0.3
ADN		3

Anexo 6: Condiciones de PCR para la amplificación de ADN de kinetoplasto de tripanosomatidae

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 minutos	1 ciclo
Desnaturalización cíclica	94 °C	1 minuto	30 ciclos
Primer annealing	59 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1 ciclo

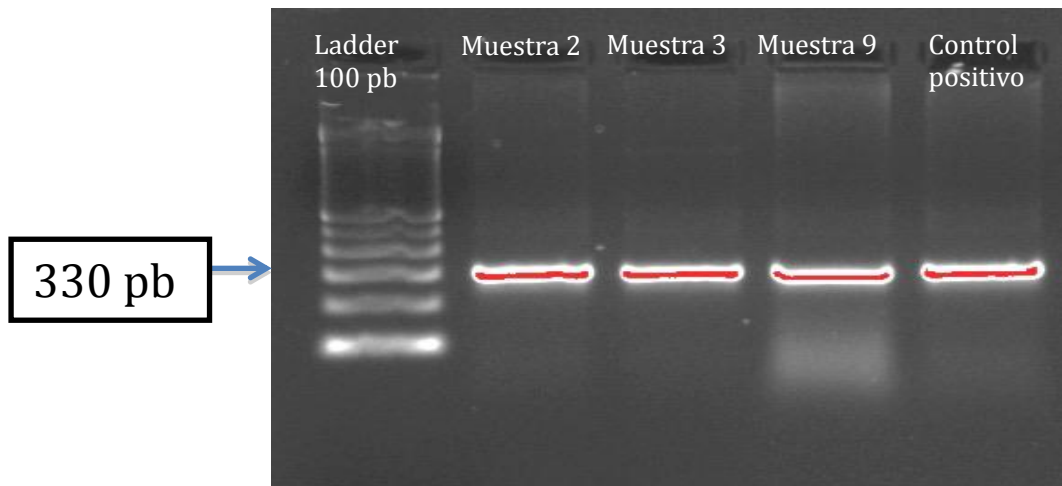
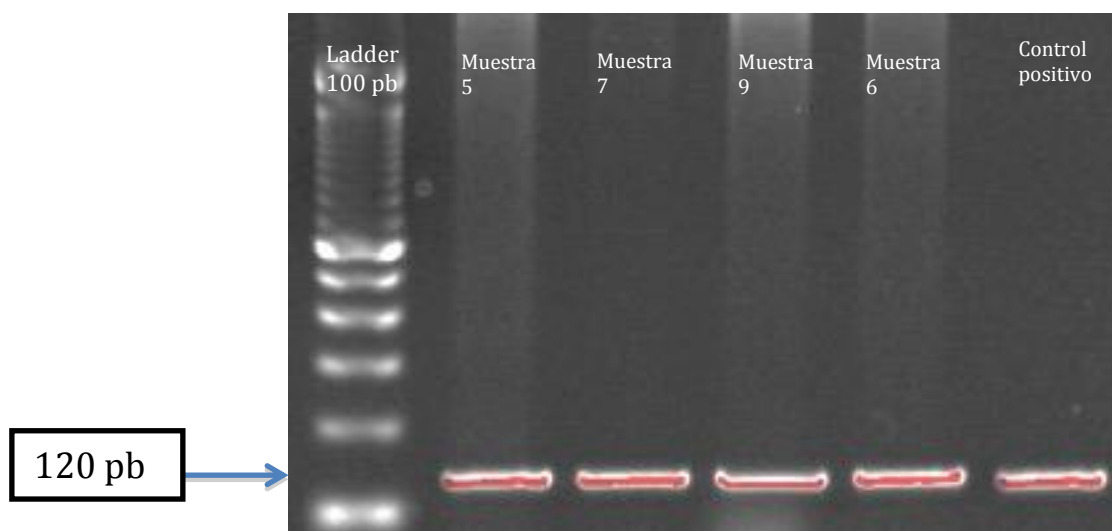
Anexo 7: Reacción de PCR para la amplificación de ADN de heat shock protein (hsp70) ajustada a una reacción de 30 ul

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H2O PCR		10.65
Buffer	1x	6
MgCl ₂	25 mM	1.8
Dntps	2 mM	3
Hsp70sen	10 mM	1.2
Hsp70ant	10 mM	1.2
Taq	5u	0.15
ADN		6

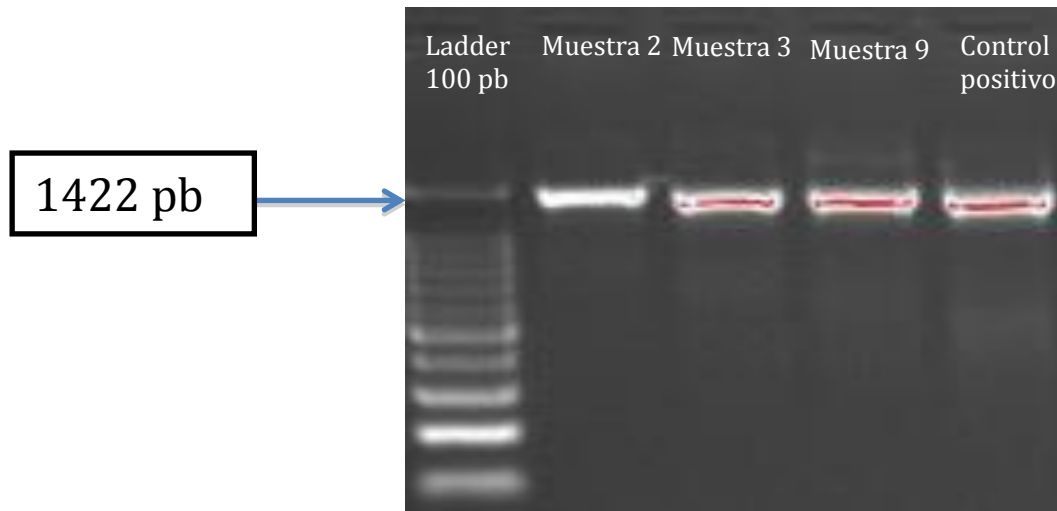
Anexo 8: Condiciones de PCR para la amplificación de ADN de heat shock protein (hsp70)

