

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS



“ESTUDIO MOLECULAR DE ESPECIES DE *Leishmania*”

“Tesis para optar al título de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas”

Elaborado por:

Lic. Cecilia Lorena Ardaya Daza

Asesores:

Alberto Giménez Turba Ph.D.

Efraín Salamanca Capusiri Mg.Sc.

José Santalla Vargas Mg.Sc.

**La Paz-Bolivia
2015**

RESUMEN

Introducción: En Bolivia, entre las enfermedades parasitarias más prevalentes están las producidas por *Leishmania*, está presente al menos en siete departamentos del país. Hoy en día, la identificación y caracterización de las diferentes especies de *Leishmania* es dificultosa debido a la plasticidad del genoma del parásito. En el presente trabajo, con el respaldo de la carta de intenciones entre el IIFB e INLASA, se describe y discute acerca de la amplificación y restricción enzimática del gen de la HSP70 de 51 cepas nativas de *Leishmania* y 2 cepas de referencia, para su tipificación molecular, además se trabajó evaluando la susceptibilidad *in vitro* de cada una de las cepas frente a Anfotericina B, Miltefosina, CAT y se determinó las concentraciones inhibitorias (CI_{50}).

Metodología: Se mantuvieron cultivos celulares de parásitos de 51 cepas nativas y 2 cepas de referencia, por una parte, se extrajo material genético de cada cepa y se procedió con la amplificación del gen de la HSP70, utilizando la PCR; una vez obtenido el amplicon se procedió con la restricción enzimática con la enzima HAEIII, los perfiles se observaron en gel de agarosa al 2%. Por otro lado se elaboraron placas de susceptibilidad de 96 pozos, donde se enfrentaron las cepas frente a Anfotericina B, Miltefosina y CAT (Alcaloides totales de *Galipea longiflora*), luego de 72 horas de incubación las placas fueron reveladas con el método colorimétrico XTT-PMS, de esta forma se obtuvieron los valores de CI_{50} .

Resultados: La tipificación molecular, permitió identificar zonas donde están distribuidas las diferentes especies; *Leishmania amazonensis* está presente sobre todo en la zona de Cajuata (10 cepas), *Leishmania braziliensis* se encuentra distribuida por diferentes regiones del Norte de La Paz y con respecto a las cepas identificadas como *Leishmania lainsoni* no se puede hacer una distribución ya que la cantidad de muestras es reducida. En cuanto a la susceptibilidad *in vitro*, cuando tratamos las cepas de *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* con Anfotericina B se vio que estas son en su mayoría sensibles a esta droga, sin embargo, las cepas identificadas como *Leishmania braziliensis* tienen valores de CI_{50} frente a Miltefosina muy variables, siendo el mínimo de $0,5 \pm 0 \mu\text{g/mL}$ y el máximo de $23,8 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$. Al tratar las cepas con los alcaloides totales de *Galipea longiflora* se vio que gran parte de las cepas (sin importar especie) son muy sensibles a esta droga.

Conclusiones: Se pudo demostrar la posibilidad de detectar al gen de la HSP70 mediante PCR de 51 cepas nativas y de 2 cepas de referencia; se pudo confirmar la presencia de 3 especies de *Leishmania* en el Norte de La Paz: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*; El método colorimétrico permitió identificar aquellas cepas que muestran valores de CI_{50} poco alentadores y también aquellas con resultados favorables; Finalmente se pudo elaborar mapas con los datos de la identificación y la distribución geográfica de un total de 98 cepas nativas según la especie estudiadas entre el IIFB y el laboratorio de Parasitología del INLASA entre los años 2009-12, también se pudo incluir en los mapas aquellas cepas con resultados poco alentadores en la prueba de susceptibilidad y origen.

Palabras clave: *Leishmania*, PCR-RFLP, CI_{50} , Anfotericina B, Miltefosina, CAT, *Galipea longiflora*, HAE III, XTT.

ABSTRACT

Introduction: In Bolivia, the most prevalent parasitic diseases are those caused by *Leishmania*, is present in at least seven geographical regions. Today, identification and characterization of different *Leishmania* species is difficult due to the plasticity of the parasite genome. This paper, with the support of the letter of intent between the IIFB and INLASA, describes and discusses the amplification and enzymatic restriction of HSP70 gene of 51 native strains of *Leishmania* and 2 reference strains, for molecular typing and we also worked evaluating the in vitro susceptibility of each of the isolated strains against Amphotericin B, miltefosine, CAT and inhibitory concentrations (IC_{50}) was determined.

Methology: Cell cultures of 51 native parasite strains and 2 reference strains were maintained, genetic material of each strain was extracted and amplification of the HSP70 gene was performed, using PCR; once obtained the amplicon the enzymatic restriction was performed (*HaeIII*), profiles were observed in agarose gel at 2%. We also elaborated susceptibility plates of 96 wells, where the strains were confronted against Amphotericin B, miltefosine and CAT (total alkaloids of *Galipea longiflora*) after 72 hours of incubation the plates were revealed with the colorimetric method XTT-PMS, thus the IC_{50} values were obtained.

Results: Molecular typing, identified areas where different species are distributed; *Leishmania amazonensis* is present mainly in the area of Cajuata (10 strains), *Leishmania braziliensis* is widely distributed in different regions of northern La Paz and the strains identified as *Leishmania lainsoni* aren't enough that's why aggrupation is not possible.. As for in vitro susceptibility when treat strains of *Leishmania amazonensis*, and *Leishmania braziliensis* with Amphotericin B was seen that these are mostly sensitive to this drug, however, strains identified as *Leishmania braziliensis* have IC_{50} values against miltefosine highly variable, with a minimum of $0 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ and the maximum of $23.8 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$. By treating strains with the total alkaloids of *Galipea longiflora* was seen that much of the strains (regardless of species) are very sensitive to this drug.

Conclusions: It was possible to demonstrate the possibility to detect the HSP70 gene using PCR of 51 native strains and 2 reference strains; we could confirm the presence of three species of *Leishmania* in the north of La Paz: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*; The colorimetric method identified those strains showing IC_{50} values discouraging and also those with favorable results; Finally it was possible mapping, using data from the identification and the geographical distribution of a total of 98 native strains studied between the IIFB and Parasitology Laboratory INLASA between the years 2009-12, we could also include in the maps those strains with discouraging results in susceptibility testing and origin.

Keywords: *Leishmania*, PCR-RFLP, IC_{50} , Amphotericin B, Miltefosine, CAT, *Galipea longiflora*, HAE III, XTT.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCION	1
2	HIPOTESIS	3
3	ANTECEDENTES	3
4	OBJETIVOS	7
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	7
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	7
5	MARCO TEORICO	9
5.1	HISTORIA DE LA <i>LEISHMANIA</i>	9
5.2	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA, FILOGENIA.....	10
5.3	EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS.....	13
5.4	TRANSMISIÓN DEL PARÁSITO	15
5.4.1	<i>Vectores</i>	16
5.5	MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA.....	17
5.6	FORMAS CLÍNICAS	20
5.6.1	<i>Leishmaniasis cutánea</i>	20
5.6.2	<i>Leishmaniasis mucocutánea</i>	21
5.6.3	<i>Leishmaniasis cutánea difusa</i>	22
5.6.4	<i>Leishmaniasis Visceral</i>	23
5.6.5	<i>Leishmaniasis dérmica post kala azar</i>	24
5.6.6	<i>Diagnóstico de leishmaniasis</i>	24
5.6.7	<i>Diagnostico parasitológico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea</i>	24
5.6.8	<i>Diagnóstico de leishmaniasis visceral</i>	25
5.6.9	<i>Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y pruebas enzimáticas ELISA</i>	25
5.6.10	<i>Diagnóstico molecular</i>	26
5.7	TRATAMIENTO.....	27
5.7.1	<i>Antimoniales</i>	27
5.7.2	<i>Anfotericina B</i>	29
5.7.3	<i>Miltefosina</i>	31
5.7.4	<i>Productos Naturales (evanta)</i>	33
5.8	CONTROL.....	35
5.9	GENOMA DE <i>LEISHMANIA</i>	36
5.10	PROTEÍNA DE CHOQUE TERMICO (HSP70) EN <i>LEISHMANIA</i>	39
5.11	IDENTIFICACIÓN O TIPIFICACIÓN DE ESPECIES.....	41
5.11.1	<i>Identificación mediante patrones de isoenzimas</i>	42
5.11.2	<i>Identificación mediante PCR</i>	42
5.11.3	<i>Identificación mediante PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado)</i>	43
6	MATERIALES Y METODOS	45
6.1	TIPO DE ESTUDIO.....	45
6.2	UNIVERSO DE TRABAJO.....	45
6.2.1	<i>Cepas</i>	45

6.3	EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO	46
6.3.1	<i>Cuali-cuantificación del material genético</i>	46
6.4	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	47
6.4.1	<i>PCR HSP70</i>	47
6.4.2	<i>RFLP HSP70</i>	48
6.5	EVALUACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	49
6.5.1	<i>Preparación de los cultivos</i>	49
6.5.2	<i>Preparación de los antiparasitarios</i>	49
6.5.3	<i>Preparación placa de 96 pozos</i>	49
6.5.4	<i>Obtención de CI_{50} por el método colorimétrico XTT-PMS</i>	50
7	DISEÑO METODOLOGICO	51
8	RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
8.1	OPTIMIZACIÓN DE LA PCR HSP70 Y RFLP	54
8.2	OPTIMIZACIÓN DE RFLP	55
8.3	CEPAS EN ESTUDIO, ORIGEN Y TIPIFICACIÓN	57
8.4	SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	61
8.4.1	<i>Susceptibilidad Leishmania amazonensis</i>	61
8.4.2	<i>Susceptibilidad Leishmania braziliensis</i>	65
8.4.3	<i>Susceptibilidad Leishmania lainsoni</i>	69
9	CONCLUSIONES	77
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
11	ANEXOS	95

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 NÚMERO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS SEGÚN EL AÑO.	4
TABLA 2 CLASIFICACIÓN DE LAS DISTINTAS FORMAS QUE ADOPTA LEISHMANIA A LO LARGO DE SU CICLO BIOLÓGICO (ROGERS ET AL., 2002).....	18
TABLA 3 COMPARACION DE EFECTO INHIBITORIO IN VITRO (IC ₉₀ (μG-ML)DE LOS ALCALOIDES AISLADOS DE LA GALIPE LONGIFLORA (FOURNET ET AL., 1994).....	34
TABLA 4 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.	46
TABLA 5 CEBADORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO	47
TABLA 6 TIPIFICACION Y PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.....	95
TABLA 7 VALORES DE CI ₅₀ DE LEISHMANIA AMAZONENSIS FRENTE A ANFOTERICINA B, MILTEFOSINA Y LOS ALCALOIDES TOTALES DE GALIPEA LONGIFLORA.....	97
TABLA 8 VALORES CI ₅₀ DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS FRENTE A ANFOTERICINA B, MILTEFOSINA Y LOS ALCALOIDES TOTALES DE GALIPEA LONGIFLORA	99
TABLA 9 VALORES DE CI ₅₀ DE LEISMANIA LAINSONI FRENTE A ANFOTERICINA B, MILTEFOSINA Y LOS ALCALOIDES TOTALES DE LA GALIPEA LONGIFLORA	101
TABLA 10 TOTAL CEPAS IDENTIFICADAS EN EL IIFB CLASIFICADAS POR AÑO DE AISLAMIENTO	105

INDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES DE <i>LEISHMANIA</i> (BAÑULS ET AL., 2007)	12
ILUSTRACIÓN 2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>LEISHMANIA</i> CUTÁNEA Y MUCOCUTÁNEA EN EL NUEVO MUNDO14	
ILUSTRACIÓN 3 ESTRATIFICACIÓN DE CASOS NOTIFICADOS COMO SOSPECHOSOS DE LEISHMANIASIS POR NIVEL DE RIESGO (MOLLINEDO ET AL., 2007)	15
ILUSTRACIÓN 4 LUTZOMYIA LONGIPALPIS (PLOS PATHOGENS ISSUE IMAGE,2009)	16
ILUSTRACIÓN 5 AMASTIGOTES DE LEISHMANIA DE ASPIRADO DE MEDULA ÓSEA. (PISCOPO ET AL. 2006)	17
ILUSTRACIÓN 6 PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA (FARIÑAS Y BURGIO).....	18
ILUSTRACIÓN 7 CICLO DE VIDA DE <i>LEISHMANIA</i> . (HTTP://WWW.CDC.GOV).....	20
ILUSTRACIÓN 8 PACIENTE CON LESIÓN CUTÁNEA (IIFB 2010)	21
ILUSTRACIÓN 9 PACIENTE CON LESIÓN MUCOCUTÁNEA (MANUAL PRÁCTICO DE TRATAMIENTO DE LEISHMANIA, 2002)	22
ILUSTRACIÓN 10 PACIENTE CON LEISHMANIASIS VISCERAL.(MANUAL PRÁCTICO DE TRATAMIENTO DE LEISHMANIA, 2002).....	23
ILUSTRACIÓN 11 ESTRUCTURA QUÍMICA DE GLUCANTIME.	27
ILUSTRACIÓN 12 ESTRUCTURA QUÍMICA DE PENTOSAM.	28
ILUSTRACIÓN 13 ESTRUCTURA QUÍMICA DE ANFOTERICINA B	29
ILUSTRACIÓN 14 ESTRUCTURA QUÍMICA DE MILTEFOSINA.....	31
ILUSTRACIÓN 15 A: ALCALOIDES TOTALES DE LA GALIPEA LONGIFLORA; B: POMADA Y JARABE A BASE DE ALCALOIDES TOTALES DE LA GALIPEA LONGIFLORA.....	33
ILUSTRACIÓN 16 ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS PRINCIPALES ALCALOIDES AISLADOS DE LA GALIPEA LONGIFLORA.	35
ILUSTRACIÓN 17 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL LOCUS HSP70 DE LEISHMANIA (HTTP://WWW2.CBM.UAM.ES)	41
ILUSTRACIÓN 18 FOTOGRAFIA DE LA ELECTROFESIS DE LOS PRODUCTOS DE LA AMPLIFICACION DEL GEN DE LA HSP70; MM MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 PB DNA LADDER; 258; 277; 295; 312; 366; 410; 073	

(CEPAS EN ESTUDIO); LMA CEPA CONTROL DE LEISHMANIA AMAZONENSIS; M2904 CEPA CONTROL LEISHMANIA BRAZILIENSIS; T.C CEPA CONTROL DE TRYPANOSOMA CRUZI; C- CONTROL NEGATIVO.	54
ILUSTRACIÓN 19 FOTOGRAFÍA DE ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE LA RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA. LMA CEPA CONTROL DE LEISHMANIA AMAZONENSIS; M2904 CEPA CONTROL LEISHMANIA BRAZILIENSIS; AS CEPA AISLADA E IDENTIFICADA COMO LEISHMANIA LAINSONI EN EL IIFB; G CEPA AISLADA E IDENTIFICADA COMO LEISHMANIA BRAZILIENSIS EN EL IIFB; C- CONTROL NEGATIVO; MM MARCADOR DE PESO MOLECULAR.	56
ILUSTRACIÓN 20 FOTOGRAFÍA DE ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE LA RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA. MM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR; 646-10, 690-10, 695-10, 130-11, 191-11, 227-11, 265-11 SON CEPAS IDENTIFICADAS COMO LEISHMANIA AMAZONENSIS; 095-11, 220-11 SON CEPAS QUE PERTENECEN A LA ESPECIE LEISHMANIA BRAZILIENSIS; LA CEPA 125-11 PRESENTA BANDAS QUE LA IDENTIFICAN COMO LEISHMANIA LAINSONI.	57
ILUSTRACIÓN 21 PORCENTAJE DE LA PROCEDENCIA Y TIPIFICACIÓN DE MUESTRAS EN ESTUDIO	60
ILUSTRACIÓN 22 L. AMAZONENSIS FRENTE A ANFOTERICINA B	62
ILUSTRACIÓN 23 L. AMAZONENSIS FRENTE A MILTEFOSINA.	64
ILUSTRACIÓN 24 L. AMAZONENSIS FRENTE A ALCALOIDES TOTALES DE GALIPEA LONGIFLORA.....	65
ILUSTRACIÓN 25 L. BRAZILIENSIS FRENTE A ANFOTERICINA B.....	66
ILUSTRACIÓN 26: L. BRAZILIENSIS FRENTE A MILTEFOSINA	67
ILUSTRACIÓN 27 L. BRAZILIENSIS FRENTE A CAT	68
ILUSTRACIÓN 28 L. LAINSONI FRENTE A ANFOTERICINA B.....	69
ILUSTRACIÓN 29 L. LAINSONI FRENTE A MILTEFOSINA	70
ILUSTRACIÓN 30 L. LAINSONI FRENTE A CAT.....	71
ILUSTRACIÓN 31 RESULTADOS GENERALES DE LAS DIFERENTES ESPECIES FRENTE A ANFOTERICINA B	72
ILUSTRACIÓN 32 RESULTADOS GENERALES DE LAS DIFERENTES ESPECIES FRENTE A MILTEFOSINA	73
ILUSTRACIÓN 33 RESULTADOS GENERALES DE LAS ESPECIES FRENTE A LOS ALCALOIDES TOTALES DE GALIPEA LONGIFLORA.	74
ILUSTRACIÓN 34 ORIGEN Y NÚMERO DE CEPAS IDENTIFICADAS COMO <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> Y CASOS POCO SENSIBLES.....	75
ILUSTRACIÓN 35 ORIGEN Y NÚMERO DE CEPAS IDENTIFICADAS COMO <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> Y <i>LEISHMANIA LAINSONI</i> Y CASOS DE BAJA SENSIBILIDAD	76
ILUSTRACIÓN 36 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE 98 CEPAS NATIVAS DE <i>LEISHMANIA SPP.</i> IDENTIFICADAS EN EL IIFB.	78
ILUSTRACIÓN 37 LOGARITMO PARA DIFERENCIAR ESPECIES PROPUESTO POR MONTALVO 2011.	102
ILUSTRACIÓN 38 FOTOGRAFÍA DE ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE CEPAS NATIVAS, TODAS IDENTIFICADAS COMO LEISHMANIA BRAZILIENSIS.	103
ILUSTRACIÓN 39 PLACAS DE 96 POZOS REVELADAS POR EL MÉTODO XTT-PMS Y SUS LECTURAS DE ABSORBANCIAS.	104

ESTUDIO MOLECULAR DE ESPECIES DE *Leishmania* Y SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO*

1 INTRODUCCION

La Leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias con distribución a nivel mundial. La leishmaniasis cutánea es la forma de leishmaniasis con mayor dispersión en el mundo, causando principalmente lesiones de la piel localizadas que pueden curar solas, pero también puede diseminarse a la mucosa nasofaríngea y causar lesiones secundarias típicas de la leishmaniasis mucocutánea o también puede diseminarse por todo el cuerpo y formar nódulos dando lugar a lo que se conoce como leishmaniasis cutánea difusa. Según la organización Mundial de la Salud la prevalencia mundial es de 12 millones de casos, con un rango de mortalidad anual de 60 000. (Monroy-Ostria; 2014). Esta parasitosis está considerada por la organización mundial de la salud (OMS) en la categoría I de las enfermedades infecciosas (situación emergente incontrolada) y según esta fuente, es endémica al menos en 88 países de cuatro continentes, en los que 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (World health organization, 2004).

La leishmaniasis forma parte del grupo de enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas, que representan pobreza y desventaja social. La falta de atención ocurre también a nivel investigativo y de desarrollo, pues el incentivo para desarrollar nuevas herramientas diagnósticas, drogas o vacunas es muy bajo, debido a que no existe un mercado interesado en los grupos sociales que padecen la enfermedad según afirma la OMS. (http://www.who.int/neglected_diseases/fag/en/index5.html)

Las principales presentaciones clínicas incluyen formas cutáneas, mucocutáneas y la leishmaniasis visceral. En todos los casos, el establecimiento y la evolución de la infección depende de factores genéticos e inmunológicos ligados al hospedero (Blackwell et al. 2009) y de la especie de *Leishmania* que parasita (Grimaldi y Tesh, 1993). Las hembras hematófagas de

insectos dípteros del género *phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomia* en el nuevo mundo, son los vectores del parásito (killick-Kendrick, 1990). Durante la infección, el parásito se enfrenta al estrés provocado por el aumento de la temperatura y el descenso del pH, por lo cual para asegurar su supervivencia en el hospedero mamífero, el parásito debe poseer mecanismo de termotolerancia que están mediados, entre otros factores, por las proteínas de choque térmico (Folguera y Requena. 2007)

El aumento en la aplicación de herramientas moleculares para la identificación de *Leishmania* ha llevado a la recomendación de que la tipificación de especies debería ser parte del procedimiento de diagnóstico (Rotureau et al. 2006; Alvar et al. 2006; Volpini et al. 2004; García et al. 2006). Esto es especialmente relevante en América Latina, donde diversas especies pueden coexistir, incluso dentro de los mismos focos endémicos, métodos basados en la PCR están disponibles para este propósito, se ha demostrado que la PCR-RFLP del gen de la HSP70 permitió la identificación de la especie de parásitos con una sensibilidad de 95 % y una especificidad del 100%. El gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática en *Leishmania* está altamente conservado y no está sujeto a selección (Folgueira y Requena 2007). Además, se demuestra que este gen permite discriminar algunas entidades del subgénero *L. (Viannia)* al utilizar diferentes restricciones enzimáticas del producto de amplificación de la PCR, por lo cual resulta ventajoso su uso (García et al. 2004).

El tratamiento de la enfermedad en cualquiera de sus formas clínicas se realiza en primera instancia con compuestos de antimonio pentavalente como el estibogluconato de sodio (pentosam) y el antimonio de meglumina (glucantime), y en segunda instancia con otras drogas, como la anfotericina B, el isotianato de la pentimidina y la miltefosina. Sin embargo, el empleo de dichos fármacos tiene varias desventajas que dificultan el tratamiento adecuado de los casos (Mesa et al. 2010).

Entre los factores adversos a los tratamientos actualmente disponibles están los esquemas terapéuticos prolongados, con altas dosis de medicamentos y por vía parenteral (intramuscular

o intravenosa, a excepción de la miltefosina que es de administración oral), los considerables efectos adversos tales como mialgias, artralgias, anorexia, náuseas y dolor de cabeza en el caso de los antimoniales, y los altos costos (Clem. 2010; Robledo et al. 2006; Mitropoulus et al. 2010), estimulan que muchos pacientes no concluyan el tratamiento, lo que favorece la reactivación de la lesión, el compromiso en mucosas y la aparición de resistencia al medicamento (Robledo et al. 1999).

Las desventajas asociadas a los medicamentos disponibles y la variabilidad de respuesta a estos que presentan las especies de *Leishmania* han evidenciado la necesidad urgente de monitorear la eficacia del tratamiento y la emergente resistencia a las drogas en uso. (Mesa et al. 2010; Bhandari et al. 2012). Los sistemas *in vitro* son útiles en la evaluación de compuestos con actividad biológica, permitiendo por ejemplo, determinar el potencial citotóxico y leishmanicida de un compuesto.

2 HIPOTESIS

El análisis de la amplificación y posterior restricción del gen de la proteína de shock térmico, HSP70, permite diferenciar entre especies de *Leishmania*; el método colorimétrico XTT es una herramienta importante para determinar la susceptibilidad a los antiparasitarios utilizados, previo a su uso clínico.

3 ANTECEDENTES

Bolivia, con una población aproximada de 10.027.643 habitantes (2011), se distribuye irregularmente en 1.098.581 Km² de superficie, de los cuales, el 70 % del territorio corresponden áreas subtropicales y tropicales, estas zonas son áreas endémicas para la Leishmaniasis. En la actualidad la enfermedad está distribuida con reportes de casos autóctonos en 7 de los 9 departamentos, con excepción de Oruro y Potosí. Se calcula que existen aproximadamente 2.500

nuevos casos por año y se puede inferir que las Leishmaniasis al igual que otras enfermedades transmitidas por vectores (Dengue, Malaria, Enfermedad de Chagas), tienden a aumentar. (Norma de vigilancia y control de leishmaniasis en Bolivia, 2012). Aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de enfermar con leishmaniasis (Mollinedo S. 2007).

El laboratorio de parasitología del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (LP-INLASA) es una institución dependiente del Ministerio de Salud y Deportes, es el laboratorio de referencia para el diagnóstico de Leishmaniasis. En la siguiente tabla se ve que en la última década la cantidad de pacientes que acudieron al laboratorio para el diagnóstico de leishmaniasis aumentó significativamente, desde el 2001 al 2011 el aumento es más de un 400%.

Tabla 1 Número de muestras para el diagnóstico de Leishmaniasis según el año.

Año	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Muestras	141	172	138	142	195	221	388	460	461	740	590

Fuente: LP-INLASA

Desde el año 2007 al 2011 han acudido al LP-INLASA 2639 pacientes para diagnóstico de leishmaniasis, de los cuales 87% son casos positivos, esto representa a 2296 pacientes infectados con leishmaniasis en 5 años. Las técnicas utilizadas en este laboratorio permiten diagnosticar la enfermedad, mas no permiten diferenciar la especie de parásito infectante.

La identificación y diferenciación de especies de *Leishmania* es compleja debido a la similitud genética entre estas, sin embargo, el uso de técnicas moleculares han facilitado este tipo de análisis y permite la diferenciación a nivel de especie para las cepas de *Leishmania*, por lo que es una herramienta útil en la epidemiología de este parásito, lo que permite identificar los brotes de especies circulantes en áreas endémicas. La identificación de especies es altamente relevante para mejorar el pronóstico y proporcionar el tratamiento adecuado para la leishmaniasis, métodos basados en PCR están disponibles para este propósito. Esta técnica se ha aplicado en

muchos países latinoamericanos como Bolivia, donde pudieron diferenciar entre cepas de *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L.(L.)amazonensis* (García et al. 2004), en Minas Gerais-Brasil, estudiaron y probaron el método basado en PCR-RFLP (HSP70) para el diagnóstico e identificación de la *Leishmania* causante de Leishmaniasis cutánea americana en pacientes de un área endémica (Volpini et al. 2004), y en Colombia se analizaron cepas de diferentes orígenes geográficos con el método de PCR-RFLP para la tipificación y diferenciación de las mismas (Montalvo et al. 2010).

El tratamiento de la enfermedad en cualquiera de sus formas clínicas se realiza en primera instancia con compuestos de antimonio pentavalente como el estibogluconato de sodio (pentosam) y el antimonio de meglumina (glucantime), y en segunda instancia con otras drogas, como la anfotericina B, el isotionato de la pentimidina y la miltefosina. Sin embargo, el empleo de dichos fármacos tiene varias desventajas que dificultan el tratamiento adecuado de los casos.

Se han realizado diferentes acciones para controlar la enfermedad, a pesar de ello, se han detectado las siguientes debilidades: Recursos humanos, capacitación para realizar diagnóstico y tratamiento insuficiente, dificultad en la disponibilidad oportuna de medicamentos para el tratamiento, deficiente vigilancia epidemiológica que se ve reflejada en el sub registros de información, esto repercute en la planificación y dotación oportuna de medicamentos y otros insumos para diagnóstico y tratamiento. El conocimiento sobre la epidemiología de la leishmaniasis es insuficiente, el fortalecimiento Institucional en todos los niveles de salud es deficiente. (Norma de vigilancia y control de leishmaniasis en Bolivia, 2012).

En Bolivia, se administra como tratamiento los antimoniales pentavalentes (SbV), Anfotericina-B, pentamidina y recientemente se introdujo la miltefosina (Soto et al. 2007; Soto et al. 2008), la actividad de estos compuesto varía de acuerdo a la especie de *Leishmania* involucrada. El mal uso de los medicamentos y la mala administración ya sea por bajas dosis y tratamientos discontinuos son una de las razones que llevan a fallas terapéuticas y aparición de formas de resistencia (Gil et al. 2007) como es el caso del glucantime, que se encuentra bien documentado en países como la India (Osorio et al. 2005), a su vez también se observa una disminución de la

sensibilidad al tratamiento de la Anfotericina B el cual fue reportado en cepas de pacientes tomadas tras varias recaídas al tratamiento(Soto et al. 2007), lo mismo sucede en pacientes con *L.visceral* coinfectados con VIH (Ritmeijer et al. 2011) y se tendría una cura de solo del 50% de pacientes con Leishmaniasis mucocutanea en un ensayo realizado en Palos Blancos–Bolivia(Soto J et al. 2007).

