

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización y filogenia de especies de *Leishmania*
(Trypanosomatida) responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea
humana en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado
por Daniel Augusto Juárez Payes
para optar por el grado de Licenciado en Biología

Guatemala

2017

Caracterización y filogenia de especies de *Leishmania*
(Tripanosomatida) responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea
humana en Guatemala.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización y filogenia de especies de *Leishmania*
(Trypanosomatida) responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea
humana en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado
por Daniel Augusto Juárez Payes
para optar por el grado de Licenciado en Biología

Guatemala


2017

Vo.Bo.:

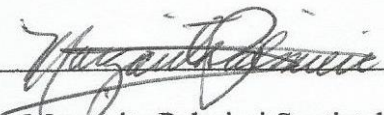
(f) 

Renata Mendizabal de Carrera

Tribunal:

(f) 

Renata Mendizabal Solé de Carrera

(f) 

Margarita Palmieri Santisteban

(f) 

Gabriela Alfaro Marroquín

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre del 2017 /

Prefacio y agradecimientos

La elaboración de este trabajo presentó un reto profesional y personal que duró alrededor de un año. En el último mes se intensificó al punto de realizar la mitad del trabajo de laboratorio en un solo mes. Antes de tener definido sobre qué realizar mi trabajo final, tenía la motivación de realizar algún tema que no solo me resultara interesante, sino que pudiera aportar a mejorar de alguna manera la situación de los guatemaltecos. En este caso el parásito que causa la leishmaniasis, a cuyo estudio fui introducido por Renata Mendizábal, que fue un apoyo constante que me guió por todo el camino con una buena actitud, que me ayudó a dar lo mejor de mí en la realización de este trabajo, lo que agradezco con mucho cariño. Este parásito es de importancia en la salud de los guatemaltecos principalmente personas en áreas rurales que no poseen apoyo médico. A través de proyectos, el Centro de Estudio en Salud tiene contacto con poblaciones afectadas por la leishmaniasis; es aquí donde encontré un espacio para dejar algo que permita mejorar la comprensión y apoyar a mejorar el diagnóstico de la enfermedad, lo que en un futuro redunde en un mejor control y prevención de la misma, para que las personas en áreas endémicas sufran lo menos posible. Se agradece a todas las personas que apoyaron en este trabajo, principalmente todo el equipo de *Leishmania* que me estuvo apoyando. Agradezco muy amablemente a Aura Paniagua por haberme apoyado y guiado en el laboratorio. Agradezco a Carlos Serrano por apoyarme constantemente, todos los consejos personales y de laboratorio y la compañía amena que me motivaba a seguir adelante a pesar de algunos obstáculos que tuve en el camino. Agradezco a Patricia Lupo por apoyarme en los comienzos de este trabajo y por todo el material donado muy amablemente por ella. Agradezco la ayuda de Enio Cano en el análisis filogenético y el apoyo que me dio. Agradezco a Gaby Alfaro por apoyarme en la entrega de mi trabajo final, que sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Y finalmente agradezco a mi familia por tener paciencia y apoyarme por un año más para realizar este trabajo, además del esfuerzo que han puesto toda mi vida para sacarme adelante para ser una persona preparada para el mundo. Este es uno de los primeros pasos que doy como profesional y no sería posible sin ellos y todas las personas que me apoyaron en este trabajo.

Índice

Prefacio y agradecimientos	v
Índice	vi
Listado de cuadros.....	viii
Listado de figuras.....	ix
Sinopsis	x
Abstract	xi
I. Introducción	1
A. Antecedentes	2
1. Manifestaciones de la leishmaniasis	2
2. Agente causal.....	4
3. Vector.....	6
4. Reservorios	7
5. Epidemiología y distribución	8
6. Diversidad genética	11
7. Tratamiento	12
8. Vigilancia y manejo de casos en Guatemala.....	15
a. Tratamiento en Guatemala	16
9. Métodos de diagnóstico	16
10. Análisis filogenético	21
B. Justificación.....	22
C. Objetivos	24
1. General	24
2. Específicos.....	24
D. Hipótesis de trabajo	24
II. Métodos	25
A. Toma de muestra.....	25
B. PCR	27
1. Marcador <i>hsp70</i>	28
2. Marcadores <i>mpi</i> y <i>6-gpd</i>	28
3. Electroforesis.....	29
C. Purificación productos PCR y secuenciación.....	30

D.	Análisis de datos.....	31
1.	Análisis filogenético.....	31
III.	Resultados	33
A.	Características de las muestras	33
1.	Extracción de ADN	33
B.	PCR.....	34
1.	Marcador <i>hsp70</i>	34
2.	Marcador <i>mpi</i>	35
3.	Marcador <i>6-gpd</i>	36
C.	Identificación y análisis filogenético.....	39
1.	Identificación de secuencias por análisis de homología (BLAST)	39
2.	Análisis filogenético.....	41
IV.	Discusión	48
A.	Factibilidad de extracción y calidad de ADN en muestras de raspados de lesiones de leishmaniasis cutánea teñidas con Giemsa	48
B.	Utilidad taxonómica de los marcadores <i>mpi</i> y <i>6-gpd</i>	50
1.	Marcador <i>mpi</i>	50
2.	Marcador <i>6-gpd</i>	51
3.	Marcador <i>hsp70</i>	53
C.	Inferencias de la diversidad de especies en Guatemala.....	55
V.	Conclusiones.....	57
VI.	Recomendaciones.....	58
VII.	Literatura	59
VIII.	ANEXOS	66