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos	1 ciclo
Desnaturalización cíclica	94 °C	30 segundos	45 ciclos
Primer annealing	60 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	6 minutos	1 ciclo

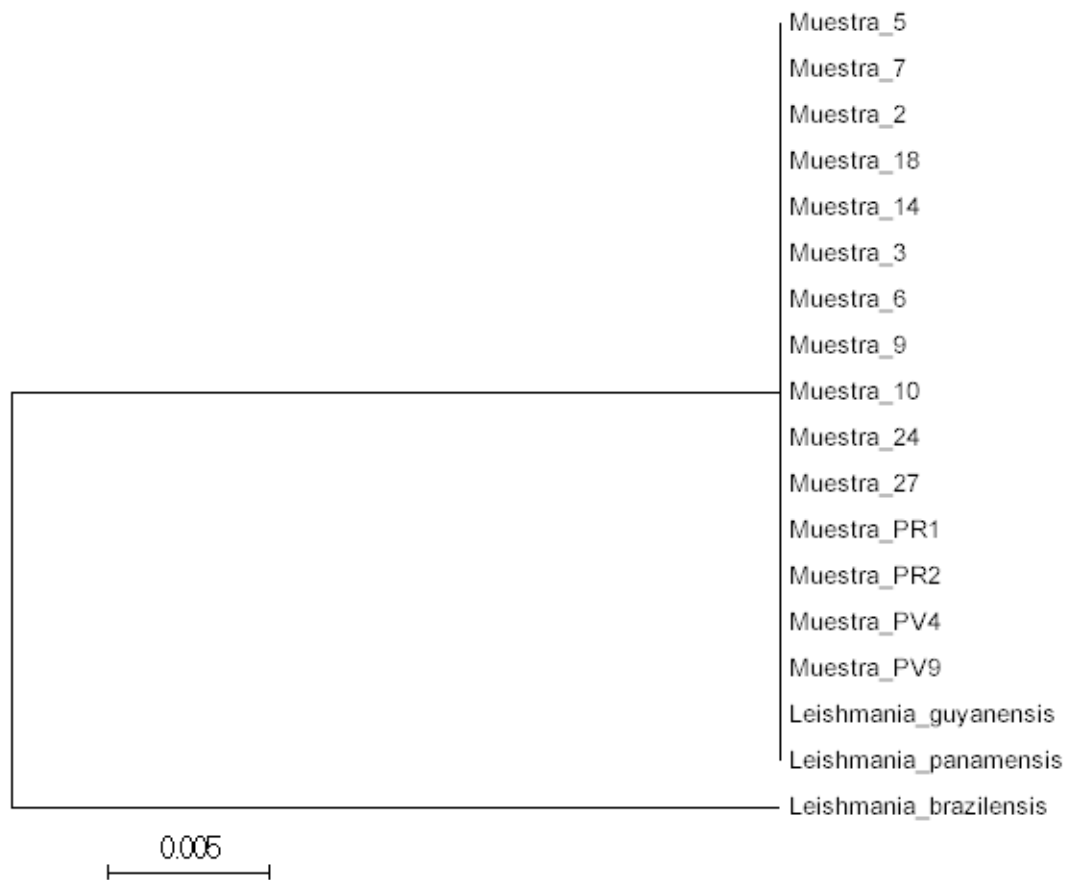
Anexo 9: Cultivo en medio de cultivo Ushmaru de muestras tomadas en Pedro Vicente Maldonado

Anexo 10: Gel de agarosa con productos de PCR de ADN de B-actina**Anexo 11: Gel de agarosa con productos de PCR de ADN de kinetoplasto de tripanosomatidae**

Anexo 12: Gel de agarosa con productos de PCR de ADN de Heat Shock Protein



Anexo 13: Árbol filogenético obtenido con secuencias producto de la amplificación de ADN de kinetoplasto de tripanosomatidae



Anexo 14: Variabilidad nucleotídica encontrada en las secuencias de ADN alineadas de hsp70. Las bases que son idénticas se representan con un punto. 1-15) muestras analizadas en el estudio 16-18) muestras referenciales del GenBank de *Leishmania panamensis*, *Leishmania guayensis* y *Leishmania brazilensis* para hsp70, respectivamente

```

!Domain=Data;
[
      112333 3444566677 7777777777 8888888889 999999]
[
      7789442236 9016801501 3677888999 0126679900 112233]
[
      2842475469 0545635151 2823458467 7982614757 090324]
#Muestra_5      CCCAAGGTGA TCTCTACGTC ATTCCACAAT GGTACAGGGG GTCCCG
#Muestra_7      .....
#Muestra_2      .....
#Muestra_18     .....
#Muestra_14     .....
#Muestra_3      .....
#Muestra_6      .....
#Muestra_9      .....
#Muestra_10     .....
#Muestra_24     .....
#Muestra_27     .....
#Muestra_PR1    .....
#Muestra_PR2    .....
#Muestra_PV4    .....
#Muestra_PV9    .....
#Leishmania_guyanensis .....R .....Y .....R .....
#Leishmania_panamensis .....G .....T .....A .....
#Leishmania_brazilensis GTTCGCAGCG CGCTCGTAG. GCATGCAGGC CACCGTCTA. AAAATA

```