Este estudio es importante para contribuir con información epidemiológica actualizada de la enfermedad, teniendo en cuenta que los datos respecto leishmaniasis en Bolivia más actuales datan del año 2007.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Proporcionar información molecular, relacionada con la clasificación taxonómica de parásitos de *Leishmania* circulantes en Bolivia en el departamento de La Paz, útil para la epidemiología de la enfermedad.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Adaptar las cepas aisladas, a cultivos *in vitro*, para estudios moleculares y Biológicos en los laboratorios del IIFB.
- Extraer el material genético, de los cultivos, para su tipificación taxonómica mediante la amplificación y restricción de fragmentos del gen de la HSP70.
- Determinar los niveles de susceptibilidad, *in vitro*, de las cepas adaptadas frente a Anfotericina B, Miltefosina y a los alcaloides totales de *Galipea longiflora* (CAT).
- Elaborar mapas sobre la distribución geográfica de las especies identificadas, incluyendo los datos de susceptibilidad *in vitro*.

CAPITULO I

5 MARCO TEORICO

5.1 Historia de la *Leishmania*

Las primeras referencias a la enfermedad producida por *Leishmania* en el Nuevo Mundo se remontan a textos del periodo Inca y otros del periodo de la colonización española, donde se mencionan los riesgos a que se sometían los agricultores que ternaban de Los Andes con úlceras cutáneas (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/>). Posteriormente, se reportó en Perú y Ecuador el hallazgo de piezas de cerámica precolombinas antropomórfica de la cultura Moche (huacos), con representaciones de lesiones similares a lo que hoy conocemos como leishmaniasis mucocutánea, lo que puede constituir una evidencia de que esta enfermedad ya afectaba a las poblaciones americanas preincaicas (World Health Organization. 2004).

Por otro lado, Alexander Russel describe en 1756 una lesión cutánea en forma de úlcera redondeada de bordes bien definidos e hipertróficos que denomina Botón de Aleppo, que parece corresponderse con leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo, y más tarde en 1901, se describen por William Leishman numerosos cuerpos ovalados intracelulares que observa en frotis del bazo de un soldado irlandés muerto por fiebres en la India, al mismo tiempo que Charles Donovan en Madrás, encuentra resultados similares al analizar frotis de bazos de pacientes indios que supuestamente habían muerto por malaria. Dos años más tarde, Ronald Ross relaciona estos organismos con la enfermedad conocida entonces como “kala-azar” y sugiere denominar el nuevo parásito como *Leishmania donovani*. (Herwaldt. 1999)

En Sud América, Cosme Bueno el año 1904, relacionó a un vector volador la transmisión de la Uta, forma mucocutánea de la leishmaniasis producida generalmente por la *L. braziliensis* y *L. peruviana*. El primer caso de leishmaniasis en el nuevo mundo fue descrito en 1890 por Linderberg, Carini y Paranhos, quienes demostraron en forma independiente la presencia de amastigotes de *Leishmania* en pacientes brasileños con lesiones cutáneas. En 1911 Vianna propone el nombre de *L. braziliensis* para los agentes causales de lesiones cutáneas en Minas

Gerais (Brasil). En 1948, Convit y Lapenta describen el primer caso de leishmaniasis difusa en Venezuela (González et al. 2004).

Los casos autóctonos en Bolivia fueron desconocidos hasta que Gatti en 1939 confirmó por necropsia en un soldado paraguayo, prisionero de la guerra del Caco y trasladado a la zona de los Yungas donde permaneció 18 meses. En 1942 se publicó otro caso humano en Santa Ana, departamento de Santa Cruz (Monteiro de Barros O, Rosenfeld G., 1942). En 1949 se reportó la detección de otro nuevo caso de infección en un trabajador brasileiro que presumiblemente se infectó mientras trabajaba entre la ciudad de Santa Cruz y la frontera boliviana-brasilera (Arruda et al., 1949). En 1982 otros investigadores confirmaron la presencia de Kala-azar visceral humana y canina considerando a este último como reservorio del parásito (Angels et al., 1982), mientras otro estudio demostró la presencia del vector *Lutzomyia longipalpis* en la zona de los Yungas paceños (Le Pont et al., 1989; Le Pont y Desjeux., 1983). En Bolivia la leishmaniasis antiguamente era conocida como una enfermedad rural rara, presente solamente en “Los Yungas” de Departamento de La Paz; en la actualidad se ha expandido en diferentes lugares del país alcanzando grandes áreas de hasta 7 departamentos de Bolivia (Mollinedo et al. 2000)

5.2 Clasificación taxonómica, filogenia

La clasificación taxonómica de este parásito es un problema importante en la actualidad. Inicialmente, se basó en criterios eco biológicos tales como: el vector implicado en la transmisión, distribución geográfica, tropismo, propiedades antigénicas y manifestaciones clínicas de la enfermedad que produce (Lainson y Shaw. 1987). Con posterioridad, la aplicación de la taxonomía numérica y las técnicas cladísticas a los datos electroforéticos obtenidos del análisis de patrones de isoenzimas (MLEE siglas en inglés) condujo a un sistema de clasificación de especies que se mantiene vigente (Rioux et al. 1990).

El advenimiento de la biología molecular favorece en los últimos años el acceso a secuencias nucleotídicas y aminoacídicas que aportan una gran cantidad de datos útiles para el análisis

filogenético. En este sentido, se utilizan varios marcadores moleculares, entre ellos: ITS (Cupolillo et al. 1995; Villinski et al. 2008), los genes que codifican la citocromo oxidasa II (Ibrahim y Barker, 2001), el gen *gp63* (Mauricio et al. 2007), gen que codifica el citocromo b (Asato et al, 2009) y otros. También se propone que los genes que codifican para proteínas altamente conservadas como el factor de elongación 1 (EF-1); la proteína HSP70, y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) son candidatos útiles para realizar estudios de sistemática molecular en kinetoplástidos (Momen y Cupolillo. 2000).

De acuerdo a la última clasificación propuesta (Moreira et al. 2004), este parásito se clasifica como:

Phylum : *Euglenozoa*

Clase: *Kinetoplastea*

Subclase: *Metakinetoplastina*

Orden: *Trypanosomatida*

Género: *Leishmania*

Subgénero: *Leishmania*

Subgénero: *Viannia*

Los dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia* han sido separados sobre la base del desarrollo de la localización en el intestino del vector por Lainson y Shaw, quienes propusieron los complejos y la reagrupación en diferentes subespecies: Hipopilaria (*Leishmania* desarrollada en el intestino medio), Peripilaria (*Leishmania* desarrollada en el píloro), y Suprapilaria (todas las especies que se desarrollan en la parte anterior del píloro), es de esta forma que las secciones Piliaria y Suprapilaria fueron designadas al sub género *Leishmania*, mientras a la sección Hipopilaria se

encuentra la especie *Sauroleishmania*, por lo tanto se dividió el género *Leishmania* en dos subgéneros (sub-género *Leishmaniasensu stricto* para la sección suprapilaria y el sub-género *Viannia* para la sección peripilaria), posteriormente utilizando el análisis de isoenzimas se confirma y se definen los complejos de las especies dentro de estos subgéneros. Con respecto al nombramiento, se readaptó la terminología binominal, por ejemplo *L. guyanensis* (aislado de Guyana), *L. peruviana* (aislado de Perú), *L. infantum* (aislado de un niño en Tunisia). La utilización de técnicas moleculares ha permitido la publicación del esquema taxonómico por la Organización Mundial de la Salud (WHO), hasta hoy en día se conocen 30 especies y aproximadamente 22 son patógenas para el ser humano.

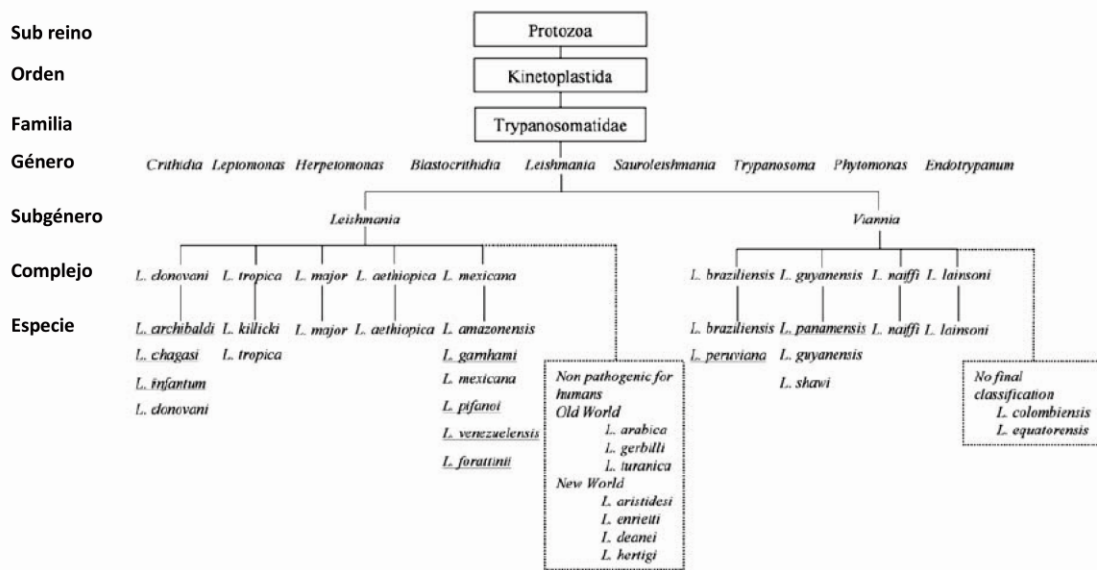


Ilustración 1 Clasificación taxonómica de las Especies de *Leishmania* (Bañuls et al., 2007)

5.3 Epidemiología de la Leishmaniasis

La prevalencia mundial de leishmaniasis es de 12 a 14 millones de pacientes y la incidencia es más de 2 millones de casos nuevos por año, de los cuales 1,5 millones corresponden a leishmaniasis cutánea y 500 mil a leishmaniasis visceral. Hasta el momento se han identificado 22 especies que pueden ocasionar la enfermedad en el humano.

Esta enfermedad es endémica en 88 países (22 del Nuevo Mundo y 66 países del Viejo Mundo), se estima que la población en riesgo es de 350 millones de personas. La distribución geográfica de la leishmaniasis es particular en regiones tropicales, áreas donde se desarrollan generalmente los vectores flebótomos, en varios países se han identificado infecciones en áreas urbanas y periurbanas sobre todo en temporadas lluviosas y calurosas. Aproximadamente el 90% de los casos de la formas cutáneas ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria, mientras otro 90% de las casos de leishmaniasis visceral son reportados en Bangladesh, India, Nepal y Sudan (Salotra y Singh 2006).

Datos indican que el número global de casos incrementó, particularmente en Brasil, Bolivia y Perú (Davies et al. 2000), Colombia y Afganistán (Reithinger et al. 2003). Tal incremento puede ser resultado del inadecuado control de vectores y reservorios en las zonas endémicas, del incremento de detección de leishmaniasis cutánea asociada a infecciones oportunistas (VIH/SIDA) (Molina et al. 2003), de la emergente resistencia al tratamiento (Croft et al. 2006) y del impacto reciente de los cambios climáticos, que inciden en la distribución y comportamiento de los vectores implicados en la transmisión de distintas enfermedades entre ellas, la *Leishmania*. La leishmaniasis está distribuida en gran parte de Sur América, en Venezuela, Ecuador, Brasil, Perú y otras zonas tropicales. El único país donde no se reporta casos de leishmaniasis es en Chile (Cárdenas et al. 2006).



Ilustración 2 Distribución geográfica de *Leishmania* cutánea y mucocutánea en el nuevo mundo (<http://www.who.int>)

Es muy probable que como consecuencia del calentamiento global la leishmaniasis se disperse hacia zonas actualmente templadas, donde los incrementos de temperatura pudieran favorecer la extensión de las estaciones en que se alimentan los vectores que transmite el parásito, o que la baja temperatura provoque una extensión de su periodo larval.

En Bolivia se ha podido certificar que circulan 4 especies parasitarias: *Leishmania (v)braziliensis*; *Leishmania (L)amazonensis*; *Leishmania (L)chagasi* y *Leishmania (V)lainsoni*; la primera especie es agente de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (LCM); la segunda de leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD), estas dos especies tiene un claro predominio en los índices epidemiológicos nacionales para la enfermedad; la tercera es agente de leishmaniasis visceral (LV) y la cuarta produce raros casos de leishmaniasis cutánea(LC),estas dos últimas especies generan casos clínicos esporádicos.(Cárdenas., 2011).

En la zona de los Valles interandinos (Los Yungas), dos especies tienen un papel vectorial importante: *Lutzomyia longipalpis* (especies dominante en peridomicilio), es el vector de

Leishmania (L) chagasi y *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (especie predominante en los cafetales y foresta residual), es el vector de *L.(L)amazonensis* y *L (V)braziliensis*, esta última especie parasitaria es la más prevalente en nuestro medio sobre todo en el Chapare (alrededor de 1440 casos por año, Isiboro-Secure), las transmisiones selvática y/o peri domiciliaria infecta en su mayoría a personas del género masculino, esta enfermedad en nuestro medio se encuentra distribuida geográficamente por lo general en el área rural de las zonas tropicales y subtropicales de los departamentos de La Paz (Ilustración 3) Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Sucre. (Cárdenas., 20011)

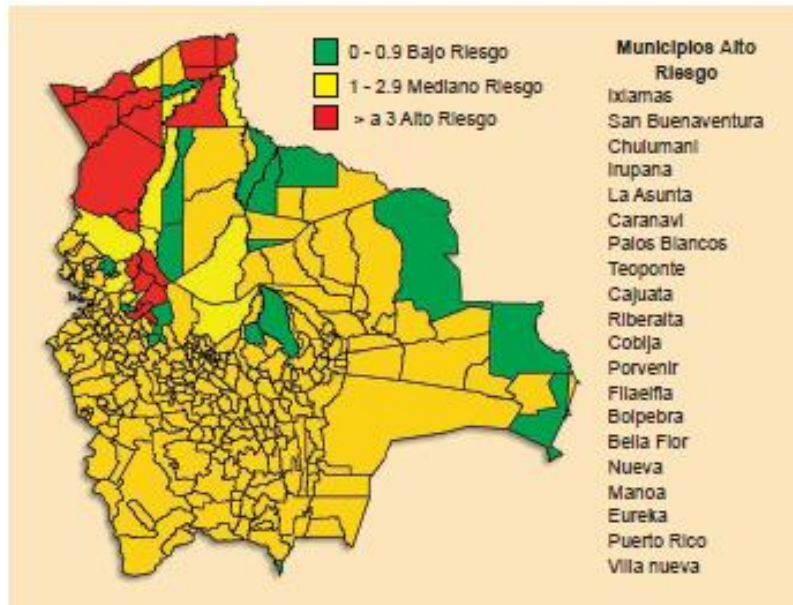


Ilustración 3 Estratificación de casos notificados como sospechosos de leishmaniasis por nivel de riesgo (Mollinedo et al., 2007)

5.4 Transmisión del parásito

La forma infectiva del parásito es el promastigote metacíclico, que se inocula en el mamífero mediante la picadura del insecto y cuya transmisión constituye un ejemplo típico de antropozoonosis. Por otra parte, aspectos relacionados con la conducta humana, como

urbanización y destrucción de los bosques (Desjeux, 2001) y el incremento del turismo, provocan la migración de población susceptible hacia áreas endémicas y favorecen la dispersión de *Leishmania* hacia áreas donde previamente no ocurría transmisión.

5.4.1 Vectores

Los vectores de todas las especies de *Leishmania* descritas son hembras hematófagas de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Plebotominae* y de las 500 especies conocidas, solo 31 se identifican como vectores de especies patógenas y 43 como vectores probables, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Killick-Kendrick, 1990).



Ilustración 4 Lutzomyia longipalpis (PLoS Pathogens Issue Image, 2009)

Estos flebotomíneos presentan una gran variedad de hábitats prefieren las zonas húmedas y oscuras entre las que predominan las selvas tropicales y los huecos de árboles, aunque se les puede encontrar en desiertos, en las madrigueras de los roedores o dentro del domicilio (Fuentes, 2001). Mientras se alimentan, su saliva deposita en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado, junto a los parásitos inoculados, sustancias vasodilatadoras, anti-hemostáticas, anti-inflamatorias o con actividad inmunosupresora, que incrementan el riego sanguíneo en el sitio de la picada (Charlab et al. 1999) e inhiben los mecanismos microbicidas de

los macrófagos receptores, todo lo cual favorece el establecimiento de la infección. (Guerin et al. 2002).

5.5 Morfología y ciclo de vida

Los parásitos presentan dos formas morfológicamente distinguibles: amastigote y promastigote. El primero se localiza en el interior de las células de sistema fagocítico mononuclear incluyendo macrófagos, monocitos y células de Langerhans (Ilustración 5). Su forma es ovalada o redondeada, con dimensiones que oscilan entre 3-5 μm de ancho. Posee un núcleo voluminoso generalmente excéntrico, y un blesfaroplasto, de donde se forma el flagelo, que está próximo a una mitocondria modificada llamada kinetoplasto (Tabla 2). El citoplasma es granular y vacuolado.

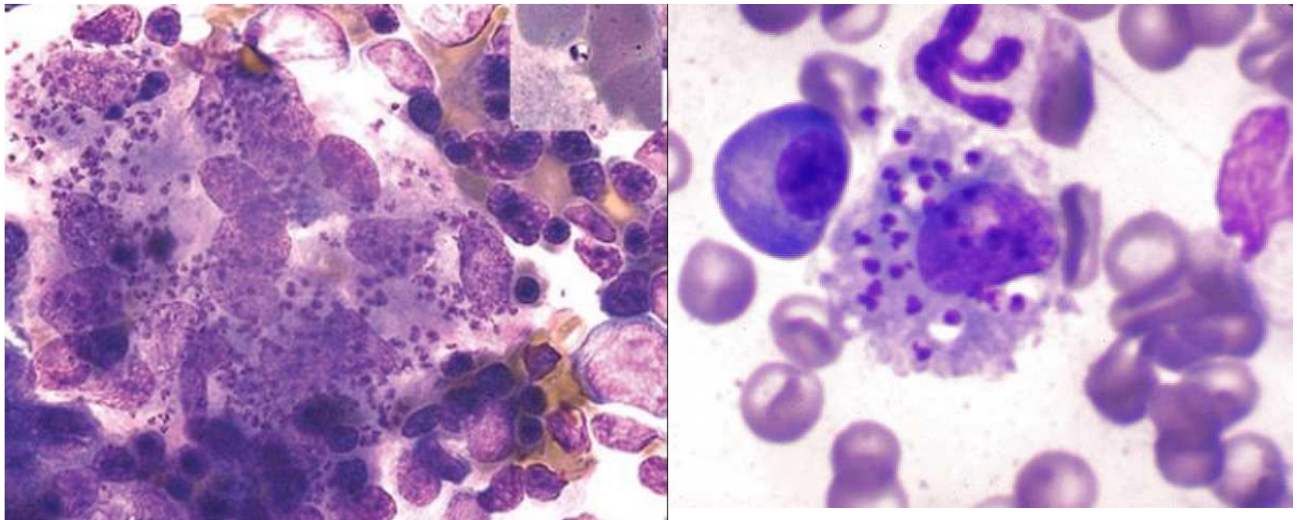


Ilustración 5 Amastigotes de Leishmania de aspirado de medula ósea. (Piscopo et al. 2006)

La forma de promastigote, en cambio, es fusiforme, extracelular, móvil y presenta un tamaño mayor. Su talla varía entre 10-30 μm de largo y 1.5-3 μm de ancho. Tiene un núcleo oval central y un kinetoplasto terminal o subterminal en la parte anterior del parásito, de la cual se origina el flagelo (Alvar, 2003).

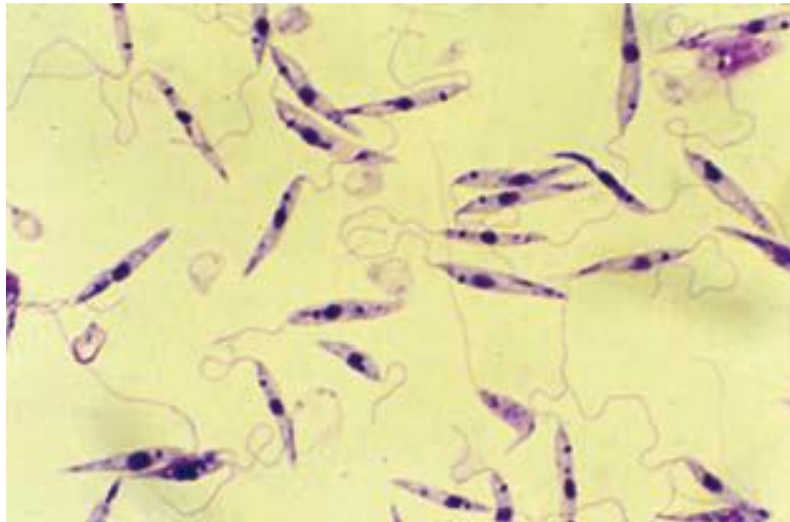


Ilustración 6 Promastigotes de Leishmania (Fariñas y Burgio)

Tabla 2 Clasificación de las distintas formas que adopta Leishmania a lo largo de su ciclo biológico (Rogers et al., 2002)

MORFOLOGIAS	LONGITUD	FLAGELO	ANCHURA	IMAGEN
Amastigote	Ovoide	no	2-5 μm	
Promastigote procíclico	6'5 - 11'5 μm	flagelo < cuerpo	variable	
Promastigote nectomonas	$\geq 12 \mu\text{m}$	variable	variable	
Promastigote leptomonas	6'5 - 11'5 μm	variable	variable	
Promastigote haptomonas	variable	Pequeño flagelo con forma de disco	variable	
Promastigote metacíclico	$\leq 8 \mu\text{m}$	flagelo > cuerpo	$\leq 1'0 \mu\text{m}$	

El ciclo de vida se alterna entre un hospedero mamífero y un insecto vector. Entre los primeros se encuentran el hombre, caninos, roedores salvajes, pequeños marsupiales y simios (Lainson y Shaw, 1987) y puntualmente se reportan equinos y felinos.

Los promastigotes inoculados mediante la picadura del vector son captados por las células del sistema fagocítico mononuclear. Esta interacción está mediada por distintas moléculas de la superficie del parásito, que actúan como ligandos para su unión con el macrófago, destacándose la proteína de 63 kDa(gp63) y los lipofosfoglicanos (LPG)(Alexander et al. 1999). Como resultado se forma una vacuola parasitófora, en cuyo interior se transforman en amastigotes, que se multiplican activamente mediante sucesivas divisiones por fisión binaria. La proliferación no controlada del parásito propicia el estallido del macrófago, quedando parásitos libres para invadir otras células, o ser re-fagocitados, propagándose de esta forma a través de la circulación, hacia los tejidos (Alvar, 2003). Seguidamente, las hembras de los vectores pican al hospedero vertebrado en busca de sangre para poder alimentarse y desarrollar sus huevos, tomando parásitos en forma de amastigotes que se transforman en promastigotes en el tubo digestivo y pasan de procíclicos, no infectivos y que se multiplican activamente, a metacíclicos, forma no replicativa con elevada infectividad. La metaciclogenesis, proceso mediante el cual la estructura molecular de la superficie del parásito se transforma, favorece su separación de las paredes del intestino del vector y la migración hacia faringe y la zona bucal, desde donde pasan al hospedero vertebrado durante la picada (Pimenta et al. 1992) completando así el ciclo de vida.

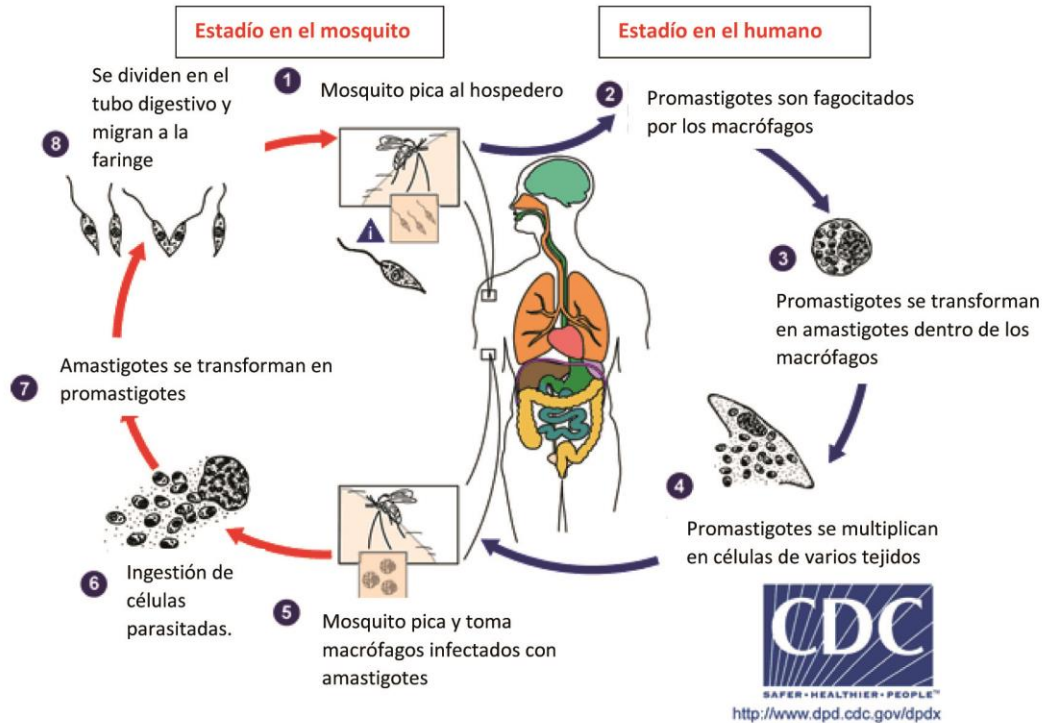


Ilustración 7 Ciclo de vida de *Leishmania*. (<http://www.cdc.gov>)

5.6 Formas clínicas

Diversos estudios genéticos muestran que en el hombre y en ratones, existen múltiples *loci* que influyen en la susceptibilidad al parásito y están implicados en la respuesta inmunológica, innata y adquirida (Blackwell et al. 2009). Se reconocen las formas clínicas que se describen a continuación.

5.6.1 Leishmaniasis cutánea

En promedio, se puede hablar de un periodo de incubación entre 2 y 3 semanas, después aparece una pequeña lesión inicial frecuentemente visible, pero no siempre, que tiene asiento en las partes descubiertas, principalmente en la cara y en las piernas, que puede dar lugar a una

diminuta excoiación por el rascado, que se transforma en una exulceración y posible punto de partida de un proceso ulcerativo. La úlcera característica de la leishmaniasis es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados y cortados en forma de sacabocado e indurada que recuerda la imagen de un cráter. Si hay una infección bacteriana sobre agregada, la úlcera se torna dolorosa, exudativa y purulenta. La piel alrededor de la lesión presenta aspecto y coloración normales (Sánchez Saldaña et al. 2004)



Ilustración 8 Paciente con lesión cutánea (IIFB 2010)

5.6.2 Leishmaniasis mucocutánea

Las manifestaciones clínicas de la forma mucocutánea se presentan muchos meses o años después haber cicatrizado la forma cutánea; ocasionalmente aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel (Sánchez Saldaña et al. 2004).

Las lesiones mucosas se inician principalmente a nivel del tabique nasal cartilaginoso (septum cartilaginoso) y, raramente, en el piso de la nariz (Ilustración 9). Pero, pueden comenzar en otras partes de las vías aéreas superiores. Luego, se compromete el cartílago y se produce la perforación del tabique, que si destruye parcial o totalmente el tabique determinará la caída de la punta de la nariz (Sánchez Saldaña et al. 2004). Ocurre por diseminación hematológica o linfática de los parásitos desde la piel hasta la mucosa oro faríngea (Barral et al. 1995).