Listado de cuadros

CUADRO 1. Mezclas de reacción para el PCR del marcador <i>hsp70</i>	28
CUADRO 2. Programas de amplificación de PCR para cada set de cebadores del marcador <i>hsp70</i>	28
CUADRO 3. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los marcadores <i>mpi</i> y <i>6-gpd</i>	29
CUADRO 4. Programas de amplificación por PCR los marcadores <i>mpi</i> y <i>6-gpd</i>	29
CUADRO 5. Resultados de identificación, amplificación y secuenciación de las muestras seleccionadas.	40
CUADRO 6. Identificación de las muestras utilizadas por inferencia del análisis filogenético	46

Listado de figuras

FIGURA 1. Los principales síndromes que se presentan por infección de Leishmaniasis:.....	2
FIGURA 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. en el ser humano.....	5
FIGURA 3 Flebótomo del género <i>Lutzomyia</i> sp. presente solamente en América.....	6
FIGURA 4. Distribución de la leishmaniasis cutánea alrededor del mundo.....	9
FIGURA 5. Distribución de casos de LC en Guatemala en el 2007.....	11
FIGURA 6. Amastigotes de <i>Leishmania</i> sp. en un extendido de tejido de una lesión teñida con Giemsa y observada en el microscopio.....	17
FIGURA 7. Método de PCR convencional.....	20
FIGURA 8. Esquema general de la metodología utilizada.....	25
FIGURA 9. Comparación de la calidad del ADN extraído utilizando diferentes métodos de extracción en un gel de agarosa al 1,5%.....	34
FIGURA 10. Productos de amplificación del marcador <i>hsp70</i> (593 pb) separados en un gel de agarosa 1.5%.....	35
FIGURA 11. Productos de amplificación del marcador <i>mpi</i> separados en un gel de agarosa 1.5%.....	36
FIGURA 12. Productos de amplificación del marcador <i>6-gpd</i> separados en un gel de agarosa 1.5%.....	37
FIGURA 13. Re-amplificación de los marcadores <i>hsp70</i> (563 pb) y <i>6-gpd</i> (200 pb) en muestras negativas utilizando mayor cantidad de templado de ADN y separados en un gel de agarosa 1.5%.....	38
FIGURA 14. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen <i>hsp70</i> utilizando el método “máximo likelihood” con inferencia bayesiana de acuerdo al modelo TIM2+G.....	41
FIGURA 15. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen <i>mpi</i> utilizando el método “máximo likelihood” con inferencia bayesiana de acuerdo al modelo TPM1uf+l.....	43
FIGURA 16. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen <i>6-gpd</i> utilizando el método “máximo likelihood” con inferencia bayesiana de acuerdo al modelo HKY+G.....	44
FIGURA 17. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias concatenadas de los genes <i>hsp70</i> , <i>mpi</i> , <i>6-gpd</i> utilizando el método “máximo likelihood” con inferencia bayesiana de acuerdo al modelo TIM2+G.....	45

Sinopsis

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida que se distribuye en todos los continentes, siendo endémica en las regiones tropicales, incluida Guatemala. El síndrome más es la leishmaniasis cutánea que está representada por una amplia diversidad de especies. En Guatemala se han reportado al menos tres especies de parásitos causantes de leishmaniasis cutánea, pero no se ha realizado ningún análisis molecular de las relaciones entre estas especies. El laboratorio de Leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud posee placas de raspado de lesiones de leishmaniasis fijadas en Giemsa, producto de actividades realizadas durante más de 30 años. En este estudio se evaluó dicho material de parte de las muestras para extraer ADN de los parásitos responsables de las infecciones, mediante dos métodos de extracción, seguido de amplificación y secuenciación del material para realizar el análisis filogenético utilizando tres marcadores moleculares: *hsp70*, *mpi* y *6-gpd*. Las placas de raspado de lesiones mostraron ser un material adecuado para la extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación. Si bien ambos métodos de extracción evaluados resultaron ser exitosos para extraer el ADN del parásito, la extracción con agua tiene la ventaja de ser menos costosa y laboriosa, lo que facilitará que pueda ser aplicada en los servicios nacionales de salud. Se determinó que la región amplificada del marcador *mpi* no posee ningún valor filogenético y el marcador *6-gpd* no es adecuado para análisis filogenético a pesar de que tiene resultados similares en los árboles filogenéticos del marcador *hsp70*. Utilizando el marcador *hsp70* se encontró que *L. braziliensis* es la especie que presenta mayor diversidad en Guatemala con al menos tres variaciones diferentes en Guatemala. Se describe a *L. mexicana* como la principal causante de leishmaniasis cutánea en estas muestras evaluadas (52%). Se detectó dos muestras identificadas como *L. major* utilizando el marcador *hsp70*. El marcador *6-gpd* sugiere la presencia de *L. guyanensis* en Guatemala. Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados preliminares mediante la amplificación de otros genes con capacidad taxonómica específica de este grupo, complementado con cultivos de parásitos aislados y empleando identificación por medio de RFLP-PCR.