Ilustración 9 Paciente con lesión mucocutánea (Manual Práctico de tratamiento de *Leishmania*, 2002)

5.6.3 Leishmaniasis cutánea difusa

La leishmaniasis cutánea difusa ocurre en un huésped anérgico con pobre respuesta inmune celular. La enfermedad se inicia bajo la forma de lesiones localizadas, de aspecto nodular o en placa infiltrada, que poco a poco se diseminan a todo el cuerpo. La presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas, úlceras y, algunas veces, lesiones verrucosas de límites imprecisos, que se confunden con la piel normal, dan el aspecto de la lepra lepromatosa. La enfermedad no invade órganos internos. (Sánchez Saldaña et al. 2004)

La leishmaniasis cutánea difusa puede ser causada por *L. aethiopica*. En América central y Sudamérica es más comúnmente causada por la *L. mexicana amazonensis*.

En examen histopatológico muestra frecuentemente atrofia de la epidermis y granulomas bien constituidos con predominios de células de citoplasma vacuolado llenas de parásitos, en la dermis (Grevelink et al. 1996). Las lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento.

5.6.4 Leishmaniasis Visceral

La Leishmaniasis visceral es una enfermedad parasitaria sistémica que compromete la vida, causada por el complejo *L. donnovania* y transmitida por mosquitos flebotomíneos. La enfermedad es endémica en muchas zonas tropicales y subtropicales del mundo. El complejo *L. donovani* incluye a las *L. donovani* en el subcontinente Indio, Asia y África; a la *L. infantum*, en el mediterráneo y *L. chagasi* en Sudamérica. En el oriente medio se han encontrado cepas de *L. tropica* que causan enfermedad visceral.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral típica están asociadas con fiebre, la que casi siempre es progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles, que también duran semanas. En la fase crónica, la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa iliaca derecha, con abultamiento considerable del abdomen (Sánchez Saldaña et al. 2004).



Ilustración 10 Paciente con Leishmaniasis visceral.(Manual Práctico de tratamiento de *Leishmania*, 2002)

5.6.5 Leishmaniasis dérmica post kala azar

Se presenta tras la resolución aparente de la enfermedad visceral y se manifiesta como lesiones dérmicas en forma de placas hipopigmentadas o nódulos indurados dispersos por la piel. Las personas que desarrollan esta manifestación crónica constituyen verdaderos reservorios, por la presencia de nódulos cargados de parásitos en algunas zonas del cuerpo (Alvar. 2003).

5.6.6 Diagnóstico de leishmaniasis

El espectro clínico de las leishmaniasis es muy amplio y puede confundirse con otras enfermedades. Por esto es de gran importancia el diagnóstico temprano, ya que nos permite instaurar el tratamiento específico lo antes posible y así controlar la evolución de la enfermedad, aliviar los síntomas, evitar las secuelas y mortalidad.

Los hallazgos clínicos y epidemiológicos no son concluyentes de la enfermedad, por lo cual es necesario el diagnóstico por laboratorio para confirmar la sospecha clínica de la leishmaniasis.

5.6.7 Diagnóstico parasitológico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea

Los métodos parasitológicos son muy específicos pero poco sensibles. Estos incluyen el examen microscópico de extendidos, improntas, biopsias o aspirados, tomados por lo general del borde de las lesiones y teñidos con Giemsa, o el examen histopatológico para realizar la búsqueda de amastigotes (Bailey y Lockwood, 2007).

El cultivo es una técnica parasitológica que se basa en la detección de las formas promastigotes de *Leishmania* mediante el uso de medios de cultivos enriquecidos. Constituye una técnica confirmatoria para el diagnóstico de leishmaniasis, debido a que las formas amastigotes provenientes de una lesión sospechosa o de aspirado medular, al ser inoculados en los medios de cultivo enriquecidos se transforman en promastigotes los cuales se multiplican facilitando su detección. La sensibilidad del método de cultivo es variable, depende, de la selección del medio

de cultivo a utilizar, de la habilidad del personal de laboratorio para elegir el sitio de mayor actividad parasitaria en la lesión, el tiempo de evolución de las lesiones y el grado de sobreinfección de las lesiones cutáneas o mucosas (Norma de vigilancia y control de Leishmaniasis en Bolivia, 2012).

5.6.8 Diagnóstico de leishmaniasis visceral

El diagnóstico diferencial incluye malaria, síndrome de esplenomegalia tropical, esquistosomiasis, cirrosis, tripanosomiasis africana, tuberculosis, brucelosis, fiebre tifoidea, endocarditis bacteriana, histoplasmosis, malnutrición, linfoma y leucemia (Bailey y Lockwood, 2007). En estos casos la muestra para el examen parasitológico directo se toma del aspirado de bazo, nódulos linfáticos o medula ósea (Herwaldt, 1999).

El diagnóstico indirecto se basa en la presencia de anticuerpos específicos, como los ensayos serológicos de ELISA, IFI y Western Blot que muestran una alta seguridad diagnóstica, pero son poco adaptables a condiciones de campo. La prueba de aglutinación directa (DAT) es un ensayo semi-cuantitativo donde ocurre aglutinación visible si existen anticuerpos (Harit et al. 1986).

5.6.9 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y pruebas enzimáticas ELISA.

Estas pruebas detectan anticuerpos antileishmania circulantes en el suero del paciente a títulos bajos. En las lesiones ulceradas por *L. braziliensis* la sensibilidad a la IFI está en torno del 70% dentro del primer año de iniciada la enfermedad. Algunos pacientes son persistentemente negativos (Sánchez Saldaña et al. 2004).

Las lesiones múltiples, tanto cutáneas como mucosas, están asociadas a títulos más altos. De otro lado, las lesiones mucosas presentan títulos más altos que las lesiones cutáneas y muestran títulos altos persistentemente. Después del tratamiento y la cura clínica en ambas formas de la

enfermedad, los títulos caen o desaparecen completamente. Un tercio de los pacientes permanecen seropositivos después de los 30 años de enfermedad.

El polipéptido recombinante de 39 kilodalton: rK39 se utiliza en países endémicos en un sistema ELISA de detección de anticuerpos con excelentes valores de sensibilidad (93-100%) y especificidad (97-98%) (Braz et al. 2002).

5.6.10 Diagnóstico molecular

5.6.10.1 Diagnostico mediante PCR

La PCR permite la amplificación selectiva de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante síntesis enzimática y se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la leishmaniasis, pues permite detectar el ADN presente en una biopsia aun en cantidades mínimas (fentogramos) o lo que es igual hasta un solo parásito (Bensoussan et al. 2006).

En las formas cutáneas, la PCR es la herramienta diagnóstica de más valor y la sensibilidad puede alcanzar hasta el 100% (García et al.,2006). En la enfermedad mucocutánea la utilización de kDNA como diana genética resulta muy sensible para detectar los parásitos, mientras que los genes que codifican ITS son más útiles para discriminar entre especies que producen esta forma clínica en Brasil (Ovale-Brancho et al.2007).

En la leishmaniasis visceral, la detección de parásitos por PCR es más sensible que el examen microscópico en los aspirados y se recomienda realizar la evaluación de pacientes sospechosos en sangre periférica, antes de proceder al examen sobre aspirado o biopsia. En un estudio comparativo reciente se reporta que en sangre periférica y en muestras de medula ósea es altamente sensible y específica para el diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Antinori et al. 2007). También puede ser útil para detectar los parásitos cuando hay peligro potencial para la transmisión de kala-azar mediante transfusión, en cuyo caso la serología tiene un papel muy limitado (Otero et al. 2000). En el

diagnóstico de la leishmaniasis cutánea post-visceral o post kala-azar se describe un protocolo que utiliza cebadores que amplifican kDNA, que por su alta especificidad, resulta muy útil para el diagnóstico de pacientes inmunocomprometidos, donde el diagnóstico serológico falla a menudo (Salotra et al.2003).

5.7 Tratamiento

5.7.1 Antimoniales

Existen dos tipos de sales de antimonio, los antimoniales trivalente y pentavalentes; los antimoniales pentavalentes son las drogas anti leishmaniasis, fueron utilizadas a partir del inicio del siglo XX.

Existen dos formulaciones disponibles en el comercio internacional, aunque en nuestro país solo encontramos el primero:

- Antimoniato de N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina o Glucantime®)

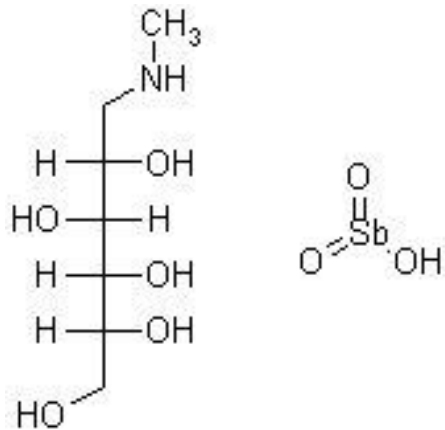


Ilustración 11 Estructura química de Glucantime.

- Stibogluconato de sodio (Pentosaam)

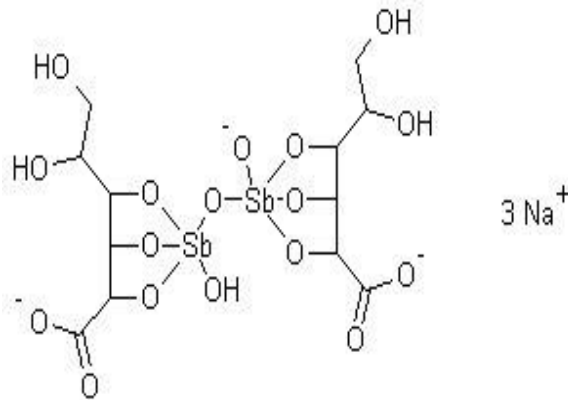


Ilustración 12 Estructura química de Pentosam.

Los antimoniales pentavalentes son inoculados en el paciente, para poder ejercer su acción tiene que convertirse en trivalentes en el interior de los macrófagos, estos antimoniales trivalentes reaccionan con los grupos sulfhidrilos del parásito, dando como resultado la inhibición de su glucólisis y la oxidación de sus ácidos grasos, con lo que se reduce la forma de energía (ATP) (Manual práctico de tratamiento de Leishmaniasis, INLASA, 2002).

Los antimoniales pentavalentes se absorben bien por vía parenteral; por vía intramuscular (VIM) a razón de 10 mg/L en 1 o 2 horas, y por vía intravenosa en forma inmediata cuando la inyección a sido 10 mg/kg. La indicación de un tratamiento fraccionado cada 8 horas durante 10 días a razón 10 mg/kg es tan eficaz como la de 20 mg/kg/día durante 30 días en una inyección diaria. El medicamento se elimina en forma rápida pero incompleta por vía renal, una pequeña fracción de antimoniales trivalentes permanecen en el cuerpo por un lapso medio de tres días, existe posibilidad de que queden concentraciones residuales (Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis, INLASA, 2002).

Los efectos colaterales más frecuente son: fiebre mialgias, vómitos, ictericia, tos coqueluchoide, erupción cutánea, malestar general, anorexia, anemia. Es necesario valorar al paciente, tratando de detectar temprano una eventual hepatotoxicidad, nefrotoxicidad o cardiotoxicidad, por lo que

se aconseja la realización de perfil hepático y renal en laboratorio y un electrocardiograma antes del tratamiento y cada 10 días durante el mismo, de esta manera se evitara posibles accidentes mortales rara vez citados. Las contraindicaciones para la utilización de esta droga son: cirrosis hepática o insuficiencia hepática, embarazo, lactancia, desnutrición severa, insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca y enfermedades cardiacas, hipertiroidismo, alergia al medicamento, tuberculosis activa, niños lactante (Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis, INLASA, 2002).

5.7.2 Anfotericina B

Anfotericina B es un antibiótico polienico macrocíclico de bajo espectro, tiene siete dobles enlaces etilénicos y es derivado de una bacteria que se encuentra en el suelo *streptomyces nodosus*, este producto no tiene actividad contra bacterias pero si es muy activo frente a hongos por lo que se lo conoce más como un antimicótico (micosis profundas y sistémicas) y antiparasitario (*Leishmania*). Es un medicamento de segunda elección en el tratamiento de las leishmaniasis recidivantes, reactivas y es la droga recomendada en los casos mucosos (Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis, INLASA, 2002).

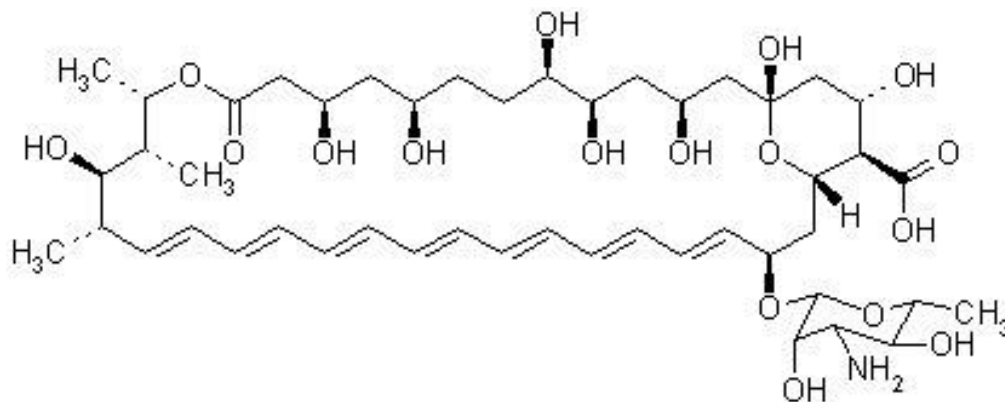


Ilustración 13 Estructura química de Anfotericina B

Las *Leishmanias* tiene el 15% de su peso conformado por lípidos (lípidos neutros, esteroides y ésteres de esteroles); la Anfotericina B se une a estos lípidos, principalmente a nivel de la membrana celular del parásito, donde provoca alteraciones en su permeabilidad con pérdida de potasio, aminoácidos y purinas, además de potenciar la cascada de iones del oxígeno del macrófago con lo que aumenta su efecto leishmanicida. La farmacocinética de la Anfotericina B introducida al cuerpo humano por vía parenteral con suero, se une inmediatamente a las proteínas plasmáticas que se fijan a la membrana celular, debido a esta unión su eliminación es lenta; la absorción intestinal de la droga es prácticamente nula (Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis, INLASA, 2002).

La Anfotericina B, a dosis de 1 mg/kg peso por día, durante un mínimo de 20 días (40 dosis), presenta un porcentaje de curación cercano al 100% en lesiones primarias, recidivantes o resistentes a otros productos (Alvar et al 1997).

Después de las primeras perfusiones endovenosas se suelen observar fenómenos indeseables que difieren en intensidad dependiendo de la dosis, velocidad de perfusión y tolerancia del paciente como: Flebitis, tromboflebitis, anorexia, náuseas que pueden llegar al vómito, fiebre, escalofríos, vértigo, convulsiones, hipotensión, parestesias, cefaleas. Las alteraciones biológicas que se pueden producir son: elevación de la urea, elevación de creatinina, anemia, trombocitopenia, hipopotasemia, cilindruuria y albuminuria, insuficiencia renal, insuficiencia hepática.

La insuficiencia renal producida por la Anfotericina B es debida a la vasoconstricción de la arteriola aferente que provoca lesiones con necrosis glomerular y tubular situación que permite el aumento de la urea y nitrógeno en plasma (Alvar et al., 1997). La azoemia (aumento de urea en sangre) está directamente relacionada con la dosis de anfotericina B administrada, esto puede llevar a una situación irreversible del riñón; que se manifiesta en su inicio con albuminuria, cilindruuria, disminución en la producción de eritropoyetina y pérdida de sodio y potasio. La

administración de la Anfotericina B con sobrecarga de suero salino disminuye considerablemente los efectos. (Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis, INLASA, 2002)

La administración del producto debe estar precedido de una correcta evaluación del paciente, el paciente debe estar hospitalizado, la solución debe ser administrada de preferencia en horas de la mañana en forma lenta en un lapso no menos de 8 horas.(Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis, INLASA, 2002)

Anfotericina lipídica también conocida como Anfotericina encapsulada en un liposoma o Anfotericina C con sistema de transporte, son utilizados en casos de leishmaniasis viscerales en inmunodeprimidos que no responden a los antimoniales ni a la Anfotericina B convencional, tiene bajos efectos secundarios pero sus costos son elevados (Dietze R et al.1995). Este tipo de anfotericina no se disocia en medio acuoso, siendo captado por el sistema retículo endotelial se acumula en los tejidos infectados particularmente en los macrófagos. Esta droga también se puede utilizar en enfermos con cardiopatías, insuficiencia renal, embarazo, la bibliografía cita que también tienen eficacia en las leishmaniasis mucocutáneas y cutáneas resistentes, consiguiéndose en un ciclo de cinco días los mismos efectos que tratamientos de cuatro semanas.

5.7.3 Miltefosina

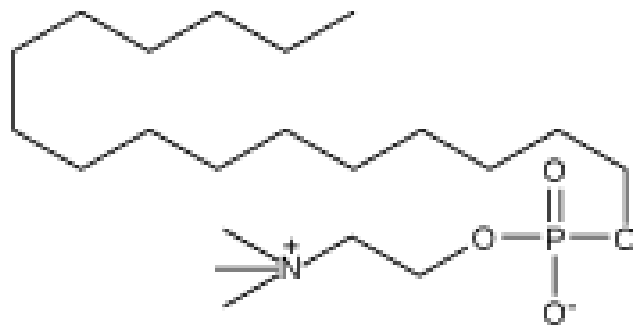


Ilustración 14 Estructura química de Miltefosina

Es un derivado fosfolipídico relacionado estructuralmente con los fosfolípidos que componen la membrana de las células; su mecanismo de acción consiste en la interferencia y bloqueo de las funciones de la membrana celular: inhibición de la proteinquinasa C, la fosfolipasa C, y alteración de la biosíntesis de fosfatidilcolina. Despliega una acentuada actividad citotóxica sobre tejidos tumorales animales y humanos, pero no tiene acción sobre las células normales como los macrófagos y células de la médula ósea. Se emplea en forma tópica para el tratamiento de las metástasis epiteliales del cáncer de mama. En la actualidad se está estudiando su administración por vía oral para tratar neoplasias malignas de diferentes orígenes. La absorción sistémica del fármaco es muy escasa (Vademecum, 2008).

Se lo utiliza como tratamiento de lesiones cutáneas malignas relacionadas con cáncer de mama, infiltraciones superficiales o nodulares en las que otras terapéuticas probablemente no fueran eficientes, y también para el tratamiento por vía oral de Leishmaniasis. (Vademecum, 2008).

Las reacciones adversas son: reacciones cutáneas locales como eritema, prurito, resecaimiento de la piel, tensión, escarificación o quemazón (especialmente en lesiones ulcerosas), muy ocasionalmente se observan reacciones en la piel más severas (dermatitis, atrofia, úlceras y lesiones necrotizantes), alteración de parámetros de laboratorio, elevación de la creatinina transaminasas, leucocitos, trombocitos, náuseas, vómitos y anorexia. (Vademecum, 2008).

No se debe administrar en lesiones muy extensas o en áreas ulceradas. Evitar contacto con zonas sanas de piel, mucosas y ojos. Puesto que no se han realizado estudios en seres humanos sobre posibles efectos teratógenos o embriotóxicos, durante la gestación solo se administrara cuando el beneficio para las madres supere el riesgo potencial para el feto. De la misma manera, se recomienda no administrar miltefosina durante el periodo de lactancia. No se puede descartar un posible efecto sobre la fertilidad en pacientes de sexo masculino. (Vademecum, 2008).

5.7.4 Productos Naturales (evanta)



Ilustración 15 A: Alcaloides totales de la Galipea longiflora; B: Pomada y jarabe a base de Alcaloides totales de la Galipea longiflora

Galipea longiflora Krause tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta. Es un árbol de hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos (Gimenez et al., 2005). En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos del Beni y La Paz. El uso tradicional más frecuente es en forma de cocción en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos. Para el tratamiento de la leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones durante tres días. Este género cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y el sur de Brasil (Gimenez et al., 2005). Se realizaron estudios etnofarmacológicos en Bolivia, de extractos crudos de corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de la planta de donde se aislaron 2-aryl y 2-alkyl quinolinicos sustituidos en la posición 2, y se identificaron 13 componentes activos (Fournet et al., 1994).

Tabla 3 Comparacion de efecto inhibitorio in vitro (IC_{90} (μ g-mL)de los alcaloides aislados de la Galipea longiflora (Fournet et al., 1994)

Drug	IC_{90} (μ g/mL)				
	L.b. ^a (2903)	L.a. ^b (PH 8)	L.a. ^b (H-142)	L.d. ^c (2682)	L.d. ^c (HS70)
2-Phenylquinoline (I)	100	100	100	100	100
2-n-Pentylquinoline (II)	100	100	100	100	100
2-n-Propylquinoline (III)	50	50	50	50	50
4-Methoxy-2-phenylquinoline (IV)	50	50	50	50	50
2-(3,4-Methylenedioxyphenylethyl)quinoline (V)	100	100	100	100	100
4-Methoxy-2-n-pentylquinoline (VI)	100	100	100	100	100
Chimanine A (VII)	100	100	100	100	100
Cusparine (VIII)	100	100	100	100	100
2-(3,4-Dimethoxyphenylethyl)quinoline (IX)	100	100	100	100	100
Skimmianine (X)	100	100	100	100	100
Chimanine B (XI)	25	25	25	25	25
Chimanine D (XII)	25	25	25	25	25
Pentamidine	1	1	1	1	1
N-methylglucamine antimonate	>100	>100	>100	>100	>100

^a *Leishmania braziliensis*, ^b *Leishmania amazonensis*,
^c *Leishmania donovani*

Evualuaciones *in vivo* han demostrado que los alcaloides de evanta tienen un efecto leishmanicida, mostrado por una reducción en tamaño de las lesiones y número de parásitos cuando los alcaloides purificados son administrados en ratones infectados con *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* (Fournet et al. 1994). Trabajos recientes muestran que el conjunto de alcaloides totales de evanta presentan un efecto antiproliferativo de esplenocitos y líneas celulares con actividad antiinflamatoria debido a un efecto sobre la produccion de $INF-\gamma$ (Calla-Carrasco et al. 2007).

En el Instituto Farmaco Bioquimicas (IIFB), dependiente de la Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas de la Universidad Mayor de San Andres, ha venido realizando estudios sobre esta especie vegetal a partir de 1993 donde se ha podido realizar el aislamiento y caracterizacion de alcaloides quinolinicos de corteza y hojas de *Galipea longiflora* (Figura 16), como la evaluacion *in vitro* de extractos organicos de corteza y hojas sobre pormastigotes de *L. amazonenis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. chagasi*; asi tambien re realizaron modelos tóxico cinéticos, determinaron la toxicidad aguda, subcronica y parametros farmacocinéticos, para el extracto

crudo, en modelos murinicos, sobre antecedentes descritos, el IIFB viene desarrollando formulaciones farmaceuticas tópicas y sistémicas, para estudios clínicos.

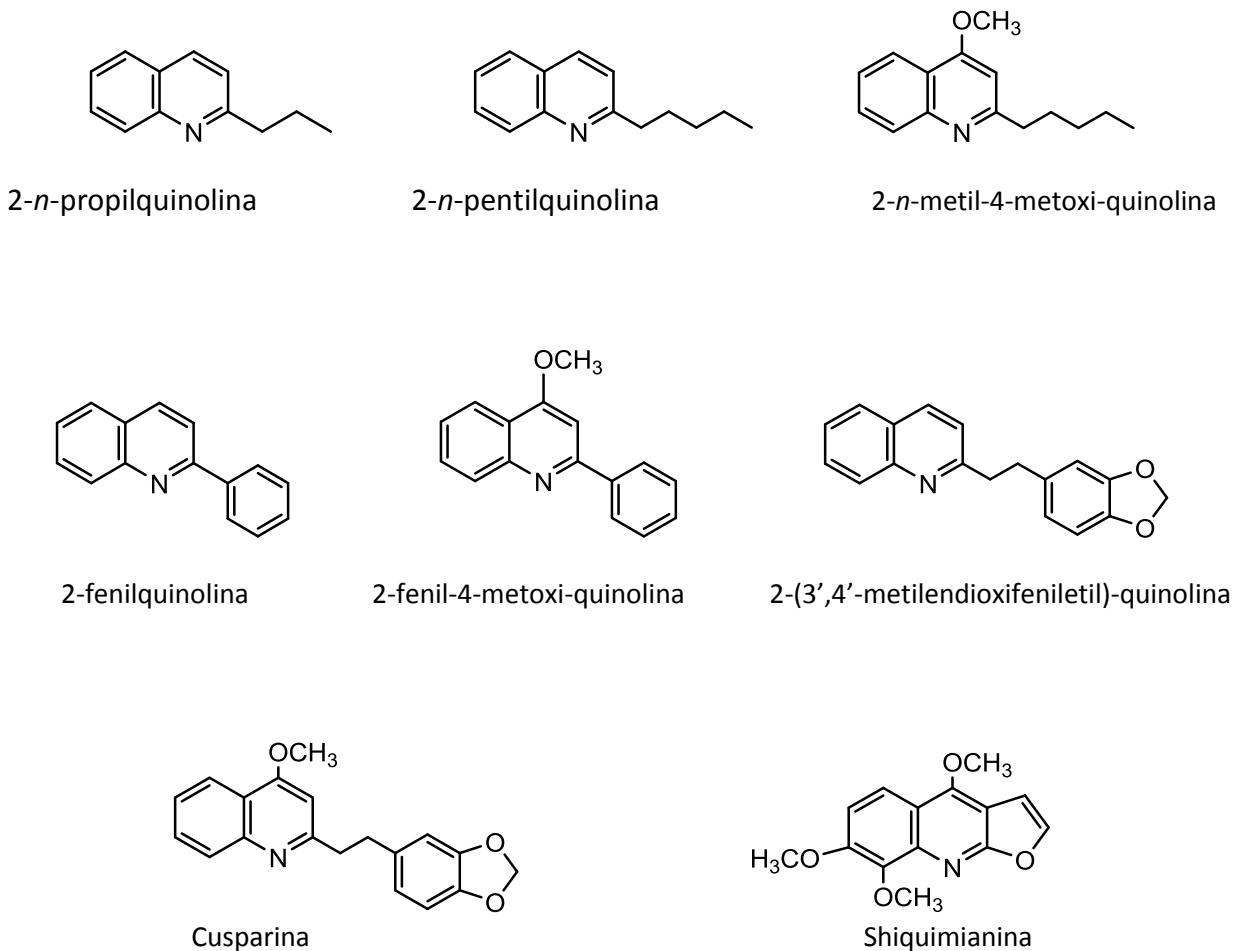


Ilustración 16 Estructuras químicas de los principales alcaloides aislados de la Galipea longiflora.

5.8 Control

La lucha contra la leishmaniasis supone una visión integral de la enfermedad en todas sus formas, que agrupa factores como el control de vectores y reservorios, la educación sanitaria, la vigilancia pasiva y activa y el desarrollo de métodos de diagnóstico que permitan el registro de casos, así como el tratamiento precoz. (Dejuey, 1992)

La vacunación pudiera constituir un método efectivo de control. A pesar de los avances que se notifican y de las múltiples aproximaciones que se han ensayado para lograr protección contra distintas formas de la enfermedad, no existen aún propuestas totalmente efectivas (Lanois et al. 2008).

Se demuestra que el diagnóstico precoz y tratamiento, control integrado de vectores, vigilancia efectiva de casos, movilización social y fomento de la colaboración a distintos niveles, pueden ofrecer resultados positivos si se ejecutan coordinadamente en los distintos países.

Un análisis reciente plantea que en América Latina la diversidad y complejidad de la transmisión en las distintas locaciones, las lagunas en el conocimiento científico de la enfermedad en los distintos países, y la carencia de estudios de validación diseñados adecuadamente, hacen poco factible las posibilidades de eliminar esta forma de la enfermedad en esta área geográfica. En cambio, se considera que es posible mejorar el control a través de una voluntad política que desarrolle programas coherentes, e invierta en un mejor manejo de los casos y sistemas de vigilancia adecuados (Romero y Boelaert. 2010).

De manera general se aboga por trasladar el extenso conocimiento actual sobre biología del parásito a métodos diagnósticos efectivos, tratamientos y medidas, cuya validación rigurosa es imprescindible para eliminar a la leishmaniasis de la lista de enfermedades desatendidas, para lo cual se necesita con urgencia de esfuerzos sostenidos para la implementación y la estimulación de financiación, que permita que estas herramientas estén disponibles para todos. Así como se consideran urgentes programas de investigación encaminados a implementar estas propuestas.

5.9 Genoma de *Leishmania*

En general la mayoría de los tripanomastidoses así como *Leishmania* presentan dos tipos de genomas: cromosómico y kitenoplastido. El genoma del parásito le concede una gran plasticidad, permitiendo que se adapte a diferentes presiones selectivas del medio ambiente, esto podría

deberse a la presencia de múltiples copias y re-arreglos de genes; el contenido de las repeticiones de los genes de estos parásitos estaría estrechamente correlacionado con el tamaño del genoma haploide (Wickstead et al. 2003). Es así que se desarrolló el proyecto de secuenciación del genoma de *L. major* (32,8Mb) que comenzó en 1994 y posteriormente continuo con la secuenciación de *L. braziliensis* que terminó el año 2007.

El genoma de *Leishmania* comprende alrededor de 34 Mb, se estima que puede codificar aproximadamente 10 000 genes (Beverly et al. 2002). El genoma tiene un contenido de G-C del 57-59%, lo que se considera relativamente elevado cuando se compara con el de otros trypanosomatidos. Las regiones que codifican para proteínas (ORF, del inglés *open Reading frame*) presentan un porcentaje de G-C más elevado que aquellas regiones no codificantes. Asimismo, entre las regiones no traducidas (UTR, del inglés *un-translated regions*) las 3'UTR son más ricas en G-C que las 5'UTR (Ivens et al. 2005).

En *Leishmania*, al igual que ocurre en otros trypanosomatidos, los genes que codifican proteínas carecen de intrones y se disponen en largas agrupaciones ordenados en tándem. Los distintos genes están separados entre sí por regiones cortas de ADN que constituyen las regiones intergénicas. Algunos genes poseen una única copia por genoma. Sin embargo, con frecuencia los genes presentan varias copias, siendo habitual que exista una elevada conservación en la secuencia de las regiones codificantes, encontrándose mayor divergencia en las regiones no traducidas 5'UTR y 3'UTR, como ocurre con los genes que codifican la histona H2A de *L. infantum* (Soto et al. 2003).

El material genético cromosómico es de aproximadamente 0.45 μm de largo, las especies del viejo mundo poseen generalmente 36 cromosomas, en cambio las especies del nuevo mundo presentan 34 o 35 cromosomas, en el complejo *L. mexicana* se han fusionado los cromosomas 8 con 29 y 20 con 36; *L. braziliensis* tiene los cromosomas 20 y 34 fusionados. Diversos estudios sugieren que el genoma de *Leishmania* es principalmente diploide, pero algunos investigadores indican que son aneuploides, sin embargo actualmente es ampliamente aceptado como genoma

diploide. Los cromosomas son lineales con una longitud de 200 a 4000 kb, presentan telómeros, hasta el momento no se han identificado los centrómeros, se observó variabilidad en el tamaño de los cromosomas en algunas especies incluso entre cromosomas homólogos, lo que complica los estudios taxonómicos por cariotipo (Ersfeld, 2003; Souza et al. 2009).

La comparación entre los genomas de *Leishmania* revelaron que el orden es altamente conservado entre las 30 especies, aunque las distancias inter-loci pueden variar, estas presentan un alto nivel de polimorfismo, además se estima que la divergencia del genoma nuclear basándose en patrones de restricción presenta un rango de 13 a 15 %; este nivel de divergencia entre especies ha sido corroborados por la secuenciación de los genomas de *L. braziliensis* y *L. infantum* (Souza et al., 2009)

En cuanto al kinetoplasto, es una estructura celular inusual en la naturaleza, esta en una proporción del 30% en la célula, se ubica cerca de la base del flagelo, análisis citoquímicos demostraron que el kinetoplasto está compuesto abundantemente de ADN denominado kADN, estudios con microscopia electrónica mostraron que el kinetoplasto representa una parte de la mitocondria, existiendo gran cantidad de crestas para la actividad metabólica (Lukes et al. 2002; Souza et al. 2009). Está formado por una red de moléculas circulares, los minicírculos, que aparentemente no codifican información para proteínas, sin embargo mantienen su replicación; hasta el momento no se conoce con exactitud la función que cumplen, aparentemente pueden codificar pequeños fragmentos guías de ARN de 70 nt (Lukes et al. 2002), y están los maxicírculos que contienen una región conservada de 16-17 kb y una región no codificante, que es altamente variable entre cepas y especies (Flegontov et al. 2006), en su transcripción incluyen moléculas de ARN ribosomales y ARN mensajeros para diversas subunidades del complejo respiratorio, a diferencia de otros ADN's mitocondriales, los maxicírculos no codifican ARN's de transferencia, estos deben ser importados del núcleo al mitocondrion, además una de las propiedades del maxicírculo es que los transcriptos sufren inserciones post-transcripcionales de uridina y deleciones como un proceso final en la edición del ARN mensajero (Lukes et al. 2002; Horváth et al.2000).

5.10 Proteína de choque termico (HSP70) en *Leishmania*

Durante la transmisión de *Leishmania*, el parásito se enfrenta a dos situaciones de estrés: el aumento de temperatura y el descenso de pH. Mientras que en el insecto poiquilotermino los promastigotes de *Leishmania* se encuentran a temperaturas de 22-28 °C, tras su transmisión al hospedero mamífero homeotermino quedan expuestos a temperaturas de 31-35 °C en el caso de especies dermatotropicas, o a temperaturas de 37 °C en el caso de especies viscerotropicas (Folgueira et al.2006). Por tanto, para asegurar su supervivencia en el mamífero, *Leishmania* posee mecanismos de termotolerancia, para lo cual resulta fundamental la respuesta al choque termico desencadenada durante la transmisión.

Las proteínas de choque térmico son las que garantizan la termo tolerancia de estos parásitos. Dentro de ellas, la familia de HSP70 están entre las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución y se presentan en todo tipo de organismos. Comprenden formas inducidas por la temperatura (HSP70) y proteínas que se expresan de forma constitutiva (HSC70)(Folgueira y Requena, 2007).

Las proteínas pertenecientes a esta familia se localizan en una amplia variedad de compartimientos celulares, como: citoplasma (kADN, HSP70, HSC70), retículo endoplásmico, mitocondrias (mHSP70) y cloroplasto. Su actividad se basa en la unión, controlada por la hidrolisis de moléculas de ATP, a segmentos peptídicos hidrofóbicos (Folgueira y Requena, 2007). Un tipo particular, las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), están altamente conservadas tanto en los procariotas como eucariotas, en lo referente a secuencia y función y tienen gran importancia como chaperonas, el ensamblaje de proteínas y el transporte (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).

Leishmania major es la primera especie en la que se reporta la organización y expresión de los genes HSP70 (Lee et al. 1988). En esta especie se describe la presencia de 5 genes HSP70, cuatro de ellos organizados en tándem, mientras que el quinto gen se encuentra en un locus diferente,

dentro del mismo cromosoma. Estudios preliminares realizados en la especie *L. donovani* indican la existencia de 12 a 15 copias de los genes HSP70, localizados en el mismo cromosoma y con la misma disposición. Más tarde se postula la existencia de siete genes de HSP70 en *L. amazonensis* y un octavo localizado en el mismo cromosoma que los anteriores, pero en una posición más alejada (Bock y Langer, 1993). En *L. infantum*, hay seis copias del gen HSP70. Todos los genes presentan una elevada homología de secuencia tanto en su región 5'UTR, como en la región codificante, salvo la región 3'UTR del gen situado en el extremo 3' del tándem (denominada 3'UTR-II) que es altamente divergente en secuencia con respecto a la misma región de las copias restantes (3'UTR-I). Por ello, a los genes HSP70 1-5 se les denomina HSP70-I, mientras que al gen HSP70-6 se le denomina como *HSP70-II* (Quijada et al. 1997).

Folgueira y Requena (2007) reportan la organización genómica del *loci* HSP70 para *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum* tienen una organización similar: varios genes organizados en tándem en su mayoría de tipo HSP70-I, y una sola copia de HSP70-II (Ilustración 11). En caso de *L. mexicana* y *L. amazonensis*, tienen una organización idéntica entre ellos, con seis y siete genes HSP70-I, y una sola copia de HSP70-II, respectivamente, aunque difieren ligeramente de los anteriores al no compartir los mismos sitios polimórficos. *L. braziliensis* presenta la organización genómica más divergente entre las estudiadas ya que presentan varias copias aún no determinadas, del gen HSP70-I y ninguna del HSP70-II (Folgueira y Requena, 2007).

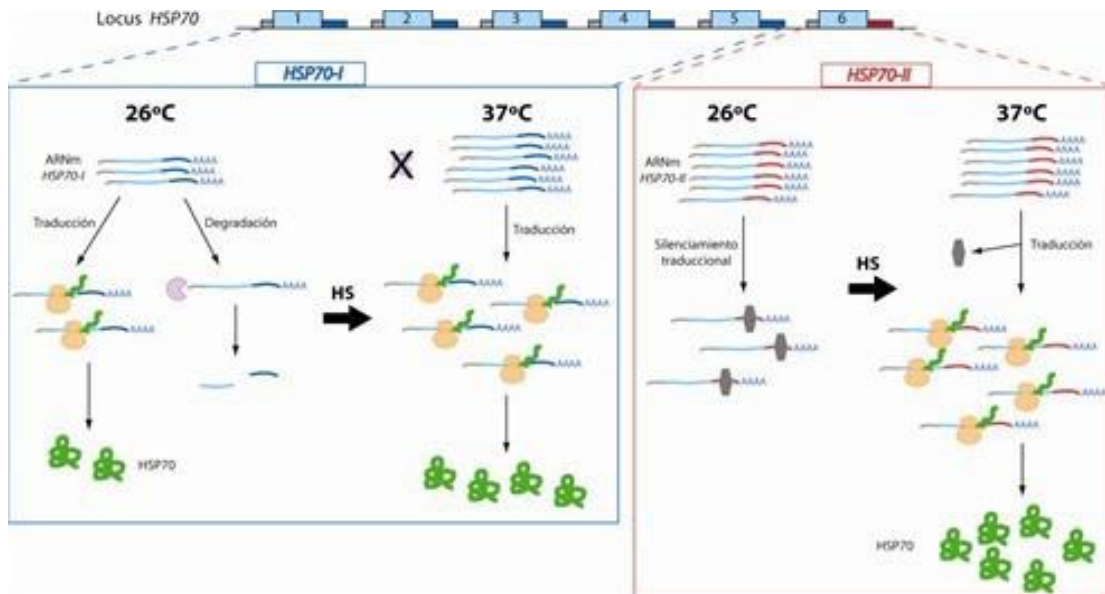


Ilustración 17 Regulación de la expresión génica del locus HSP70 de *Leishmania* (<http://www2.cbm.uam.es>)

Los genes que codifican las proteínas HSP70 también se utilizan ampliamente en estudios filogenéticos de diferentes parásitos, como *Cryptosporidium spp.* (Sulaiman et al., 2000), *Babesia spp.* (Yamasaki et al. 2007), *Giardia spp.* (Arisue et al. 2002a) y *Blastocystis hominis* (Arisue et al. 2002).

5.11 Identificación o tipificación de especies

Las razones más importantes para identificación de las especies de *Leishmania* son: la relación que existe entre la entidad que parasita y la presentación clínica de la enfermedad, la conveniencia de realizar el seguimiento clínico, fundamentalmente en los casos donde exista posibilidad de evolución hacia una manifestación mucocutánea, la realización de estudios epidemiológicos que involucran vectores y reservorios (Sobrino et al., 2008; Mollinedo et al. 2007) y la diferente respuesta al tratamiento que presentan algunas especies (Arévalo et al. 2007; Llanos-Cuentas et al. 2008).

5.11.1 Identificación mediante patrones de isoenzimas

Es una herramienta muy efectiva que constituye el método de referencia y consiste en identificar patrones de enzimas mediante la separación en gel por electroforesis y posteriormente su visualización con reacciones de tinción apropiadas. Finalmente se comparan con los patrones de los aislados de referencia para así identificarlos y caracterizarlos por zimodemos. De acuerdo a la similitud entre los distintos zimodemos, se pueden establecer agrupaciones para las distintas especies (Rioux et al.1990). Estas bandas pueden ser analizadas numéricamente mediante métodos estadísticos apropiados que permiten observar la variabilidad de acuerdo a diferentes alelos o frecuencias genotípicas de loci que presentan distintos aislados de parásitos.

5.11.2 Identificación mediante PCR

Con el propósito de mejorar el poder discriminativo de los métodos convencionales de tipificación, se han desarrollado los métodos de biología molecular. Estos tienen como ventaja su acción 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 asintomáticas.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 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, y ofrece muchas ventajas, entre ellas, el que no es necesario purificar previamente la muestra original.

La utilización de la PCR y sus variantes ha presentado muchas ventajas, entre estas la posibilidad de identificar de forma precisa la presencia del parásito en el vector y el hospedero (Michalsky et al. 2002). Para identificar o tipificar especies mediante PCR se pueden usar cebadores especie-

específico en áreas endémicas donde se presentan varias especies, o para estudios de vectores y reservorios.

5.11.3 Identificación mediante PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado)

El polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto de la PCR permite detectar variaciones menores en un gen, donde una sola sustitución de base crea o elimina un sitio capaz de ser digerido por una endonucleasa de restricción específica (Bañuls et al., 2007), estas enzimas de restricción tienen la capacidad de reconocer una secuencia corta de ADN dúplex (de 4 a 6 nucleótidos) y la consiguiente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas del ADN llamado sitios de restricción.

Los fragmentos generados por la restricción específica de los productos amplificados se analizan mediante visualización de la electroforesis en gel de agarosa, que es el método más comúnmente utilizado (Rotureau et al. 2006).

García y colaboradores (2004) notifican la tipificación de 34 muestras clínicas en las que se identificó *Leishmania braziliensis* y *Leishmania lainsoni* mediante la PCR-RFLP basada en la amplificación del gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática. Adicionalmente estos autores demuestran la existencia de patrones de bandas compartidas para las especies *L. braziliensis/L. peruviana* y *L. guyanensis/L. panamensis* al utilizar *Hae III*, que resultó la endonucleasa de mayor utilidad. En el 2007 los mismos autores aplicaron la técnica de electroforesis capilar en muestras tomadas de pacientes con leishmaniasis cutánea en Bolivia (García et al. 2006).

CAPITULO II

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental y descriptivo en el periodo de tiempo comprendido entre los años 2011 al 2014, en los laboratorios de IIFB en la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Andrés.

6.2 Universo de trabajo

El universo de trabajo comprende 2 cepas de referencia y 51 cepas de *Leishmania spp.*, aisladas de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA).

6.2.1 Cepas

Para el desarrollo del presente trabajo las cepas de referencia, que fueron foco de estudios moleculares preliminares (Cárdenas., 2005), fueron identificadas como M2904 C192 RJA para *Leishmania braziliensis*, Clon 1 NHOM-BR-76-LTB-012 para *Leishmania amazonensis* (Tabla 4) y 51 aislados de *Leishmania* (Anexo 1) cuya toma de muestra oscila entre el año 2010 y 2012, que fueron donados (congelados y en cultivos) por el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA). Estos 53 parásitos fueron cultivados y mantenidos en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

Tabla 4 Descripción de las cepas utilizadas en este estudio.

No	CODIGO	PROCEDENCIA
1	Clon 1 NHOM-BR-76-LTB-012	Universidad Paul Sabatier *
2	M2904 C192 RJA	Cayetano Heredia**
3	Cepa Nativa promastigotes de <i>Leishmania lainsoni</i>	IIFB***
4	Cepa Nativa epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	INLASA

*Francia

**Dr. Jorge Arévalo IETAvH-Universidad Cayetano Heredia (Perú)

*** Ref. Cárdenas., 2011

Los parásitos fueron cultivados en cajas de cultivo celular de 25 ml de capacidad, en medio comercial Schneider (SIGMA) suplementado con Glutamina, CaCl₂ 6 % (p/v), Bicarbonato de Sodio 40% (p/v), gentamicina 100 mg/L y 10 % Suero Bovino Fetal inactivado por calor a 56°C. Los cultivos fueron incubados en una estufa a 27 °C (Salamanca, 2008), se realizaron pases sucesivos cada 3 días.

6.3 Extracción de material genético

Los cultivos de las cepas fueron sometidos a extracción de material genético, se utilizaron aproximadamente 1,5 mL de cultivo de ~10⁶ células/mL, centrifugados a 7 000 rpm por 10 minutos, se utilizó el kit Quiaeasy (QIAGEN) para la extracción de ADN de células y se prosiguió con el protocolo de extracción propuesto por el fabricante, el material genético obtenido fue conservado a 4°C hasta su utilización.

6.3.1 Cualitativa-cuantificación del material genético

La calidad del material genético fue evaluada a través de la presencia de bandas en gel de electroforesis horizontal, en geles de agarosa al 1%, revelados con SYBR GREEN (SIGMA) para ser visualizados sobre un trans-iluminador de UV.

6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el gen de interés a lo largo de este estudio. El gen de la proteína de Shock Térmico HSP70, es el blanco principal de nuestro análisis (García et al., 2004), este se amplificó para luego someterlo a la digestión con la enzima de restricción *HAEIII*, para poder obtener perfiles en los geles de agarosa, que nos permitan diferenciar entre especies de *Leishmania*.

6.4.1 PCR HSP70

6.4.1.1 Cebadores para la amplificación del gen de HSP70

Se utilizaron los cebadores propuestos por García et al., 2004 y sintetizados por SIGMA Genoy, cuyas secuencias son:

Tabla 5 Cebadores utilizados en este estudio

Primer	Secuencia 5' → 3'	Ubicación	Material Genético	Tamaño (pb)	Referencia
HSP 70 ant	CCGCCCATGCTCTGGTACATC	cromosoma	Segmento del gen HSP70	1500	García et al. 2004
HSP 70 sen	GACGGTGCCTGCCTACTTCAA				

6.4.1.2 Optimización de la PCR para HSP70

Se utilizaron reactivos de Promega para la preparación del mix de la PCR, utilizando concentraciones finales de los cebadores 0.5mM, dNTP's 0.2mM, MgCl₂ 1.5mM y taq polimerasa (GoTaq) 0,03U/μM. Las condiciones de la PCR se detallan a continuación: desnaturalización inicial (94 °C, 1 min) y nuevamente una desnaturalización (96°C, 10 min) seguido de 35 ciclos de desnaturalización (96°C, 1 min), hibridación (61°C, 1 min), extensión (72°C, 3 min) y una extensión final (72°C 10 min), para obtener un amplicon de 1500 pb.

6.4.1.3 Verificación de la amplificación

Los resultados de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón de corrida TAE durante 30 min. La electroforesis se visualizó en un transiluminador de luz UV.

6.4.2 RFLP HSP70

6.4.2.1 Restricción enzimática

Para la restricción enzimática de los productos amplificados obtenidos mediante PCR HSP70, realizada en un volumen total de 20μl, se utilizó 10μl de amplicon, tampón de enzima 10X (100mM Tris-HCL, pH 7.5; 100mM MgCl₂; 100 mM Dithiothreitol; 500mM NaCl) y la enzima HAE III (1U) (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tubos se colocaron en un calentador a 37°C y se incubó durante 2 horas.

Posteriormente, el análisis del tamaño de los fragmentos producidos por la restricción enzimática de los productos amplificados, se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 60 voltios, durante 2 horas 30 minutos. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb DNA Ladder.

6.5 Evaluación de Susceptibilidad *in vitro*

6.5.1 Preparación de los cultivos

Se utilizaron 51 cepas de *Leishmania*, aisladas en el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud-INLASA, luego de ser adaptadas a medio difásico NNN, fueron congeladas y crió conservadas hasta su uso. En el IIFB recibimos los aislados de parásitos crió conservados y los descongelamos en medio comercial Schneider (SIGMA) suplementado con Glutamina, CaCl₂ 6%(p/v), Bicarbonato de Sodio 40%(p/v), gentamicina 100mg/L y 10 % Suero Bovino Fetal. Los cultivos fueron incubados en una estufa a 27°C (Salamanca 2008), esto para obtener poblaciones parasitarias adecuadas para los ensayos de susceptibilidad *in vitro*.

6.5.2 Preparación de los antiparasitarios

Los medicamentos evaluados fueron Anfotericina-B (ANFOTERICIN-CRITÁLIA), Miltefosina (IMPAVIDO) y los Alcaloides Totales de *Galipea longiflora* (CAT-IIFB).

La Anfotericina B se diluyó en Medio Schneider donde a partir de una solución madre (1mg/mL) se realizaron diluciones seriadas en concentraciones que van de 0.62 µg/mL hasta 0.01 µg/mL. La Miltefosina y el CAT se diluyeron en DMSO, concentración inicial de 10mg/mL, a partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas que van desde 100µg/mL hasta 1,5µg/mL, las concentraciones de DMSO son menores al 1% (Salamanca et al., 2008).

6.5.3 Preparación placa de 96 pozos

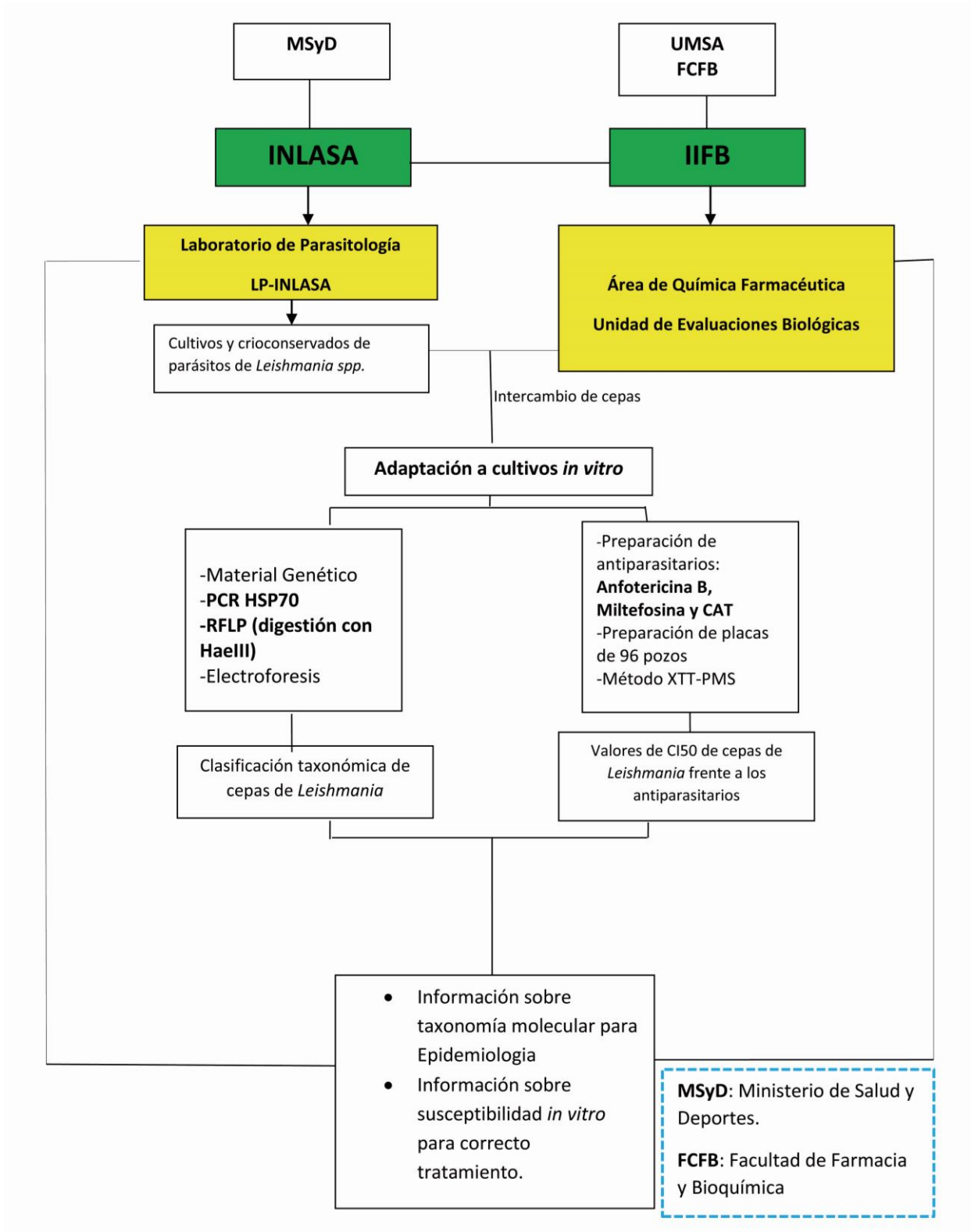
Para contar parásitos en cámara de Neubauer, se tomó 20µL de un cultivo *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* (solución madre) y se depositó en 180µL de glutaraldehído (2,5%). Posteriormente se ajustó la población a 3×10^6 parásitos/mL con medio Schneider más 10 % suero bovino fetal, una vez realizada la mezcla se colocó 100µL de la misma en cada pozo de la placa de 96 pozos (Nunc). A continuación se añadieron 100µL de las distintas concentraciones de los

antiparasitarios en cada pozo, además, se diseñó un blanco para cada concentración de las drogas, cada placa se elaboró con las cepas de referencia como controles. Las placas se incubaron a 26°C durante 72 horas (Salamanca et al., 2008).

6.5.4 Obtención de CI_{50} por el método colorimétrico XTT-PMS

Luego de la incubación se procedió a la determinación de CI_{50} mediante el método XTT-PMS. La placa de 96 pozos tras la incubación es leída en un stat fax a 450nm de longitud de onda, sin filtro diferencial. El análisis de datos se realizó en Microsoft Excel 2008 que transforma las absorbancias a porcentaje de viabilidad de los parásitos, 100% representa la absorbancia del control de crecimiento de parásitos (sin extracto). La conversión del porcentaje de viabilidad a su correspondiente valor de CI_{50} se realizó por función de tendencia lineal que ajusta la recta calculada por el método de los mínimos cuadrados a los valores matrices Y =porcentaje de inhibición y X =concentración de la droga, devolviendo los valores de $Y=50\%$ de inhibición a su respectivo valor de X . (Cornelly et al., 2003).

7 DISEÑO METODOLOGICO



CAPITULO III

8 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Desde el año 2007 al 2011 han acudido al LP-INLASA 2639 pacientes con orden para diagnóstico de leishmaniasis, de los cuales 87% son casos positivos, esto representa a 2296 pacientes infectados con leishmaniasis en 5 años. El aumento de casos cada año refleja la importancia y necesidad de identificar la especie de *Leishmania* infectante. Este estudio contribuirá con información epidemiológica actualizada de la enfermedad, teniendo en cuenta que los datos más actuales datan del año 2007. (Mollinedo., 2007).

La identificación de especies es altamente relevante para mejorar el pronóstico y proporcionar el tratamiento adecuado para la leishmaniasis, métodos basados en PCR están disponibles para este propósito. Diversas técnicas en base a PCR y/o secuenciación de genoma se han aplicado en diversos países latinoamericanos, en Minas Gerais-Brasil, estudiaron y probaron el método basado en PCR-RFLP (HSP70) para el diagnóstico e identificación de la *Leishmania* causante de Leishmaniasis cutánea en pacientes de un área endémica(Volpini et al., 2004), y en Colombia se analizaron cepas de diferentes orígenes geográficos con el método de PCR-RFLP para la tipificación y diferenciación de las mismas(Montalvo et al.,2010),en Bolivia, pudieron diferenciar entre cepas de *Leishmania (V.) braziliensis*,*L. (V.) lainsoni*, *L.(L.)amazonensis*.(Con el método de PCR-RFLP el gen de HSP70) (García et al.,2006)

Los métodos moleculares, en particular los que se basan en la PCR, han demostrado ser sensibles y específicos para lograr la identificación de especies de *Leishmania* y facilitan la posterior discriminación de especímenes que infectan humanos, reservorios y vectores a partir de distintos tipos de muestras (García et al., 2006; Montalvo et al., 2010; Córdova et al., 2011). Estas características de la PCR facilitan, al mismo tiempo, su aplicabilidad a escala epidemiológica en distintos contextos geográficos (Segatto et al., 2012, Oliveira et al 2005). Sin embargo hasta el momento ninguno de los métodos reportados se considera de referencia.

Los cebadores utilizados, propuestos por García y colaboradores (2004) cumplen los requisitos generales que determinan el éxito de este tipo de reacción.

La identificación de especies es un problema grande para el diagnóstico de *Leishmania*, la correcta identificación es relevante para otorgar un pronóstico y además el tratamiento correcto. El método de PCR-RFLP del gen de la HSP70 fue utilizado en otros estudios en Bolivia, donde se demostró que la sensibilidad y la especificidad son muy altas (95% y 100% respectivamente) (García et al., 2006).

8.1 Optimización de la PCR HSP70 y RFLP

Se establecieron las condiciones y optimizaron los parámetros analíticos necesarios para lograr una amplificación adecuada del gen de la HSP70 mediante PCR. Las condiciones óptimas de la reacción fueron: concentraciones cebadores 0.5 mM, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y taq polimerasa 0,03 U/μM GoTaq. Se obtuvieron amplicones de la talla esperada cuando se optimizo la cantidad de ADN a utilizar de las diferentes cepas.

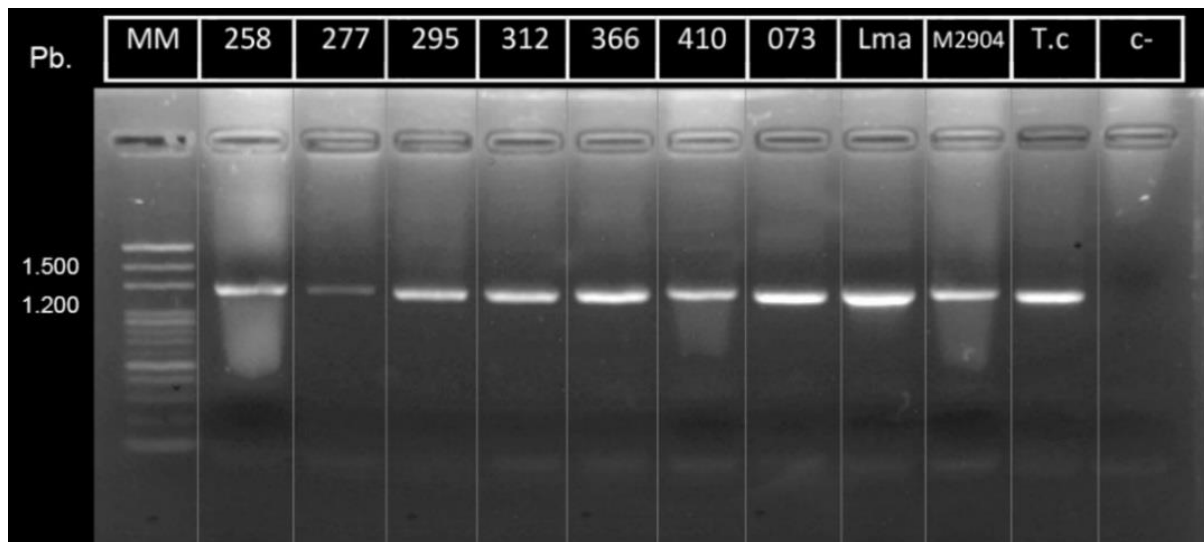


Ilustración 18 Fotografía de la electroforesis de los productos de la amplificación del gen de la HSP70; MM marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; 258; 277; 295; 312; 366; 410; 073 (cepas en estudio); Lma cepa control de *Leishmania amazonensis*; M2904 cepa control *Leishmania braziliensis*; T.c cepa control de *Trypanosoma cruzi*; c- control negativo.

La sensibilidad analítica fue excelente para especies como *L. braziliensis*, ya que cuando se procedía con la amplificación del gen estas mostraban bandas fuertes, y de manera general la sensibilidad analítica fue muy buena para la especie de *L. lainsoni*, estas dos especies están agrupadas en el subgénero *L. (Viannia)*, en tanto la posibilidad de detección para especies del subgénero *L. (Leishmania)* fue menor, este es el caso de *L. amazonensis*, observamos bandas en muchos casos débiles y poco definidas. Esto se puede explicar en que las copias del gen HSP70 presente en las distintas especies, aunque variables, fluctúan entre 1-15 copias (Mac Farlane et al., 1990, Zurita et al 2003, Quijada et al 1997) lo cual podría, teóricamente, explicar la dificultad para alcanzar una alta eficiencia en la reacción. Sin embargo, la diferencia de la sensibilidad entre especies de ambos subgéneros no se corresponde con el número diferente de copias del gen en cada grupo, puesto que son las especies del subgénero *Leishmania* las que menor número de copias del gen presentan (Folgueira et al., 2007) de manera que la dificultad en la amplificación puede encontrarse en la secuencia de los cebadores (Montalvo et al.,2011). Los oligonucleótidos utilizados se diseñan con anterioridad tomando en cuenta la región conservada entre dos secuencias de *L (V) braziliensis* y por tanto son específicos para este especie (García et al., 2004). Esto podría explicar la variabilidad en los niveles de detección obtenidos y la menor sensibilidad de las cepas pertenecientes al subgénero *L. (Leishmania)*, como posible consecuencia de un mal apareamiento entre los cebadores y los sitios de unión a las cadenas complementarias respectivas (Montalvo et al., 2011)

8.2 Optimización de RFLP

Una vez optimizada la PCR se procedió con la optimización de RFLP, en este caso las condiciones ideales son: volumen final de 20 µl, se utilizó 10 µl de amplicon, tampón de enzima 10X (100mM Tris-HCL, pH 7.5; 100 mM MgCl₂; 100 mM Dithiothreitol; 500mM NaCl) y la enzima *Hae III* (1U) (Invitrogen), y 7 µl de agua tridestilada; se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior a la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 2 horas 30 minutos a 60 voltios.

Debido a que *Leishmania* spp. y *T. cruzi* pueden coincidir en su distribución geográfica y que se reporta la infección mixta en países como Bolivia y Brasil (Bastrena et al., 2003; Mendes et al., 2007) nos pareció importante llevar a cabo la prueba con las entidades mencionadas. La HSP70 presente en *T. cruzi* amplifica con los mismos cebadores de *Leishmania* (Ilustración 19), esta ambigüedad se resuelve mediante la digestión enzimática con la enzima HaeIII, la misma endonucleasa que nos permitió realizar las diferenciaciones reportadas entre *Leishmania* (García et al., 2004). Esto es de gran importancia tanto para áreas endémicas en América Latina como para países donde la enfermedad de Chagas se considera importada como producto de la migración (Moncayo et al., 2009), tal es el caso de Bolivia, que es considerado un país endémico para la enfermedad de Chagas.

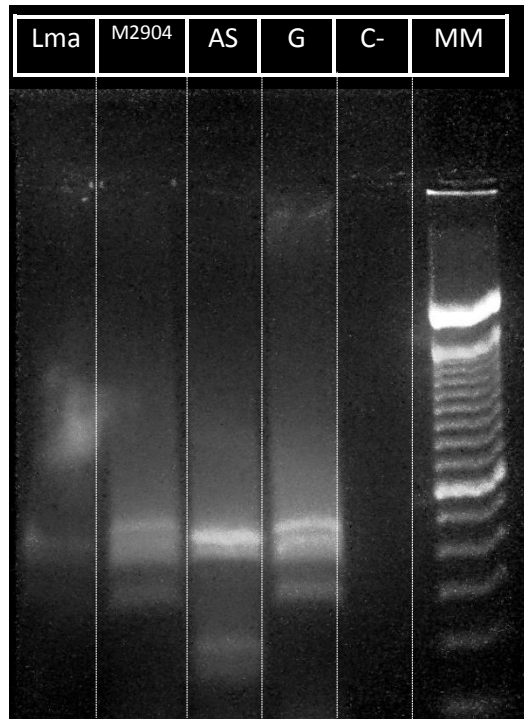


Ilustración 19 Fotografía de electroforesis de productos de la restricción enzimática. Lma cepa control de *Leishmania amazonensis*; M2904 cepa control *Leishmania braziliensis*; AS cepa aislada e identificada como *Leishmania lainsoni* en el IIFB; G cepa aislada e identificada como *Leishmania braziliensis* en el IIFB; C- Control negativo; MM marcador de peso molecular.

Luego de realizar la optimización de la electroforesis de la RFLP se pudieron identificar las cepas. En la siguiente fotografía (Ilustración 21) se puede observar los diferentes perfiles de bandas que revelan las especies de *Leishmania* después de la restricción enzimática.

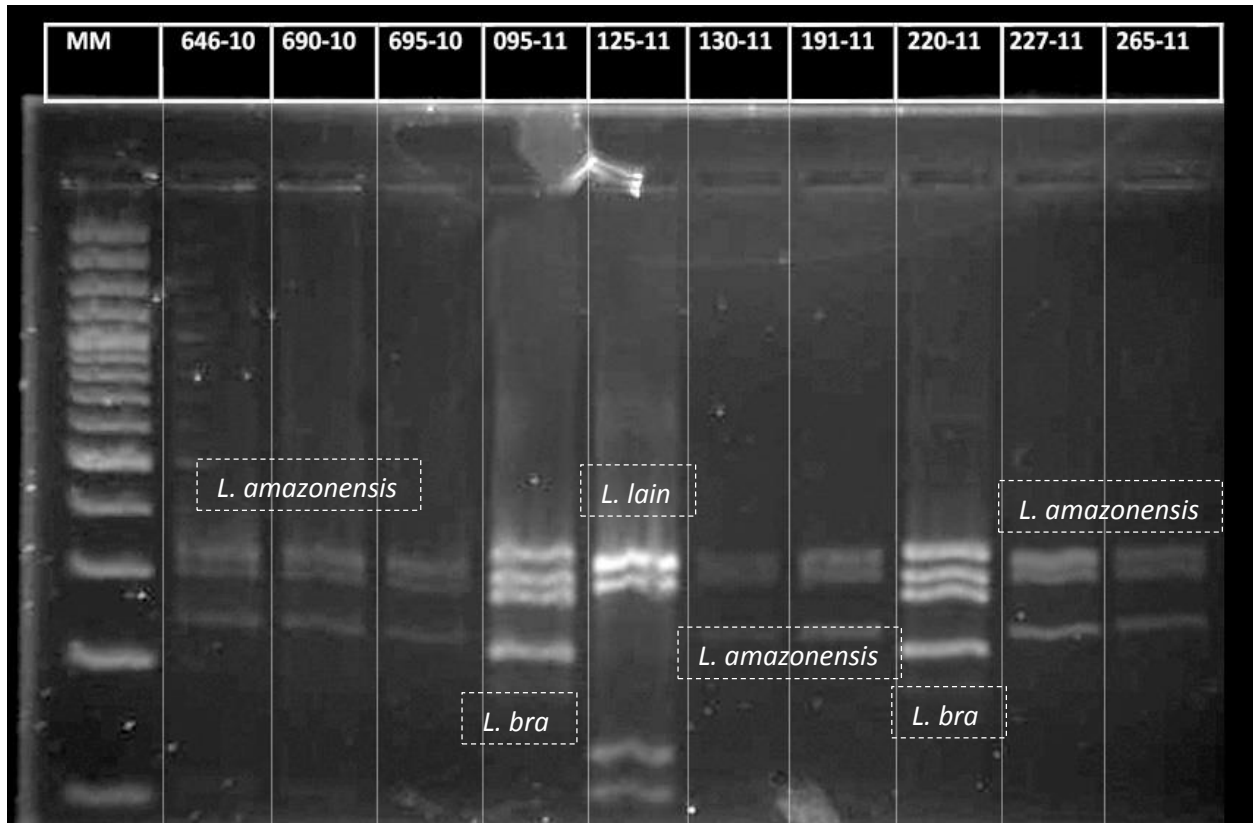


Ilustración 20 Fotografía de electroforesis del producto de la restricción enzimática. MM: Marcador de Peso molecular; 646-10, 690-10, 695-10, 130-11, 191-11, 227-11, 265-11 son cepas identificadas como *Leishmania amazonensis*; 095-11, 220-11 son cepas que pertenecen a la especie *Leishmania braziliensis*; la cepa 125-11 presenta bandas que la identifican como *Leishmania lainsoni*.

8.3 Cepas en estudio, origen y tipificación

En este estudio se trabajó con 51 cepas de *Leishmania spp.* que fueron aisladas de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Laboratorio en Salud (INLASA), estas cepas provienen de diferentes zonas, siendo en su mayoría del norte de La Paz (Yungas). En el Anexo 1 se detalla la

procedencia y la tipificación de las cepas en estudio. El 23,53% de las cepas provienen de Cajuata, seguido por Chulumani y La Asunta (11,76%), Caranavi (7,84%) y Coripata (5,88%). El resto de las muestras están distribuidas en diferentes zonas (Ilustración 21).

Estudios epidemiológicos basados en electroforesis de isoenzimas e identificación molecular de parásitos mostraron una compleja distribución de diferentes especies de *Leishmania* dentro de las zonas endémicas en el departamento de La Paz: *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Desjeux et al., 1987), *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Gatti et al., 1939; Monteiro O, Rosenfeld., 1942; Angels R et al., 1982; Desjeux et al., 1987), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Martínez et al., 1998), y *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Martínez et al., 2001; Bastrena et al., 2002) y recientemente se reportaron casos de *Leishmania guyanensis* (García et al., 2007).

Estudios elaborados en el Brasil mostraron una estructuración geográfica de poblaciones de *Leishmania*, fue presentado por Segatto et al. (2012). Tomando como referencia este estudio pudimos demostrar la agrupación geográfica de *Leishmania* en regiones específicas, así tenemos que *Leishmania amazonensis* se encuentra en mayor proporción en la zona de Cajuata, Martínez et al. en 1998 demostró la presencia de esta especie en la zona; hasta ese entonces esta especie de *Leishmania* no era considerada como agente etiológico en la zona ya que la mayoría de los casos reportados en los Yungas de Bolivia se debían a *Leishmania braziliensis*. Se habían confirmado casos producidos por *Leishmania amazonensis* en el departamento de Santa Cruz pero estos eran poco frecuentes (La Fuente et al., 1986; Dujardin et al., 1987; Grimaldi et al., 1987); la distancia geográfica entre Santa Cruz y La Paz es considerable además de las diferencias en la altitud, lo que podría hacer que se descarte la presencia de la especie en estas zonas.

En el presente estudio obtuvimos 26 cepas pertenecientes a la especie *Leishmania amazonensis* que forman parte del complejo *mexicana* dentro del subgénero *Leishmania*, de estas, 10 son originarias de las zona de Cajuata, el resto de las muestras se encuentran dispersas por diferentes áreas de los Yungas bolivianos, pero no muestran ninguna otra agrupación en alguna zona específica.

En Bolivia la mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea son producidas por *Leishmania braziliensis* hasta un 85% (Rojas et al., 2009; Desjeux P et al., 1987). El 2006 García et al. realizaron un estudio epidemiológico en la zona de Isiboro Sécura de Bolivia, donde pudieron identificar un 93% de casos de leishmaniasis cutánea producida por *L. braziliensis* (39 cepas de 42), otros estudios demostraron la presencia de esta especie en el departamento de Pando (Espejo et al., 1989) también en los Yungas de La Paz (Desjeux et al., 1987). 21 cepas de las 51 aquí evaluadas son *Leishmania braziliensis* que son parte del complejo *braziliensis* dentro del subgénero *Viannia*; a esta especie se la puede encontrar dispersa por muchas más zonas de la región de los Yungas-La Paz, muestran una ligera agrupación en La Asunta y Chulumani pero esta puede no ser significativa ya que son 4 y 3 cepas, respectivamente.

Leishmania lainsoni del complejo *lainsoni* y subgénero *Viannia*, es una especie que también se la puede encontrar en Bolivia (García et al., 2007, Martínez et al., 2001), 4 cepas en estudio fueron identificadas como *L. lainsoni*, no presentan agrupación en ninguna zona geográfica, están muy dispersas, incluso en diferentes departamentos de Bolivia.

La zona que presenta mayor diversidad de especies es La Asunta, en esta región podemos encontrar las 3 especies.

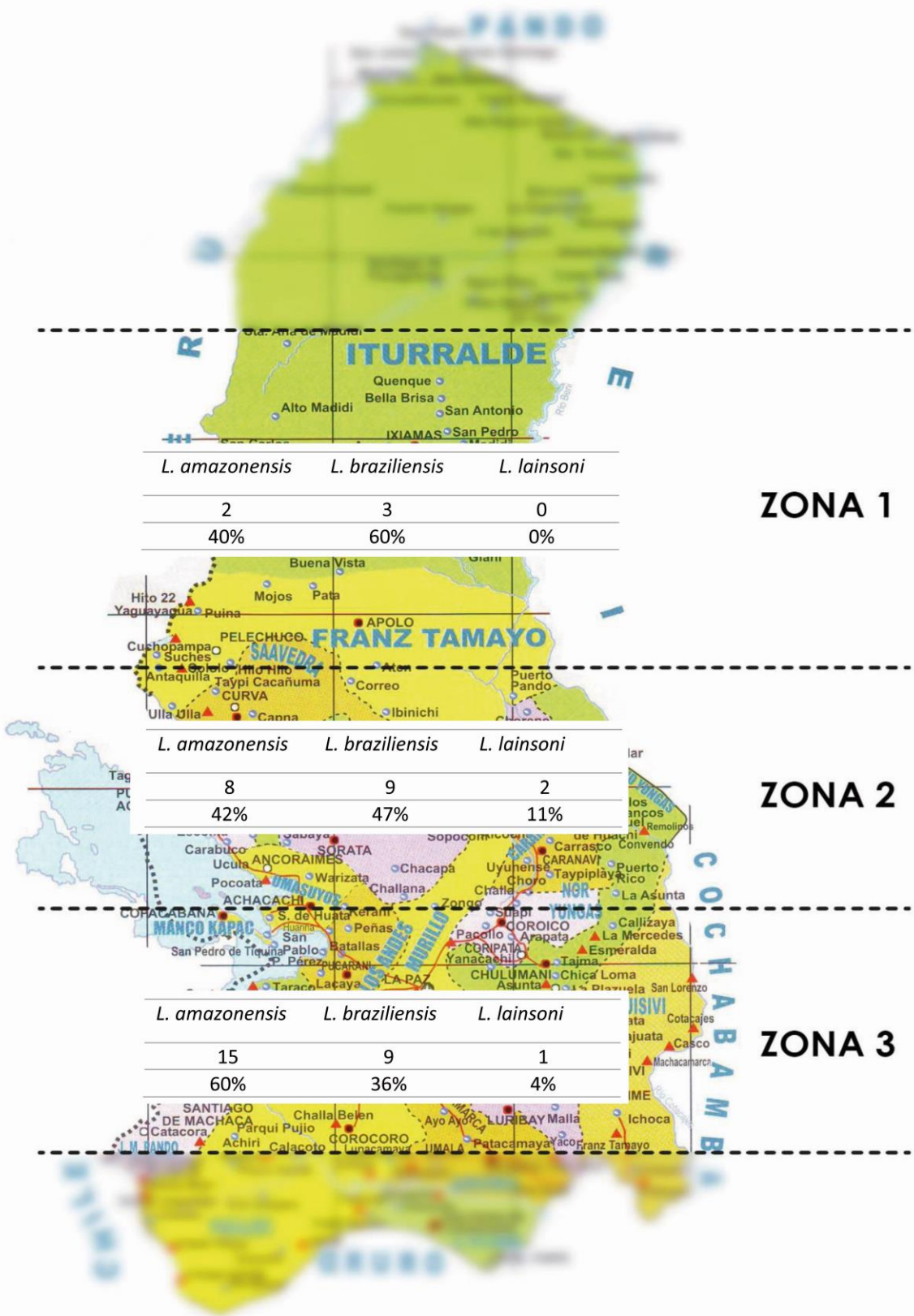


Ilustración 21 Porcentaje de la procedencia y tipificación de muestras en estudio

8.4 Susceptibilidad *in vitro*

Muchas drogas se utilizan para tratar *Leishmania*, pero la quimioterapia utilizada no siempre es efectiva, y esto, puede deberse a la creciente adquisición de resistencia a las drogas. La resistencia a las drogas emergió como un gran obstáculo para el control de las enfermedades parasitarias (Papadopoulou et al., 1998). Se sabe que la eficacia del tratamiento está relacionada con la especie de parásito infectante, es así que resaltamos la importancia de este estudio.

En total contamos con 53 cepas, de las cuales 2 son de referencia que se evaluaron en paralelo con los aislados, y de las 51 cepas nativas en estudio solo se pudieron trabajar con 49, ya que las cepas INL 217-12 y la INL 527-11 no se adaptaron a cultivos *in vitro* y no llegaban a tener poblaciones ideales de trabajo (3×10^6 parásitos/mL) para realizar los ensayos.

Así, se procedió al realizar el ensayo de susceptibilidad *in vitro* de las cepas que fueron previamente identificadas, frente a Anfotericina B, Miltefoscina y alcaloides totales de *Galipea longiflora* como se muestra en los Anexos 2, 3 y 4.

Para el análisis de la susceptibilidad se trabajó dividiendo los datos según especie, y estos se compararon con el CI_{50} de la cepa de referencia.

8.4.1 Susceptibilidad *Leishmania amazonensis*

8.4.1.1 Anfotericina B

Cuando se enfrentó los promastigotes de *L. amazonensis* frente a Anfotericina B se vieron diferentes respuestas desde cepas muy sensibles como INL 172-12 con $CI_{50}=0,04 \pm 0,017$ (Origen Chulumani); INL 295-11 con $CI_{50}=0,017 \pm 0,006$ (Palos Blancos); INL 410-11 con $CI_{50}=0,07 \pm 0,006$ (Origen Coripata); cepas que tuvieron una respuesta próxima a de la cepa de referencia como INL 097-10 con $CI_{50}=0,2 \pm 0$ (Origen Sorata); INL 312-11 con $CI_{50}=0,21 \pm 0,028$ (Origen Chulumani); INL 695-10 con $CI_{50}=0,19 \pm 0,021$ (Origen Cajuata) y cepas que proporcionaron resultados poco

alentadores como la cepa INL 191-12 con $CI_{50}=0,46\pm 0,064$ (Origen Cajuata) (Ilustración 22), este valor es 11,5 veces más alto que el de una las cepas más sensible (CI_{50} de $0,04 \mu\text{g/ml}$), datos similares fueron reportados por Salamanca et al (2008). Vemos que en cuanto a la Anfotericina B, solo tenemos una cepa que presenta CI_{50} muy alto (cepa INL 191-11) cuyo origen es Cajuata y también cepas muy sensibles, ese es el caso de INL 295-11, origen es Palos Blancos. En general las respuestas *in vitro* frente a esta droga son muy variables, en su mayoría, las cepas presentan CI_{50} por debajo de la cepa control (Anexo 2). Esta droga presenta el inconveniente de ser mal tolerada por los pacientes provocando importantes efectos secundarios incluso en algunos casos la internación hospitalaria (Giménez et al. 2005), esto conlleva a que abandonen el tratamiento seguido de una falla terapéutica (Soto et al. 2007).

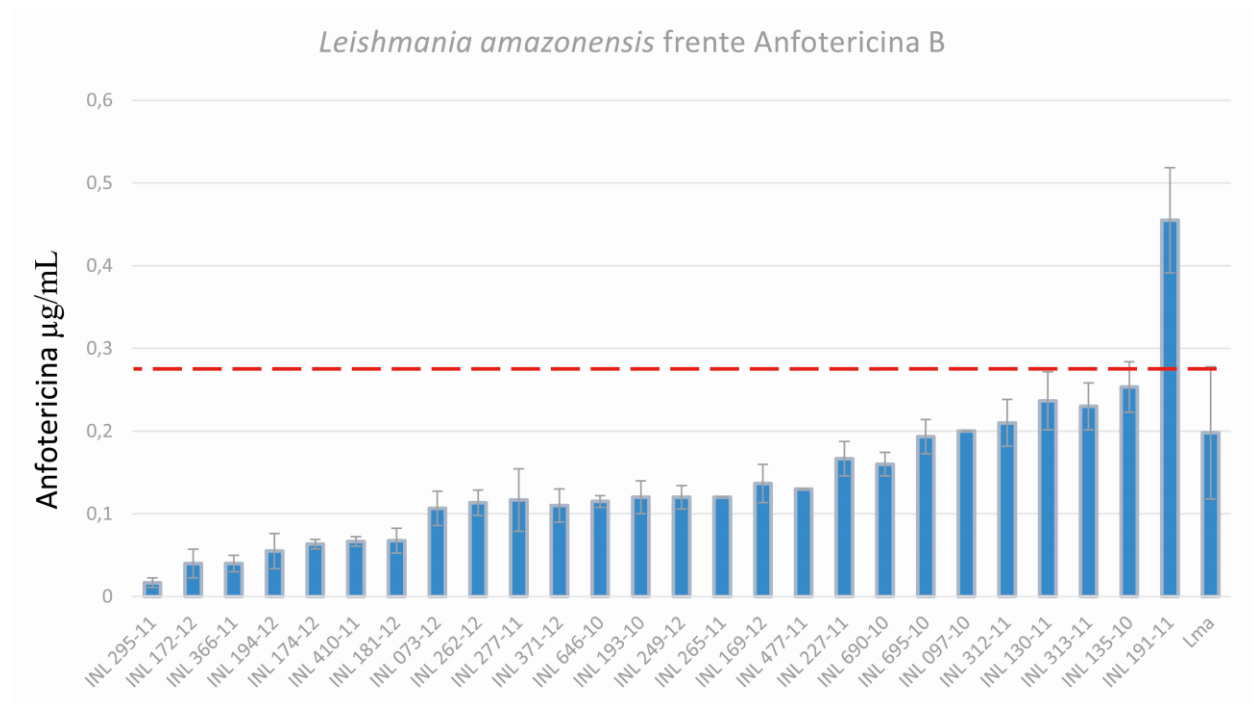


Ilustración 22 *L. amazonensis* frente a Anfotericina B

8.4.1.2 Miltefosina

El uso de Miltefosina como tratamiento para la Leishmaniasis, es cada vez más frecuente, existen reportes en regiones de Colombia donde *Leishmania panamensis* es endémica, el porcentaje de cura con esta droga fue de 91%.

Cuando se trató cepas identificadas como *L. amazonensis* frente a Miltefosina mostraron una susceptibilidad variable, teniendo cepas con CI_{50} bajos como la cepas INL 477-11 con $CI_{50}=1\pm 0,42$ (Origen Rurrenabaque); INL 174-12 con $CI_{50}=2,87\pm 0,76$ (Origen Chulumani) y INL 073-12 con $CI_{50}=3,95\pm 1,20$ (Origen Cajuata); cepas con CI_{50} próximos a la cepa de referencia como INL 410-11 con $CI_{50}=6,5\pm 1,56$ (Origen Coripata); INL 191-11 con $CI_{50}=7,73\pm 1,69$ (Origen Cajuata) y INL 646-10 con $CI_{50}=5,83\pm 1,53$ (Origen Cajuata); y aquellas cepas con respuesta poco alentadora como INL 181-12 con $CI_{50}=21,1\pm 0,12$ (Alto Beni). Es importante resaltar que casi todas las cepas identificadas como *Leishmania amazonensis* presentan CI_{50} bajos o muy próximos al valor de la cepa de referencia. Se muestra también que existe un amplio rango de respuesta con cepas que son 42 veces más sensibles que otras; $CI_{50}=0,5\pm 0$ el más bajo correspondiente a INL 371-12 (origen San Borja) y $21,1\pm 0,12$ el más alto correspondiente a la cepa INL 181-12 (origen Alto Beni).

Los resultados publicados por Salamanca., et al (2008) muestran resultados similares a los aquí expuestos, los autores trabajaron con 11 cepas identificadas como *Leishmania amazonensis* de las cuales 9 manifiestan sensibilidad frente a esta droga. Lo que es remarcable es que el 54% de estas cepas proceden de Cajuata (comunicación personal Alberto Giménez). Anteriormente mencionamos que *Leishmania amazonensis* tiende a agruparse en esta zona, en la ilustración 31 están visibles los datos de la identificación de cepas que se viene realizando en el IIFB durante los últimos 4 años.

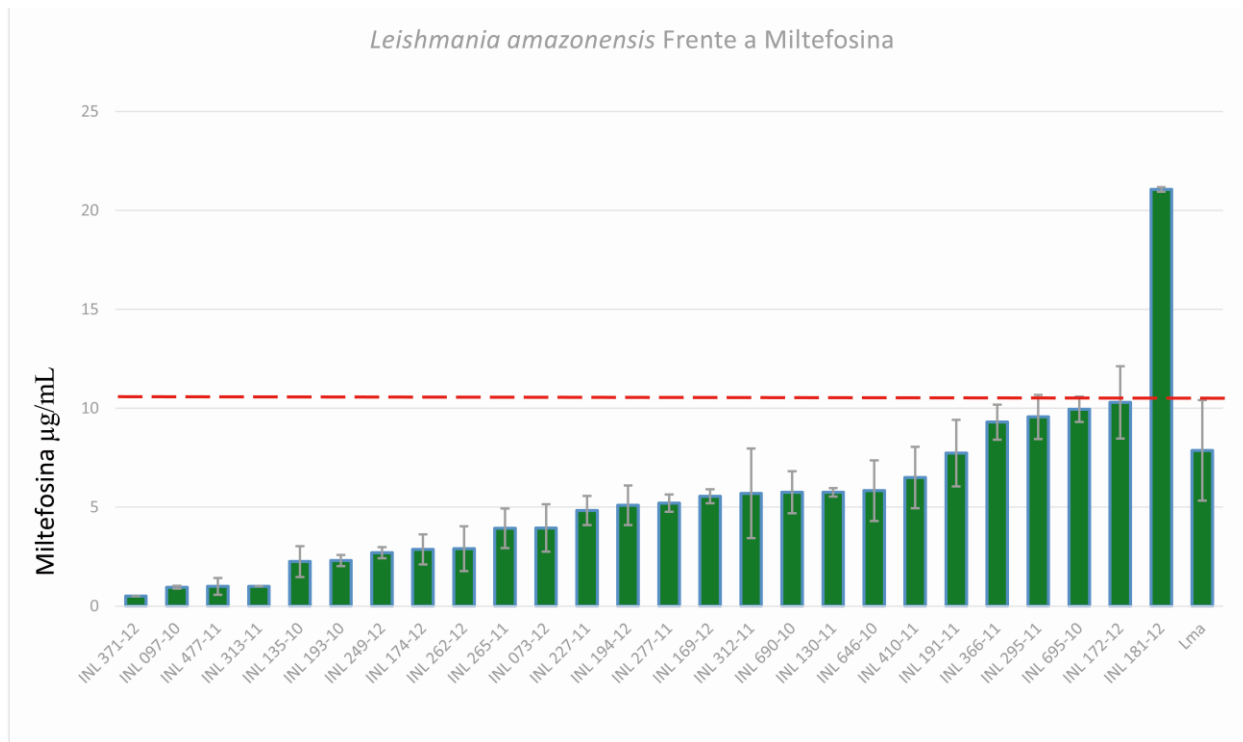


Ilustración 23 *L. amazonensis* frente a Miltefosina.

8.4.1.3 Alcaloides totales de *Galipea longiflora* (CAT)

L. amazonensis frente a los Alcaloides Totales de la *Galipea longiflora* es muy favorable, presentando valores de CI_{50} bajos están las cepas: INL 181-12 con $CI_{50}=5,7\pm 1,85$ (Origen Alto Beni) o también la cepa INL 690-10 con $CI_{50}=4,7\pm 0,14$ (Origen Cajuata). La mayoría de las cepas presentan CI_{50} que están por debajo o igual a la cepa de referencia, lo que nos da indicios de que es una droga muy efectiva, *in vitro*, frente a esta especie; la cepa INL 194-12 presenta un valor de CI_{50} elevado ($22,4\pm 1,98$) cuyo origen es Sorata; en este grupo existen pocas con valores elevados (4 de 21), lo cual es positivo y nos da indicios de que esta droga como tratamiento alternativo podría ser muy efectiva (Ilustración 24). Calla-Carrasco et al. (2007) sostiene que los alcaloides totales de esta planta, además de tener efectos potentes frente a los parásitos de *Leishmania* también ejerce una acción paralela en la respuesta inmune del huésped, que puede ser útil para eliminación del parásito o en otros aspectos en la curación; los efectos leishmanicidas de los alcaloides de esta planta pudieron ser observados y confirmados en este

estudio; Salamanca et al., (2008) reporto 54% de sensibilidad de *Leishmania amazonensis* frente a estos alcaloides.

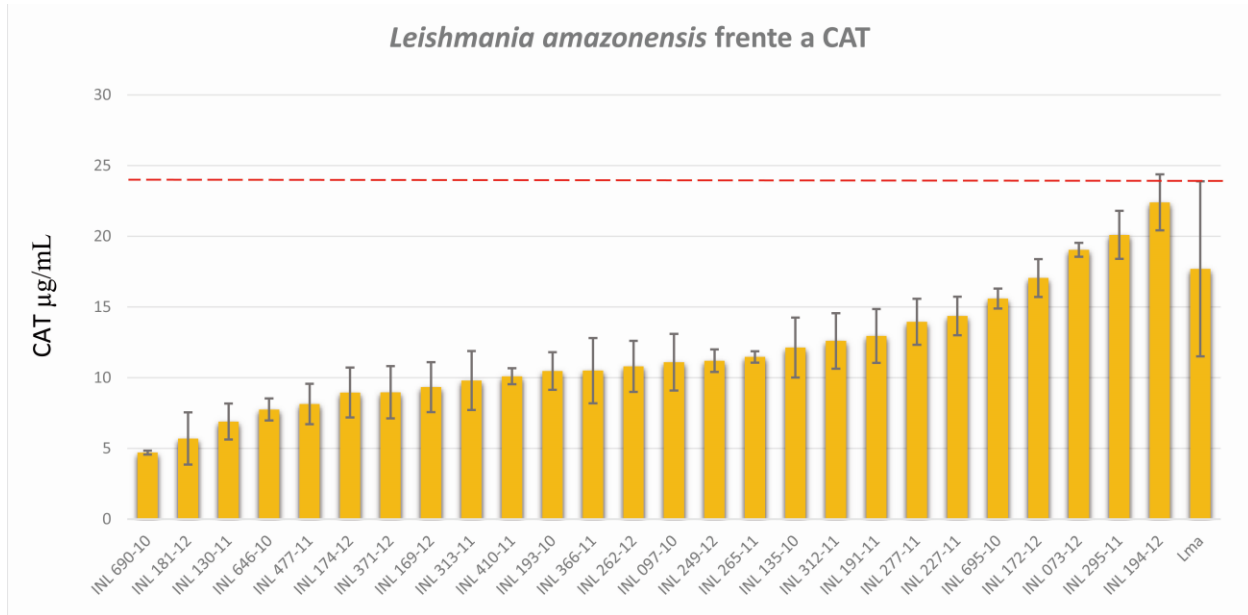


Ilustración 24 *L. amazonensis* frente a alcaloides totales de *Galipea longiflora*.

8.4.2 Susceptibilidad *Leishmania braziliensis*

21 cepas identificadas como *Leishmania braziliensis* fueron evaluadas frente a las drogas descritas anteriormente.

8.4.2.1 Anfotericina B

Se puede observar en la siguiente ilustración que cuando se enfrenta promastigotes de *L. braziliensis* frente a Anfotericina B, son pocas las cepas sensibles: INL 258-11 con $CI_{50} = 0,04 \pm 0,02$ (origen Yanacachi), INL 719-10 con $CI_{50} = 0,067 \pm 0,015$ (Origen Coripata) e INL 310-11 con $CI_{50} = 0,073 \pm 0,015$ (Caranavi); hay una mayor proporción de cepas que tienen CI_{50} similares a los de

la cepa de referencia como: INL 547-12 con $CI_{50}=0,09\pm 0,014$ (origen Apolo); INL 193-12 con $CI_{50}=0,097\pm 0,006$ (origen Cajuata); INL 162-12 con $CI_{50}=0,087\pm 0,015$ (origen San Buenaventura); las cepas que presentaron CI_{50} elevados son INL 327-11 con $CI_{50}=0,21\pm 0,032$ (origen La Asunta); INL 426-11 con $CI_{50}=0,335\pm 0,007$ (Origen Chulumani). La sensibilidad o la falta de esta puede ser un tema importante a investigar, ya que dentro de una misma especie las respuestas pueden ser totalmente diferentes, por ejemplo, la cepa INL 258-11 es 8 veces más sensible a esta droga que la cepa INL 426-11. El uso de la Anfotericina B es muy efectiva, incluso en pacientes que no responden a los antimoniales, pero tiene limitaciones causadas por la toxicidad renal, su alto costo y además es inconveniente debido a su administración intra venosa lenta (Bhandarihra et al., 2012) que requiere la internación de los pacientes para la administración.

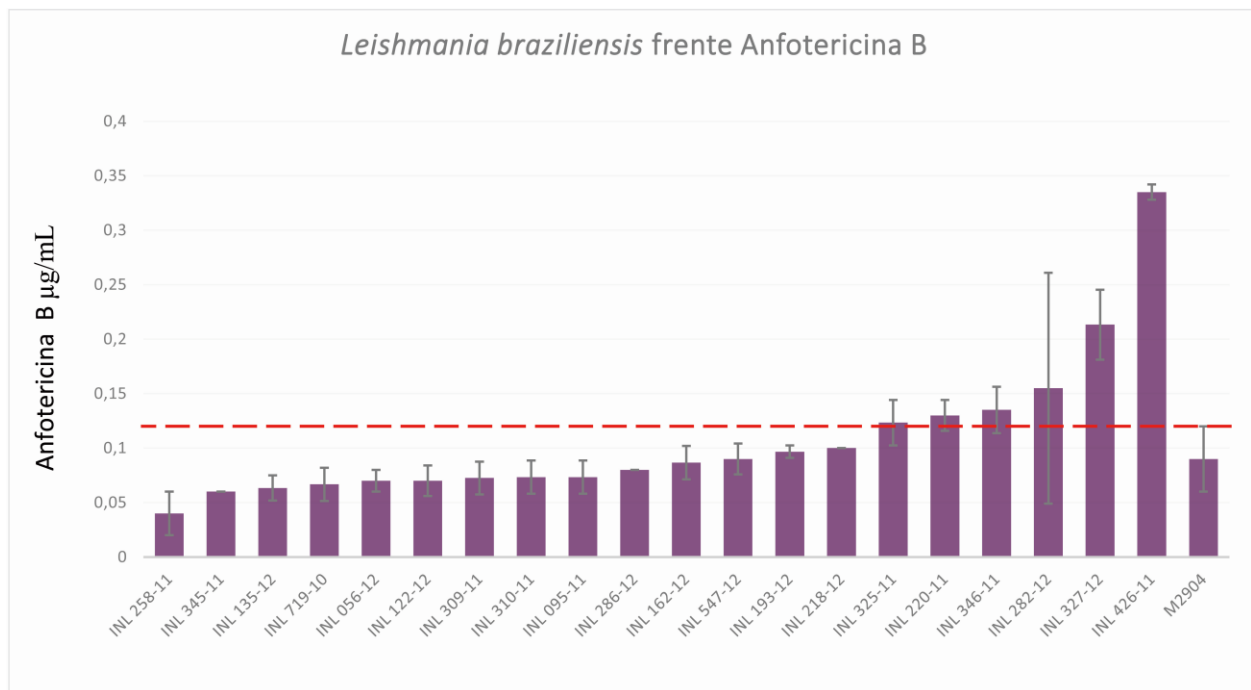


Ilustración 25 *L. braziliensis* frente a Anfotericina B

8.4.2.2 Miltefosina

Estudios realizados en Palos Blancos-Bolivia demuestran la eficacia de esta droga frente a *Leishmania braziliensis* (Soto et al., 2007) con un porcentaje de cura del 71% (51 pacientes de 72 evaluados) también se vio en Guatemala cuando se trató especies de *Leishmania* con Miltefosina el porcentaje de cura fue del 53%, en este lugar las especies más frecuentes son *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*.

Las cepas sensibles de *L. braziliensis* frente a Miltefosina son INL 547-12 ($CI_{50}=0,5\pm 0$), INL 193-12 ($CI_{50}=2,03\pm 0,32$); también se pueden observar aquellas que presentan valores muy elevados, tales como: INL 282-12 ($CI_{50}=23,57\pm 0,902$) o también INL 325-11 ($CI_{50}=23,8\pm 0,14$). Otras presentan CI_{50} próximos a los de las cepas de referencia, como: INL 135-12 con $CI_{50}=8,83\pm 1,74$; INL 327-12 con $CI_{50}=7,7\pm 1,71$ (Figura 27). Se puede ver también que la cepa INL 193-12 ($CI_{50}=0,5\pm 0$) es 47 veces más sensible que la cepa INL 325-11 ($CI_{50}=23,57\pm 0,902$). En este grupo llama la atención la existencia de 5 cepas con CI_{50} altos, dos de Chulumani, dos de Caranavi y 1 de Larecaja (Anexo3), estas cepas pueden ser indicadores de cuál es la situación en estos lugares.

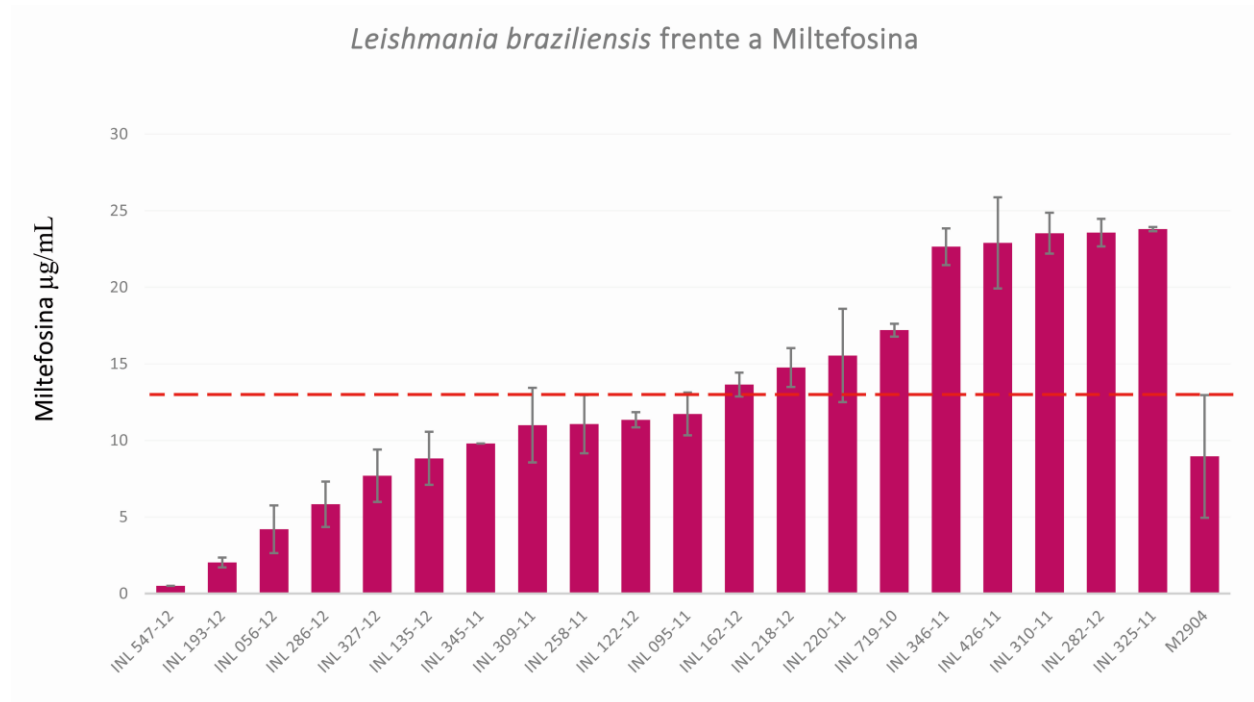


Ilustración 26: *L. braziliensis* frente a miltefosina

8.4.2.3 Alcaloides totales de *Galipea longiflora*

En cuanto a los Alcaloides Totales de la *Galipea longiflora* (CAT) frente a los parásitos de *L. braziliensis* se pudo ver que existe una gran diversidad de respuesta, pero la mayoría de las cepas presentaron valores de CI_{50} menores a los de la cepa de referencia, lo cual es un resultado muy prometedor. Así tenemos las cepas INL 719-10, INL 122-12, INL 547-12 (con $CI_{50} = a: 7,4 \pm 0,57; 5,2 \pm 0,57; 5,3 \pm 0,85$ respectivamente) cuyos resultados mostraron una gran sensibilidad a la droga. Cepas como: INL 286-12, INL 325-11, INL 282-12 (con $CI_{50} = a: 21,3 \pm 4,67; 23,4 \pm 0,566; 26,9 \pm 2,31$) deben ser objeto de mayor estudio, ya que, son cepas que presentan CI_{50} elevados para casi todas las drogas evaluadas en este estudio.

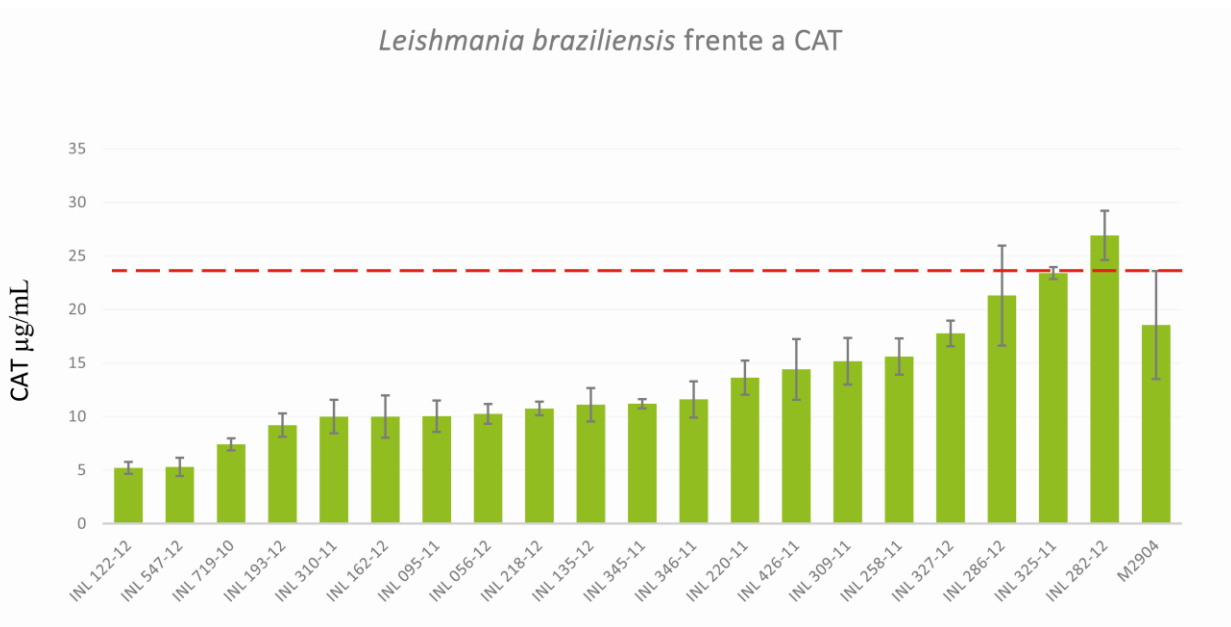


Ilustración 27 *L. braziliensis* frente a CAT.

8.4.3 Susceptibilidad *Leishmania lainsoni*

Del total de muestras con las que se trabajó en ese estudio, se identificaron 4 como como *L. lainsoni*, de las cuales, se pudo trabajar con 3 para el estudio de susceptibilidad ya que la cepa INL 527-11 no se adaptó a las condiciones de cultivo en el laboratorio; de esta forma contamos con resultados de 3 cepas de esta especie como se observa en los gráficos siguientes.

Como cepa control utilizamos a la cepa M2904 que es *L. braziliensis*, pero junto con *Leishmania lainsoni* pertenecen al mismo subgénero.

Es así que se observa que las cepas de INL 018-12 e INL 081-12 frente a Anfotericina B presentan CI_{50} próximo al de la cepa control, lo que nos permite deducir que estas cepas son sensibles, al contrario, la cepa INL 125-11 con $CI_{50}=0,22\pm 0,014$, nos indica que se trata de una cepa con baja sensibilidad a la droga (ilustración 28) el origen de esta cepa es Tipuani.

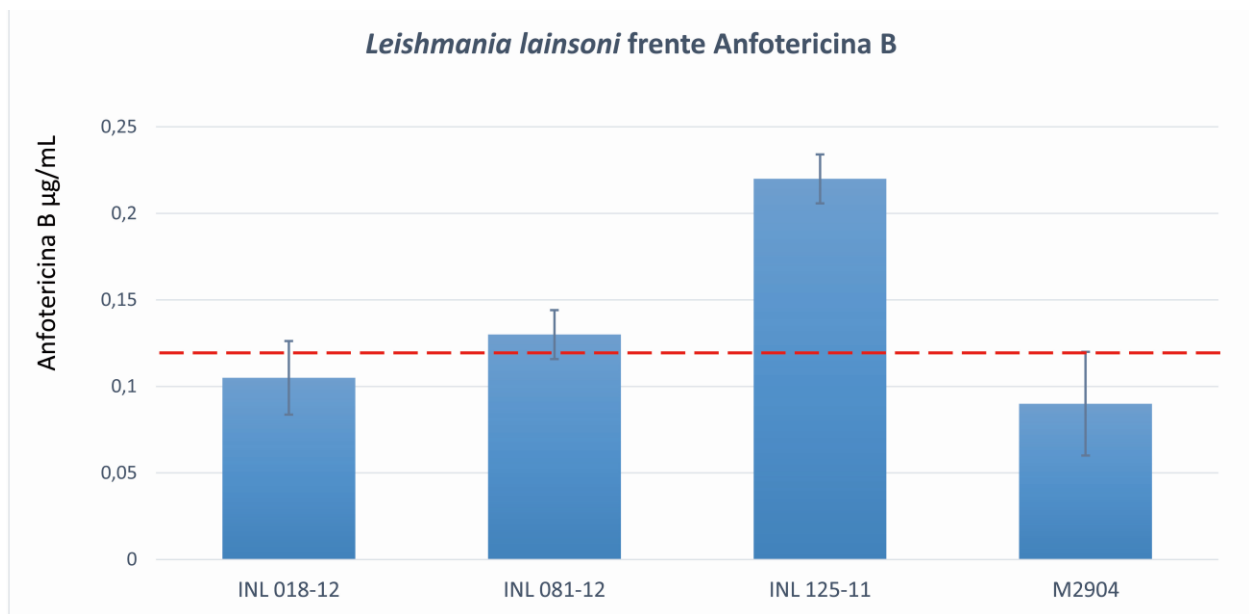


Ilustración 28 *L. lainsoni* frente a Anfotericina B

Cuando se trata de *L. lainsoni* frente a miltefosina se observa gran sensibilidad frente a la droga de parte de las 3 cepas, como se muestra a continuación (Ilustración 29).

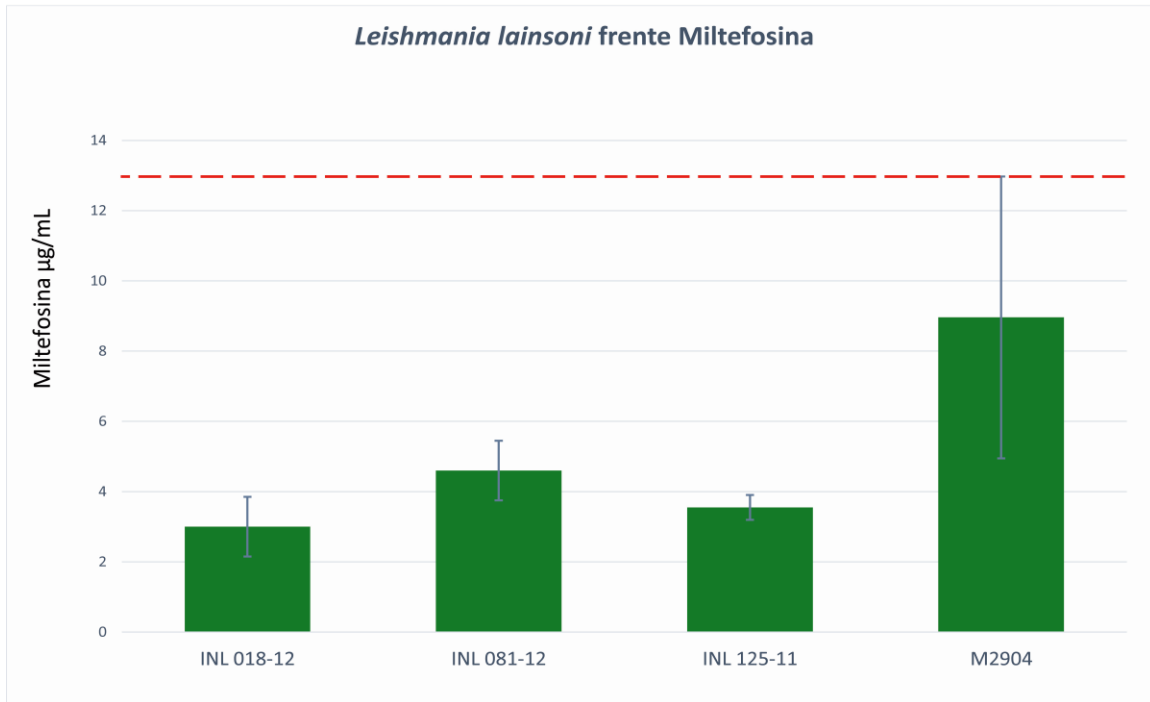


Ilustración 29 *L. lainsoni* frente a miltefosina

Cuando se enfrentaron promastigotes de *L. lainsoni* frente a los alcaloides totales de la *Galipea longiflora* los resultados fueron muy alentadores, como en los anteriores casos todas las cepas muestran una sensibilidad marcada a esta droga, todos los CI_{50} de estas cepas son menores a 11 µg/mL, comparando con la cepa de referencia que tiene un $CI_{50}=17,04\pm 4,31$ µg/mL.

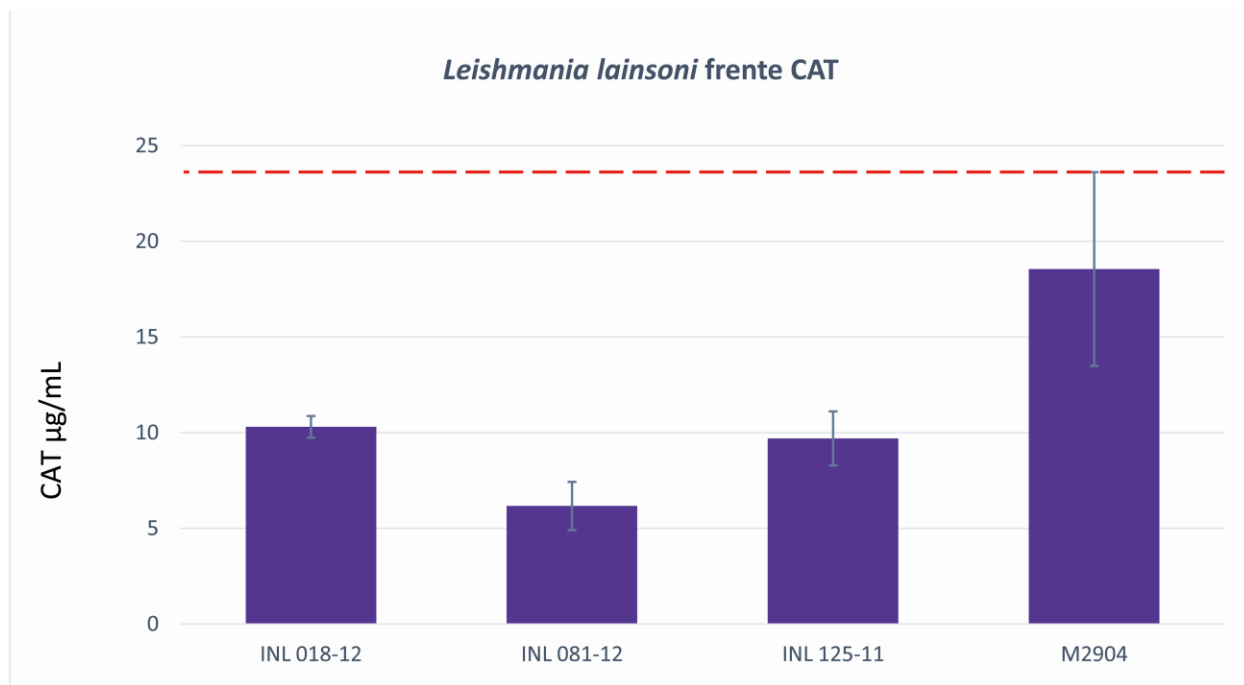


Ilustración 30 *L. lainsoni* frente a CAT

Con todo esto, se pudo ver que las respuestas frente a las diversas drogas de las cepas nativas analizadas en este estudio, son muy diversas y es difícil agruparlas en categorías, si bien existen especies muy sensibles a un determinado tratamiento, cepas de la misma especie pueden mostrar baja sensibilidad a la misma droga. No existe un tratamiento 100% efectivo frente a la Leishmaniasis, pero el poder determinar el nivel de susceptibilidad de una cepa proveniente de un paciente cursando con la enfermedad, puede ayudar a mejorar la resolución de la misma, además si se conoce la procedencia del paciente, se podría tener una idea de lo que está ocurriendo por esas regiones. En este estudio se puede ver que cepas procedentes de Cajuata, en su mayoría son de la especie *L. amazonensis* de las cuales varias presentan baja sensibilidad a la Anfotericina B, estudios sobre el tipo de tratamiento que se recibe en esta zona deberían realizarse para poder entender mejor esta baja sensibilidad.

Así también el método colorimétrico XTT-PMS nos permitió clasificar en diferentes categorías la respuesta *in vitro* (CI_{50}) de las cepas identificadas frente a los antiparasitarios evaluados en este

estudio (Ilustración 31). Se observa la media de los CI_{50} de todas las cepas estudiadas y están clasificadas según la especie frente a Anfotericina B. Los valores para las cepas de referencia frente a esta droga son: *L. amazonensis* (Lma) $0,198 \pm 0,08$ y para *L. braziliensis* (M2904) $0,09 \pm 0,03$; comparando con los resultados generales aquí obtenidos (Media de CI_{50}) se ve que la susceptibilidad de las cepas *L. amazonensis* está entre los $0,13$ a $0,14 \mu\text{g/mL}$ lo cual es menor a lo de la cepa de referencia, ilustración 3. Por otro lado la media de CI_{50} de *L. braziliensis* está alrededor de $0,10 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, que también es un resultado positivo, porque comparando con la cepa de referencia, no se encuentra alejado del valor de CI_{50} . Las cepas *L. lainsoni* son las únicas que no muestran resultados favorables, pero cabe resaltar que el universo de trabajo de esta especie es muy reducido (3 cepas), por lo tanto, se deben realizar mayores estudios para poder tener datos significativos.

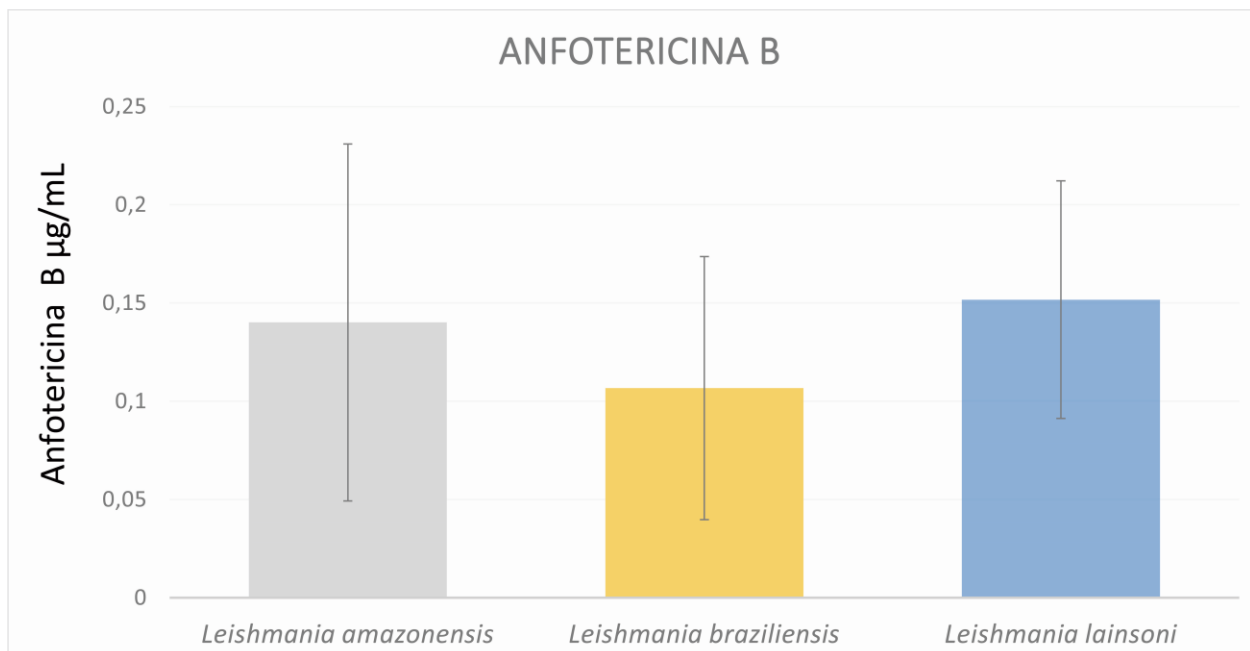


Ilustración 31 Resultados generales de las diferentes especies frente a Anfotericina B

Resultados diferentes se observan cuando se trató con Miltefosina, se ve que *L. braziliensis* presenta una media de $CI_{50} = 13,08 \pm 7,36$, si bien el rango entre el que oscilan los resultados es amplio, se ve que una mayoría están por lo $13,08 \mu\text{g/mL}$, valor que está 4 puntos más que el de

la cepa de referencia ($8,96 \pm 4,01$). Si se observa en las gráficas individuales anteriormente descritas, todas las agrupaciones presentan cepas muy sensibles a miltefosina, y en el caso de *L. braziliensis* la respuesta es más diversa y se ven más casos de baja sensibilidad que con las otras cepas. Por otro lado, *L. amazonensis*, presentan una media de $CI_{50} = 5,48 \pm 4,27$, el cual es menor al de la cepa de referencia ($7,87 \pm 2,54$), por tanto podríamos deducir que esta cepa es muy sensible a esta droga. Las cepas INL 325-11 (Chulumani), INL 282-12 (Larecaja) identificadas como *Leishmania braziliensis* son cepas que requieren estudios más profundos ya que presentan baja sensibilidad a las tres drogas evaluadas.

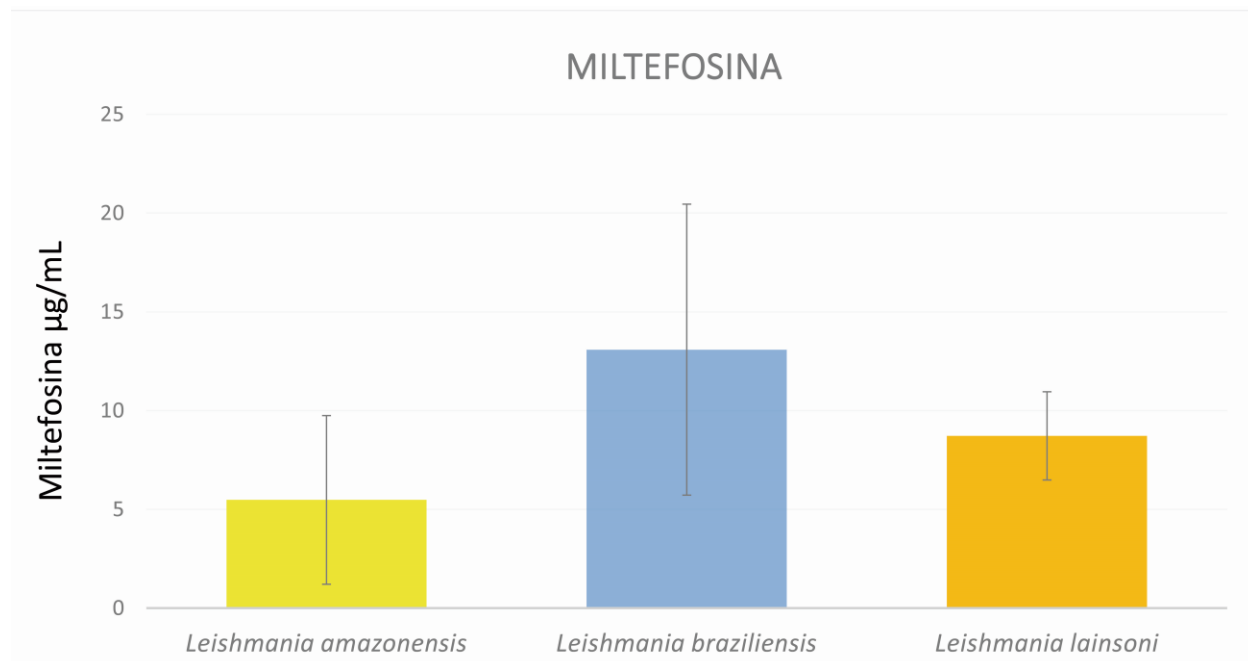


Ilustración 32 Resultados generales de las diferentes especies frente a Miltefosina

Existe una gran preocupación a nivel mundial debido a la creciente resistencia por parte de los parásitos de *Leishmania* a las drogas que actualmente se utilizan para el tratamiento, es por esta razón que consideramos importante realizar la evaluación de los alcaloides totales de la *Galipea longiflora* como tratamiento alternativo para la enfermedad. La droga se evaluó frente a cepas de referencia y sobre cepas nativas, cepas que han sido aisladas de pacientes de las regiones donde se encuentra esta planta y que podrían utilizarla. Los resultados que se obtuvieron son

muy alentadores y nos estimulan a seguir investigando sobre este tema y a seguir indagando más sobre posibles alternativas de tratamiento.

En cuanto a los Alcaloides Totales de la *Galipea longiflora* se puede observar que todas las muestras que se identificaron en este estudio presentan sensibilidad a esta droga. La cepa de referencia tiene un Cl_{50} $18,55 \pm 5,06$ para *Leishmania braziliensis* y $17,70 \pm 6,19$ para *Leishmania amazonensis*, y en la gráfica se evidencia que la media de Cl_{50} de todas las muestras, frente a esta droga, están incluso por debajo de los $16 \mu\text{g}/\text{mL}$.

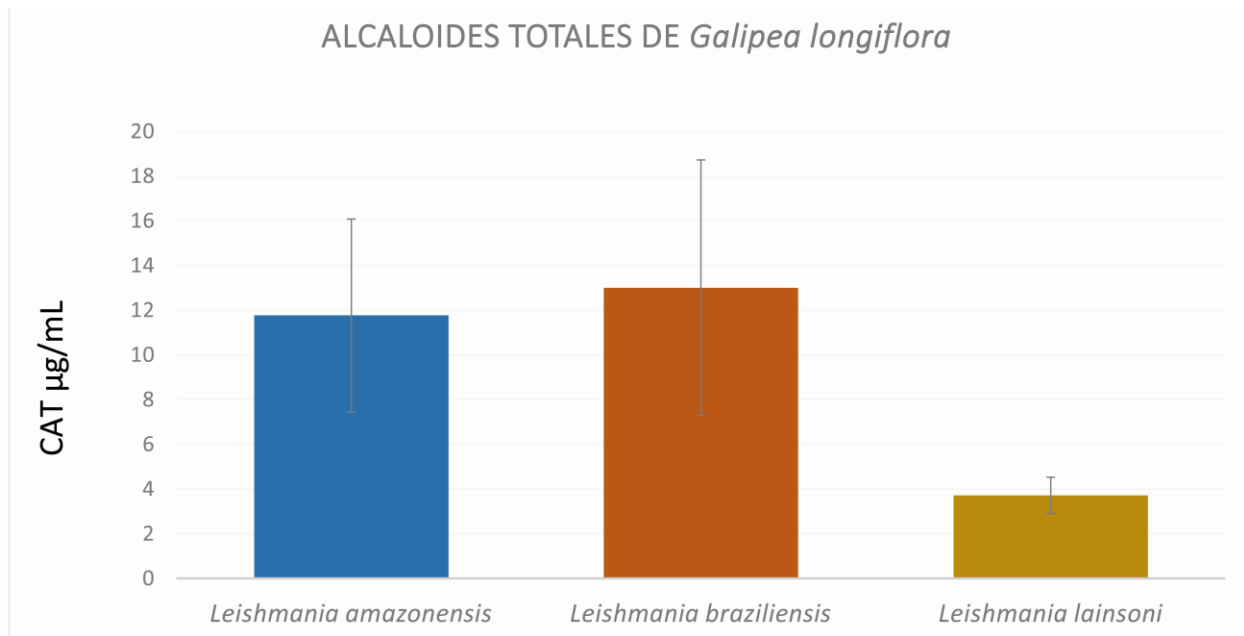


Ilustración 33 Resultados generales de las especies frente a los alcaloides totales de Galipea longiflora.

Con los datos obtenidos se pudo realizar la distribución geográfica de las cepas en estudio y además utilizando los datos generados de susceptibilidad también pudimos determinar los lugares donde se encuentran cepas poco sensibles a las distintas drogas evaluadas. En las siguientes ilustraciones podemos ver los mapas que detallan lo anteriormente mencionado.

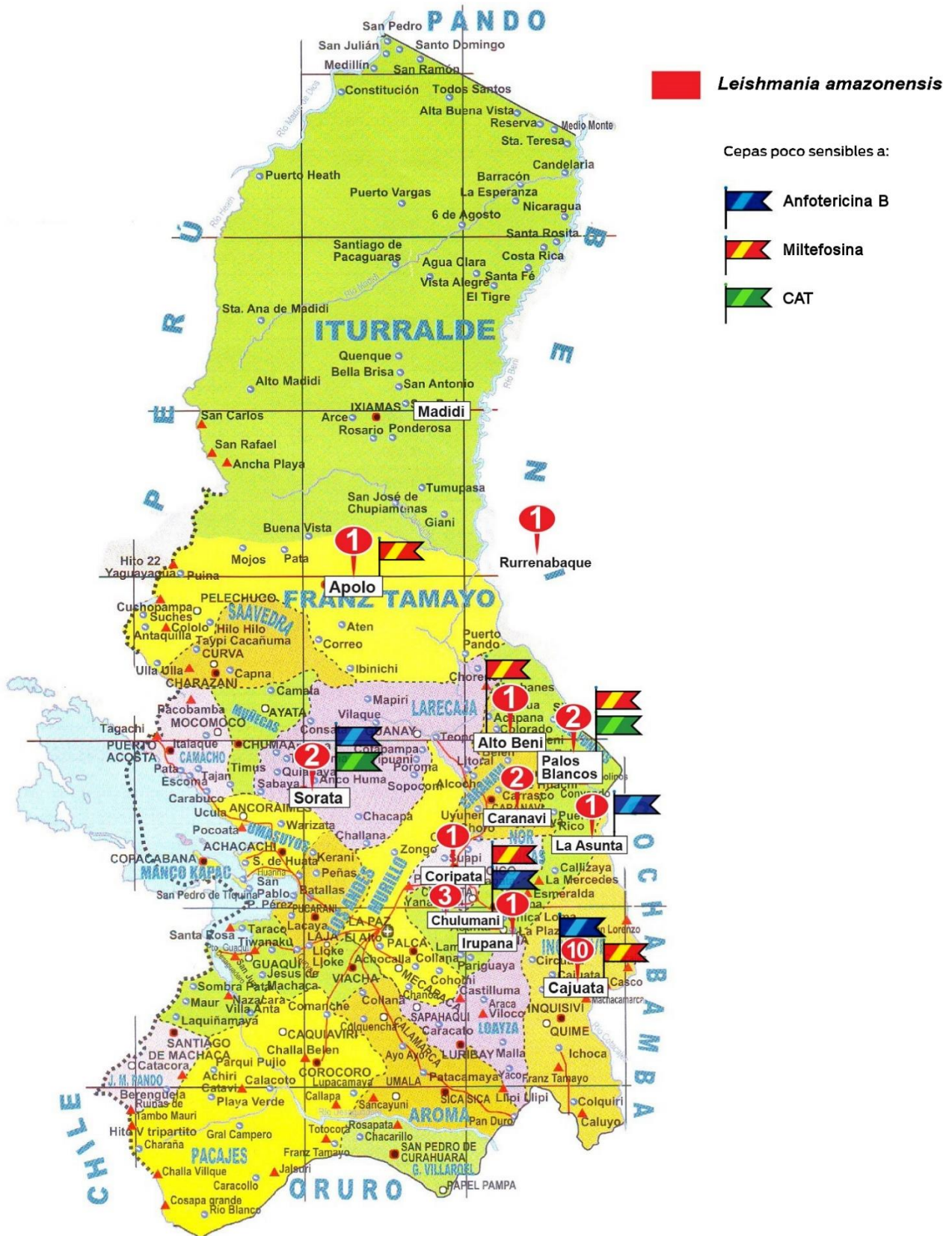


Ilustración 34 Origen y número de cepas identificadas como *Leishmania amazonensis* y casos poco sensibles.

9 CONCLUSIONES

- Se demostró la posibilidad de detectar el gen HSP70 en 51 especies de *Leishmania* mediante PCR-RFLP de HSP70.
- La identificación de especies de *Leishmania*, procedentes de diferentes regiones del Norte de La Paz, confirmo la presencia de 3 especies en esta zona: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania lainsoni*.
- *Leishmania amazonensis* predomina en la región de Cajuata; *Leishmania braziliensis* predomina en región de La Asunta y *Leishmania lainsoni* está presente en diferentes regiones y no muestra agrupación en una región específica.
- El método colorimétrico XTT-PMS nos permitió identificar aquellas cepas que presentan baja sensibilidad a las diferentes drogas evaluadas (Anfotericina B, Miltefosina y CAT).
- Se demostró que los alcaloides totales de la *Galipea longiflora* tienen un gran efecto leishmanicida, fue la única droga a la que pocas cepas nativas presentaron CI_{50} elevados.
- *Leishmania amazonensis* presenta cepas con sensibilidad baja a las drogas evaluadas y las cuales se encuentran en su mayoría en Cajuata, Chulumani.
- *Leishmania braziliensis* presenta gran cantidad de cepas poco sensibles frente a las diferentes drogas, se las puede agrupar sobre todo en Chulumani, Caranavi, La Asunta, Cajuata.
- La zonas con mayor cantidad de cepas con baja sensibilidad, sin importar la especie, son: Cajuata, Chulumani y La Asunta.
- Miltefosina es la droga que genera mayor cantidad de respuestas poco alentadoras, sobre todo en aquellas cepas identificadas como *Leishmania braziliensis*. Sin embargo, *Leishmania lainsoni* responde favorablemente a esta droga.

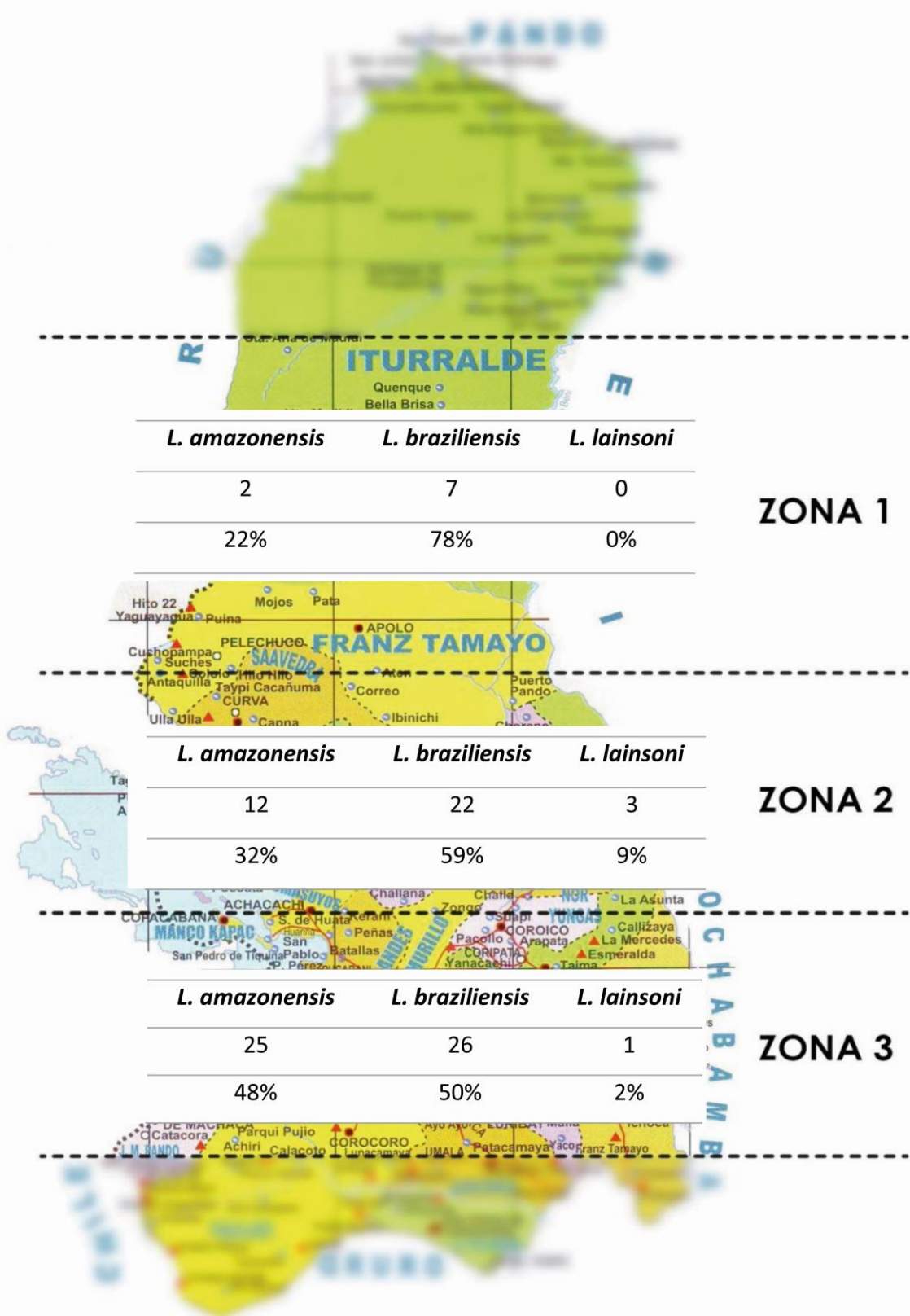


Ilustración 36 Distribución geográfica de 98 cepas nativas de *Leishmania spp.* Identificadas en el IIFB.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alexander J, Satoskar AR, Russel DG. *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. J Cell Sci 1999; 112:2993-3002.

Angels R, LePont F, Desjeux P. Visceral canine leishmaniasis in Bolivia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982; 76(5):104.

Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. Adv Parasitol 2006;61:227-79.

Alvar-Ezquerro JP. Las leishmaniasis: de la biología al control. Lab Intervet S.A. eds, Salamanca, España, 2003.

Alvar J, Cañate C, Gutierrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev 1997; 10:298-319.

Antori S, Calattini S, Longi E, Besetetti G, Piolini R, Magni R, *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV uninfected patients: A single center, 8 year experience in Italy and review of the literature. Clin Infect Dis 2007; 44:1602-10.

Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD. Phylogenetic analysis of the *Leishmania* genes by cytochrome b gene sequencing. Exp Parasitol 2009; 121:352-61.

Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol 2002; 49:42-3.

Arisue N, Sanchez LB, Weiss LM, Muller M, Hashimoto T. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protist, *giardia intestinales*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidias. Parasitol int 2002a; 51: 9-16.

Arruda W, Da Costa E, Nahas S, Rosenfeld G. LEismanoise visceral americana. Constatacao de Dois Casos. Bras ;ed 1949: 8-9: 63-5.

Bailey MS; Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol 2007; 25:203-11.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64:1-109.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correira D, Barral-Neto M, Carvalho E. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. Am J Trop Med Hyg 1995; 53:256-59.

Bastrena B, Mita N, Buistrago R, Vargas F, Flores M, Machane M. Human mixed infection of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* in a sub andean Bolivia area: identification by polymerase chain reaction/hybridizarion and isoenzyme. Mem inst Oswaldo Cruz 2003;98:255-64.

Beverley S, Akopyants N, Goyard S, Matlib R, Gordon J, Browstein BH, Stonmo G, Bukanova E, Hott C, Li F, MacMillan S, Muo J, Shwertman L, Smeds M, Wang Y. Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. Phil Trans R Soc Lnd B 2002; 357:47-53.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas Fm Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis . J Clin microbial 2006; 44:1435.39.

Bhandari V, Kulshrestha A, Deep DK, Stark O, Prajapati VK, et al. Drug Susceptibility in Leishmania Isolates Following Miltefosine Treatment in Cases of Visceral Leishmaniasis and Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6:1657

Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN. Genetics and visceral leishmaniasis of mice and man. Parasite Immunol 2009;31:254-66.

Bock JH, Langer PJ. Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. Mol Biochem Parasitol 1993; 62:187-97.

Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson E, Pearson RD, Reed SG. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. Am J Trop Med Hyg 2002; 67:344-48.

Cárdenas Alegría Oscar. Análisis de los marcadores Genético de minicirculos (13 A/ 13 B), Maxicirculos (Cyt b) y cromosómico (7SL ARN) para la identificación y diferenciación molecular de especies de *Leishmania sp.* A partir de cultivos *in vitro*. 2011 [Tesis de Maestría] UMSA. La Paz-Bolivia.

Cárdenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales A, Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. Am J Trop Med Hyg 2006; 75:273-77.

Calla-Carrasco J, Troye-Blomberg M, Fernández C. Extracto de alcaloides de *Galipea longiflora* (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro-inflamatorias: Factor de necrosis tumoral e interferón gamma *in vitro*. Rev Biofarbo 2007; 14:57-66.

Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JMC. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of hematophagous sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Proc Nat Acad Sci USA 1999; 96: 15155-60.

Clem A. A current perspective on leishmaniasis. J Glob Infect Dis 2010; 2:124-26.

Comunicacion Personal José Santalla. LP-INLASA. 2012.

Cordova O, Vargas F, Hashiguchi Y, Kato H, Gomez E. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y transmisión en áreas rurales en una región de Perú. Rev Peru Exp Salud Pub 2011; 28: 446-53.

Cornelly W, Espinosa O, Montenegro H, Cubila L, Capson T, Ortega-Barria E, Romero L. Hydrosoluble formazán XTT its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. J Microbiol Meth. 2003; 55:813-16.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverly SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995; 73: 145-55.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance to leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19:111-26.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciageli D, Borger R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saúde Pub 2000; 16: 925-50.

Desjeux P; Mollinedo S, Le Pont F, Predes A, Ugarte G. Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department) Isolation and isoenzyme Characterization

of 26 strains of *Leishmania brazileinsis braziliensis*. Trans of the Rol Soc of Trop Med an hyg. 1987. 81, 742-746.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95:239-43.

Dejeux P. Human leishmaniasis: Epidemiology and public Health aspects. World Health stat Q 1992; 45:266-75.

Dietze R, Fafundes S, Brito F, Milan P, Feitosa F, Saussuna B, Fonschiffrey G, Ksionski G. Treatment of Kala-azar in Brazil with amphocil (Amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days, Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1995; 45:309-311.

Dujardin, J.C., Gajendran, N., Hamers, R., Matthijsen, G., Urjel, R., Recacoechea, M., Villarroel, G., Bermudez, H., Desjeux, P., De Doncker, S., Le Ray, D. Leishmaniasis in the Lowlands of Bolivia. VII. Characterization and identification of Bolivian isolates by PFG karyotyping. In: Hart, D. (Ed.), Leishmaniasis: The First Centenary (1885–1985). New Strategies For Control. NATO ASI Series A, Vol. 163. Plenum, New York, 1987: 137–148.

Ersfeld K. Genomes and Genome projects of Protozoan Parasites. Mol biol 2003; 5: 61-74.

Espejo JM, Pratlong F, le Pont F, Mouchet J, Desjeux P, Rioux JA. Leishmaniasis in Bolivia. V. Human strains of *Leishmania (V.) braziliensis* from the Department of Pando. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989;84: 583.

Fariñas Guerrero F, Burgio F. Una zoonosis emergente. Argos; 40.

Flegontov PN, Strelkova MV, Kolesnikov AA. The *Leishmania major* maxicircle divergent regions is variable in different isolates and cell types. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 146: 173-79.

Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:359-77.

Folgueria C, Canavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitol* 2006; 134: 1-9.

Fournet A, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P, Bruneton J. Les chimanines, nouvelles quinoleines substituees en 2, isolees de une plante Bolivienne antiparasitaire : *Galipea longiflora*. *J Nat Prod.* 1993; 56: 1547-52.

Fuentes O. Flebótomos. *Microbiol Parasitol Med*, 2001; 3.

García AL, Kindt A, Bermidéz H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arévalo J, Quispe Tintaya KW, Dujardin JC. Culture-Independent species typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Base assay targeting heat shock protein 70 genes. *Jour Clin Micro* 2004; 42: 2294-97.

Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc of Trop Med Hyg* 2006; 101: 368-71.

Garcia AL, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin JC, 2007. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101: 1208–1213.

Gatti G, Boggino J, Prieto C. un nouveau foyer de leishmaniose viscérale en Amérique du Sud. Bull Soc Pat Exot 1939; 32:602-5.

Gil E, Cunha L, Goncalves A, Souza A, Valderrama N. Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis. Latin Am J Phar. 2007;26: 454-61.

Giménez A, Avila J, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona J, Salamanca E, Paredes C, Rodríguez N, Quints K, Feraudy C, Gutierrez I, Chuqui R, Quevedo Cm Dalence M, Carcope M. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora, krause*. Rev Bol Quimica 2005; 22:94-107.

Gonzales F, Zerpa O. Leishmaniasis cutánea en la infancia. Der Ped Lat. 2004; 2:97-108.

Guerin JP, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P. Visceral Leishmaniasis: Current status of control, diagnosis and treatment, proposed research and development agenda. Lancet 2002;2:494-501.

Grevelink S, Lerner W. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol 1996; 34: 257-70.

Grimaldi, G., David, J.R., McMahon-Pratt, D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987: 36, 270–287.

Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the new world: Current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 1993;6:230-50

Harrit AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S. A simple and economical direct agglutination test for sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80:583-6.

Hartl FU, Hayer-Harlt M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-8.

Herwalt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-9.

Horváth A, Berry E, Maslov D. Translation of the Edited mRNA for Cytochrome b in Trypanosome Mitochondria. *Science* 2000; 287: 1639-1640.

http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index5.html Acceso: Febrero 2013

<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/>. Acceso: Marzo 2013.

http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html Acceso: Febrero 2014.

<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fimage.ppat.v05.i08>. *PLoS Pathogens* Issue Image, 2009. Acceso : Enero 2014

<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> Acceso: Febrero 2014

http://www2.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/cbmso/plt_LineasInvestigacion.aspx?IdObjeto=40. Acceso: Febrero 2014

Ibrahim ME, Barker DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infect Genet Evol.* 2001; 1:61-8.

Ivens AC, Peacock CS, Wortley EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M. The genome of kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science* 2005; 309: 436-42.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis. A review. *Med Vet Entomol* 1990;4:1-24.

La Fuente, C., Recacoechea, M., Tibayrenc, M., Urjel, R., Darras, C., Cardozo, L., 1986. Leishmaniasis en Bolivia: Presencia de dos complejos de *Leishmania* en los llanos orientales del departamento de Santa Cruz—Bolivia. *Boletin cientifico del CENETROP*, Vol. XII, 1–15.

Lainson R, Shaw J. Evolution, Classification and geographical distribution. Academic Press Londres, 1987.

Launois P, Tacchini-Cottier F, Kieny MP. Cutaneous leishmaniasis: Progress towards a vaccine. *Experts Rev Vaccines* 2008; 7:1277-87.

Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Cerastegui C, Satamaria-Castellon G, Ramirez L. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2008; 46:223-31.

Lee MGS, Atkinson BL, Giannini SH, Van der Ploeg LHT. Structure and expression of the hsp70 gene family of *leishmania major*. *Nuc Acid Res* 1988; 16: 9567-85.

LePont F, Mollinedo S, Moucet J, Desjeux P. Leishmaniose en Bolivie V. Le chien dans les cycles de leishmaniose en Bolivie. *Mem Inst O Cruz* 1989; 84: 417:21.

LePont F, Desjeux P. Leishmaniasis en Bolivia: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva,1912) vector de Kala-azar en los Yungas. *Anuario IBBA*. La Paz: UMSA, MPSSP, ORSTOM, 1983: 149-53.

Lukes Julios, Guilbride D, Votipka A, Banne R, Englund P. Kinetoplast DNA network: Evolution on an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell* 2002; 1:495-502.

Mac Farlane J, Blaxer ML, Bishop RP, Kelly JM. Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70 KDA heat shock protein family. Eur J Biochem 1990; 190:377-84.

Manual Práctico del Tratamiento de le Leishmaniasis tegumentaria Americana. Unidad de Parasitología y Entomología INLASA. 2002. Publicación Técnica N 10, Ministerio de Salud y Previsión Social. Unidad Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Primera Edición La Paz 2002.

Martinez E, Le Pont F, Torrez M, Tellería J, Vargas F, Muñoz M, De Doncker S, Dujardin JC, Dujardin JP. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazoensis* in a sub Andean Region o Bolivia. Acta tropica 1998; 71: 97-106.

Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls A, Le Pont F. Co-infection by *leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2001; 96: 529-532.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. Int J Parasitol 2007; 37:565-76.

Mendes DG, Lauria-Pires L, Nitz N, Lozzi SP, Nascimento RJ, Monteiro PS. Exposure to mixed infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. Trop Med Int Health 2007; 12:629-36.

Mesa C, Muñoz D, Echeverry M, Vélez ID, Robledo SM. Susceptibilidad *in vitro* a infección por *leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según el tipo de macrófagos. Salud UIS 2010; 42:200-11.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimienta P, Secundino N, Dias E. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp* in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Ins Med Trop S Paulo 2002; 44: 255-59.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: update review of current and future diagnosis and treatment. J Am Acad Dermatol 2010; 63:309-322.

Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol 2003;1:29-45.

Mollinedo S. Leishmaniasis. Guía Operativa para el Control en Bolivia. 1 ed. La Paz: Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis; 2007.

Mollinedo S, Torrez M, Holguin E, Vargas F. Leishmaniasis en Bolivia Epidemiología de fin de Siglo. Rev Med. 2000; 7.

Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95:583-88.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends in chagas disease in latin america and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 17-30.

Montalvo AM, Fraga, Montano I, Monzote L, Marinb M, Van Der Auwera G, Dujardin JC, Velez ID Bernal, Muskus C. Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using Bccl for hsp70 PCR-RFLP. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010; 104: 364–67.

Monteiro de Barros O, Rosenfeld G. Leishmaniose visceral americana. Um caso da Bolicia. Rev Clin Sao Paulo 1942; 4:91-9.

Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzman-Bracho C, Jaffe C L. ITS1 PCR/RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in states of Mexican Southeast. Hindawi Publishing corporation 20124, 10: 1155-1161.

Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for new classification of the class *kinetoplastea*. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:1861-75.

Norma de vigilancia y control de leishmaniasis en Bolivia, Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) 2012.

Osorio E, Robledo S, Arango G, Muskus C. *Leishmania*: papel de la glicoproteína P en la medición de la resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. Biomedica:2005;25:242-60.

Ovale-Brancho C, Porras de Quintana L, Muvdi-Arenas S, Rios-Parra M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102:549-54.

Otero AC, da Solva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. Am J Trop Med Hyg 2000; 62:128-33.

Oliveira F, Brazil R, Pacheco R. Usefulness of PCR-based methods for screening *Leishmania* in epidemiological studies. TRENDS un parasitol 2005;21:552-53.

Papadopoulou C, Kundig C, Singht A, Ouellete M. Drug resistance in leishmania: similarities and differences to other organisms. *Drug resistances updatess* 1998; 1: 266-78.

Piscopo TV, Azzopardi CM. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 2006;82:649–657.

Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Sci* 1992; 256: 1812-5.

Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum hsp70* genes. *J Biol Chem* 1997; 272: 4493-99.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratloug F, Bastein P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use isoenzymes, suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990; 65: 111-25.

Ritmeijer K, Horst R, Chane S, Aderie EM, Piening T, Collin SM, Davidson R. Limited Effectiveness of High-Dose Liposomal Amphotericin B (AmBisome) for Treatment of Visceral Leishmaniasis in an Ethiopian Population With High HIV Prevalence. *Clin Inf Dis* 2011;53:152–58.

Reithinger R, Mohsen M, Aadil K, Sidiqi M, Erasmus P, Coleman PG. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul, Afganistan, *Emerg Infect Dis* 2003; 727-29.

Robledo SM, Valencia AZ, Saravi NG. Sensivity to Glucantime of *Leishmania Viannia* isolated from patients prior to treatment. *J parasitol* 1999; 85:360-66.

Robledo SM, Puerta JA, Muñoz DL, Guardo M, Vélez ID. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V)panamensis* en Colombia. *Biomedica* 2006;26:188-193.

Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania Mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Camb Univ Press 2002;124:495-507.

Rojas E, Parrado R, Delgado R, Reithinger R, Garcia AL. Leishmaniasis in Chaparé, Bolivia [letter]. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2009 Apr [date cited]. Available at: <http://www.cdc.gov/EID/content/15/4/678.htm>. DOI: 10.3201/eid1504.081257.

Romero G, Boalaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: 584.

Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol* 2006;44:459–67.

Salamanca Capusiri Efrain. Actividad antiparasitaria múltiple de Alcaloides Totales de corteza de *glipia longiflora* krause Kallunki (Evanta). 2008 [Tesis de Maestría] UMSA. La Paz-Bolivia.

Salamanca E, Ruiz Pinell G, Ticona JC, Gimenez Turba A. Metodo Colorimetrico-XTT como evaluacion de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *Biofarbo* 2008; 16:21-7.

Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A, Ramesh V. parasite detection in patients with post Kala Azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J Clin Pathol* 2003; 56:840-3.

Salotra P. y Singh R. Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian J Med.* 2006;123: 295-310.

Sanchez Montaña Rolando. Guia de trabajos de Biología molecular. La Paz- Bolivia. Facultad de Ciencia Farmaceuticas y Bioquímica-Universidad Mayor de San Andrés. 2008.

Sánchez-Saldaña L, Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, Regis-Roggero A. Leishmaniasis. Derm Peruana 2004; 14: 83-98.

Segatto M, Seccim Ribeiro L, Lamounier Costa D, Nery Costa CH, de oliveira MR, Guimaraes SF, Mara Macedo A, Silva Valadares HM, Diteze R, Alves de Brito C, Morreira Lemos E. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field population from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2012; 107: 39-47.

Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. Vet Parasitol 2008: 155; 198-203.

Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea I, Parra R, Ardiles J, Soto P, Gomez A, Molleda F, Fuentelsaz C, Anders G, Sindermann H, Engel J, Berman J. Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. Clin Inf Dis. 2007;44: 350–56.

Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto Paula, Valda L, Berman J. Efficacy of Miltefosine for Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008;78: 210–11.

Soto M, Quijada L, Larreta R, Iborra S, Alonso C, Reuena JM. *Leishmania infantum* possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. Parasitology 2003; 127: 95-105.

Souza W, Attias M, Rodriguez J. Review: particularities of mitochondrial structure in parasitic protist (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 2069-80.

Sulaiman IM, Morgn UM, Thompson RC, Lal AA, Xiano L. Phylogenetic relationships of *cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2385-91.

VADEMECUM, Especialidades Farmacéuticas. SIEF Ediciones-Octava Edición 2008. Pag:140-FD.

Villinski JT, Klena JD, Abbassy M, Hoel DF, Pupilampu N, Mechta S. Evidence for new species of *Leishmania* associated with focal disease outbreak in Ghana. *Diagn Microbiol Infec Dis*. 2008; 60: 323-7.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90:31-7.

Wickstead B, Klaus E, Keith G. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:360-75.

World Health Organization. The World Health Report 2004. Changing history. Geneva, WHO.

Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C, Shaw SE, Aktas M, Yabsley MJ. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *babesia* parasites from dogs. *Vet Parasitol* 2007; 145: 217-27.

Zurita AI, Rodriguez J, Pinero JEW, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A. Cloning and characterization of the *Leishmania(Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb 70. *J parasitol* 2003; 89: 372-8.

11 ANEXOS

Anexo 1

Tabla 6 Tipificación y procedencia de las muestras

No	Código	Procedencia	Especie	Donada por
1	INL 646-10	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
2	INL 690-10	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
3	INL 695-10	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
4	INL 719-10	Coripata	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
5	INL 135-10	La Asunta	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
6	INL 193-10	Palos Blancos	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
7	INL 097-10	Sorata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
8	INL 366-11	Apolo	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
9	INL 130-11	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
10	INL 191-11	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
11	INL 227-11	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
12	INL 265-11	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
13	INL 277-11	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
14	INL 313-11	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
15	INL 345-11	Cajuata	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
16	INL 310-11	Caranavi	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
17	INL 346-11	Caranavi	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
18	INL 220-11	Chulumani	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
19	INL 312-11	Chulumani	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
20	INL 325-11	Chulumani	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
21	INL 426-11	Chulumani	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
22	INL 410-11	Coripata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
23	INL 095-11	Inquisivi	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
24	INL 527-11	La Asunta	<i>L. lainsoni</i>	INLASA
25	INL 309-11	Muñecas	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
26	INL 295-11	Palos Blancos	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
27	INL 477-11	Rurenabaque	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
28	INL 125-11	Tipuani Cangalli	<i>L. lainsoni</i>	INLASA
29	INL 258-11	Ynacachi	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
30	INL 181-12	Alto Beni	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
31	INL 547-12	Apolo	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
32	INL 073-12	Cajuata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
33	INL 193-12	Cajuata	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
34	INL 169-12	Caranavi	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
35	INL 262-12	Caranavi	<i>L. amazonensis</i>	INLASA

36	INL 172-12	Chulumani	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
37	INL 174-12	Chulumani	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
38	INL 081-12	Cochabamba	<i>L. lainsoni</i>	INLASA
39	INL 056-12	Coripata	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
40	INL 249-12	Irupana	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
41	INL 135-12	La Asunta	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
42	INL 218-12	La Asunta	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
43	INL 286-12	La Asunta	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
44	INL 327-12	La Asunta	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
45	INL 018-12	La Paz	<i>L. lainsoni</i>	INLASA
46	INL 282-12	Larecaja	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
47	INL 122-12	Madidi	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
48	INL 371-12	San Borja	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
49	INL 162-12	San Buenaventura	<i>L. braziliensis</i>	INLASA
50	INL 194-12	Sorata	<i>L. amazonensis</i>	INLASA
51	INL 217-12	Yucumo-Beni	<i>L. braziliensis</i>	INLASA

Anexo 2

Tabla 7 Valores de Cl_{50} de *Leishmania amazonensis* frente a Anfotericina B, Miltefosina y los Alcaloides totales de *Galipea Longiflora*

Código	Procedencia	Complejo	Especie	Anfotericina B	Miltefosina	Alcaloides
				Cl_{50} $\mu\text{g/mL}$	Cl_{50} $\mu\text{g/mL}$	de <i>G. longiflora</i> Cl_{50} $\mu\text{g/mL}$
Clon 1 NHOM-BR-76-LTB-012				0,198±0,08	7,87±2,54	17,7±6,19
INL 181-12	Alto Beni	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,068±0,015	21,1±0,12	5,7±1,85
INL 366-11	Apolo	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,04±0,01	9,3±0,89	10,5±2,31
INL 073-12	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,11±0,021	3,95±1,20	19,05±0,49
INL 277-11	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,12±0,038	5,2±0,44	13,95±1,63
INL 646-10	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,115±0,007	5,83±1,53	7,75±0,78
INL 265-11	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,12±0	3,93±1	11,47±0,40
INL 227-11	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,17±0,021	4,83±0,74	14,37±1,36
INL 690-10	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,16±0,014	5,75±1,06	4,7±0,14
INL 695-10	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,19±0,021	9,95±0,64	15,6±0,71
INL 130-11	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,24±0,035	5,75±0,21	6,9±1,27
INL 313-11	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,23±0,028	1±0	9,8±2,09
INL 191-11	Cajuata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,46±0,064	7,73±1,69	12,95±1,91
INL 262-12	Caranavi	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,11±0,015	2,9±1,13	10,8±1,8
INL 169-12	Caranavi	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,14±0,023	5,55±0,35	9,33±1,76
INL 172-12	Chulumani	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,04±0,017	10,3±1,82	17,05±1,34
INL 174-12	Chulumani	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,063±0,006	2,87±0,76	8,95±1,77
INL 312-11	Chulumani	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,21±0,028	5,7±2,26	12,6±1,97
INL 410-11	Coripata	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,07±0,006	6,5±1,56	10,1±0,57
INL 249-12	Irupana	mexicana	<i>L. amazonensis</i>	0,12±0,014	2,7±0,28	11,2±0,79

INL 135-10	<i>La Asunta</i>	<i>mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	0,25±0,031	2,25±0,78	12,13±2,12
INL 295-11	Palos Blancos	<i>mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	0,017±0,006	9,57±1,12	20,1±1,70
INL 193-10	<i>Palos Blancos</i>	<i>mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	0,12±0,02	2,3±0,28	10,47±1,33
INL 477-11	<i>Rurrenabaque</i>	<i>mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	0,13±0	1±0,42	8,13±1,43
INL 194-12	<i>Sorata</i>	<i>mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	0,055±0,02	5,1±1	22,4±1,98
INL 097-10	<i>Sorata</i>	<i>mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	0,2±0	0,95±0,071	11,1±2

Anexo 3

Tabla 8 Valores CI_{50} de *Leishmania braziliensis* frente a Anfotericina B, Miltefosina y los Alcaloides totales de *Galipea longiflora*

Código	Procedencia	Complejo	Especie	Anfotericina B	Miltefosina	Alcaloides
				CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	de <i>G.longiflora</i> CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
M2904				0,09±0,03	8,96±4,01	18,55±5,06
INL 547-12	Apolo	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,09±0,014	0,5±0	5,3±0,85
INL 193-12	Cajuata	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,097±0,006	2,03±0,32	9,2±1,08
INL 345-11	Cajuata	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,06±0	9,8±0	11,2±0,424
INL 310-11	Caranavi	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,073±0,015	23,53±1,34	10±1,56
INL 346-11	Caranavi	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,135±0,021	22,65±1,20	11,6±1,70
INL 325-11	Chulumani	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,12±0,021	23,8±0,14	23,4±0,566
INL 220-11	Chulumani	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,13±0,014	15,55±3,04	13,63±1,60
INL 426-11	Chulumani	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,335±0,007	22,9±2,97	14,4±2,83
INL 719-10	Coripata	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,067±0,015	17,2±0,42	7,4±0,57
INL 056-12	Coripata	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,07±0,01	4,2±1,56	10,25±0,92
INL 095-11	Inquisivi	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,073±0,015	11,73±1,40	10,03±1,46
INL 135-12	La Asunta	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,063±0,012	8,83±1,74	11,1±1,56
INL 286-12	La Asunta	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,08±0	5,83±1,47	21,3±4,67
INL 218-12	La Asunta	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,1±0	14,77±1,27	10,75±0,64
INL 327-12	La Asunta	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,21±0,032	7,7±1,71	17,77±1,193
INL 282-12	Larecaja	<i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	0,155±0,106	23,57±0,902	26,9±2,31

INL 122-12	Madidi	<i>braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i>	0,07±0,014	11,35±0,49	5,2±0,57
INL 309-11	Muñecas	<i>braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i>	0,073±0,015	11±2,43	15,17±2,17
INL 162-12	San Buenaventura	<i>braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i>	0,087±0,015	13,65±0,78	10±1,98
INL 258-11	Yanacachi	<i>braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i>	0,04±0,02	11,07±1,90	15,6±1,70

Anexo 4

Tabla 9 Valores de CI_{50} de *Leishmania lainsoni* frente a Anfotericina B, Miltefosina y los alcaloides totales de la *Galipea longiflora*

Código	Procedencia	Complejo	Especie	Anfotericina B CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	Miltefosina CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	Alcaloides de <i>G. longiflora</i> CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
INL 018-12	<i>La Paz</i>	<i>lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>	0,105±0,021	3±0,89	10,3±0,57
INL 081-12	<i>Cochabamba</i>	<i>lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>	0,13±0,014	4,6±0,89	6,17±1,27
INL 125-11	<i>Tipuani</i>	<i>lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>	0,22±0,014	3,55±0,35	9,7±1,41

Anexo 5

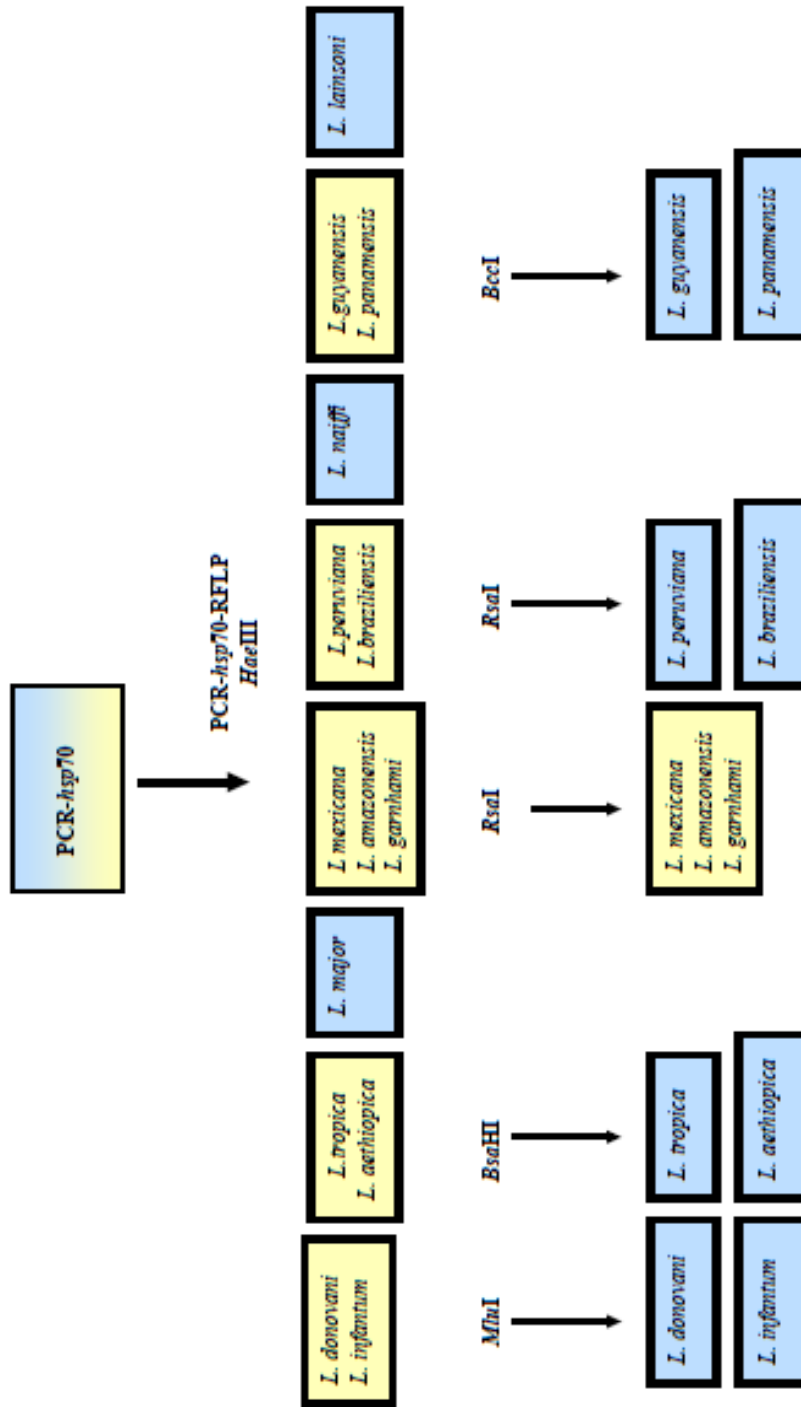


Ilustración 37 Logaritmo para diferenciar especies propuesto por Montalvo 2011.

Anexo 6

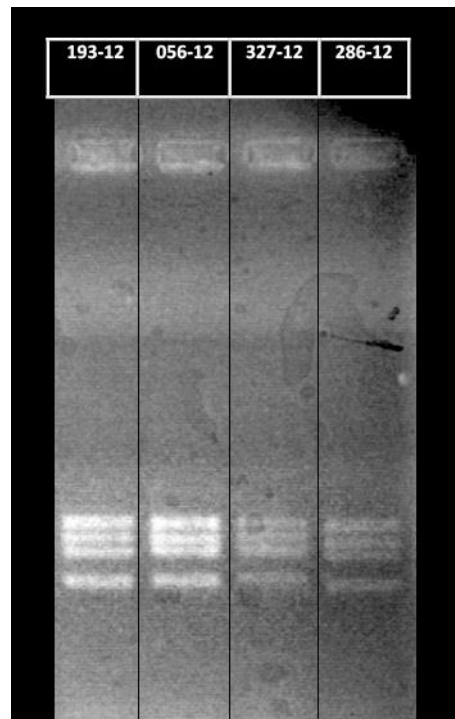


Ilustración 38 Fotografía de electroforesis de productos de restricción enzimática de cepas nativas, todas identificadas como *Leishmania braziliensis*.

Anexo 7

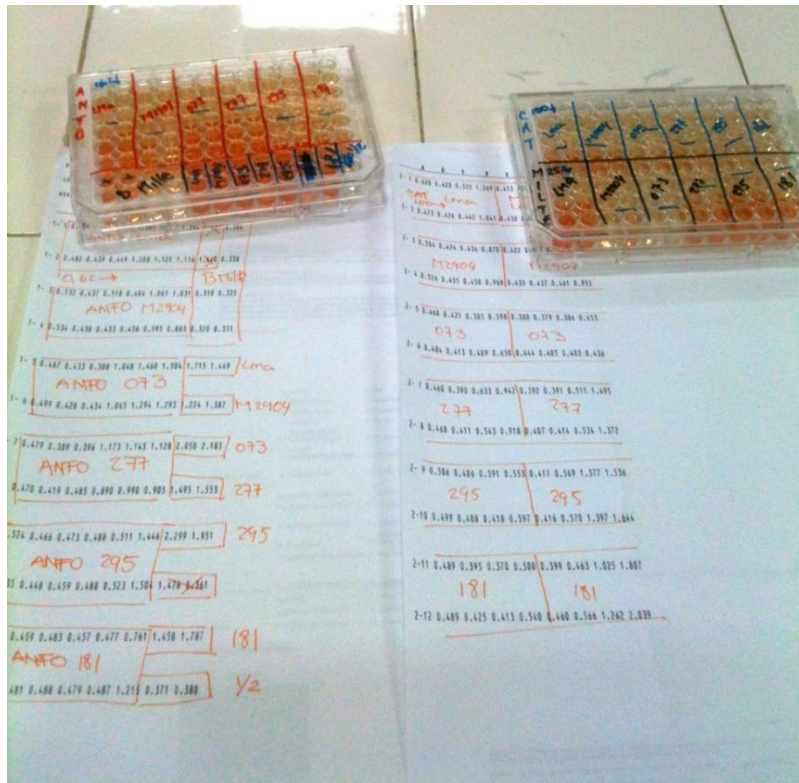


Ilustración 39 Placas de 96 pozos reveladas por el método XTT-PMS y sus lecturas de absorbancias.

Anexo 8

Tabla 10 Total cepas identificadas en el IIFB clasificadas por año de aislamiento

	2009	2010	2011	2012	total
<i>Leishmania amazonensis</i>	5	17	11	9	42
<i>Leishmania braziliensis</i>	1	36	9	11	57
<i>Leishmania lainsoni</i>	0	3	2	2	7
Total	6	56	22	22	106