Abstract

The leishmaniasis is an emergent disease addressed as tropical neglected. Its distribution covers all continents, especially in tropical regions, such as Guatemala. The most common manifestation of the disease is the cutaneous form, which is caused by a wide diversity of species. Guatemala has reported at least three species of these parasites involved in the cutaneous form of this disease in the country. Nevertheless, not a single study has been done to explore the genetic diversity of these involved species. The Laboratory of Leishmaniasis from the Health Research Center stores an abundant supply of plates containing smears of leishmanious lesions fixated on Giemsa stain, which have been collected for 30 years. In this study, these plates were evaluated as a source of DNA of the parasites involved in these infections, while testing two different extraction methods. This was followed by a PCR amplification and a further sequencing used for the evaluation of three molecular markers: *hsp70*, *mpi* and *6-gpd*. These smear plates proved to be adequate for DNA extractions, PCR methods and sequencing. Both extraction methods were successful, highlighting the water extraction method, which obtained good-quality DNA for PCR methods. These *mpi* markers were useless, lacking any phylogenetical value or taxonomic discrimination within the samples analyzed here. Although *6-gpd* showed similar results to the tree topology from *hsp70* marker, it was not valid because of some inconsistencies found on the specie identification and mixed signals in the sequencing process. It was found, with the aid of the *hsp70* markers, that *L. braziliensis* possesses the highest diversity within the species, with at least three different variations in Guatemala. It was also found that the most frequent specie involved in the cutaneous form of this disease was *L. mexicana*, accounting for the 52% of the identified samples. As an exceptional finding, again using the *hsp70* marker, two samples were identified as *L. major* which is not supposed to be present in the American continent. The presence of *L. guyanensis* is suggested by *6-gpd*, yet it is not possible to conclude any further because of the lack of support from the other markers. We recommend using more appropriate markers (more specific, sensible and greater taxonomic value) coupled with parasite isolates through *in vitro* culture and PCR-RFLP identification by the *hsp70* marker.

I. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por parásitos kinetoplastidos del género *Leishmania*. Estos parásitos son transmitidos por moscas de la familia Psychodidae, específicamente del género *Phlebotomus*, en el viejo mundo, y *Lutzomya*, en el nuevo mundo (WHO, 2013). Una vez infectado el hospedero vertebrado, los parásitos atacan leucocitos y otras células del organismo donde se reproducen en gran número causando leves úlceras en la piel hasta úlceras que provocan mutilaciones faciales o formas que pueden comprometer órganos importantes (OGE, 2000). Dependiendo de la especie de parásitos se pueden presentar tres formas clínicas diferentes: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral y leishmaniasis mucocutánea. La forma clínica más común es la leishmaniasis cutánea, que se encuentra distribuida alrededor de todo el mundo y de ser desatendida puede comprometer la calidad de vida de las personas (WHO, 2016). Muchos de los casos de leishmaniasis requieren información taxonómica para completar un diagnóstico certero para agilizar tratamientos adecuados que ayudan maximizar el tiempo de curación del paciente (Aronson *et al.*, 2016). El género *Leishmania* posee una gran diversidad alrededor del mundo; comprendiendo aproximadamente 30 especies de las cuales 22 están involucradas en infecciones humanas (WHO, 2016). Dentro de estas especies se pueden definir dos sub-géneros importantes *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*, esta última distribuida únicamente en América. En América, al menos 15 de estas 22 especies están involucradas en los casos de esta enfermedad. En Guatemala se tienen reportadas cuatro especies causantes de leishmaniasis: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. infantum* (Alvar *et al.*, 2012). Guatemala se ha enfocado en el estudio epidemiológico (Herwaldt *et al.*, 1992), farmacológico (Arana *et al.*, 2001) (Navin *et al.*, 1992) y clínico (Navin *et al.*, 1990) de la enfermedad. Por motivos de financiamiento y falta de nicho, se ha dejado descuidada la importancia del estudio taxonómico de estos parásitos y su diversidad en el país, que puede mejorar el éxito de los tratamientos y salud del paciente si se acoplan estos estudios con técnicas de identificaciones rápidas y efectivas.

Palabras clave: leishmaniasis cutánea, filogenia, *hsp70*, *mpi*, *6-gpd*, secuenciación, Guatemala, diversidad, Giemsa.

A. Antecedentes

1. Manifestaciones de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies dentro del género *Leishmania* que parasitan principalmente a fagocitos mono-nucleados en diversos tejidos. Esta enfermedad se caracteriza por comprometer la piel, mucosas y órganos, dependiendo del síndrome de leishmaniasis que se presente, de la respuesta inmune del hospedero, el área geográfica donde se contrajo la infección y la especie causante de la misma (OGE, 2000). La leishmaniasis se presenta en tres diferentes manifestaciones clínicas: cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) (Figura 1).

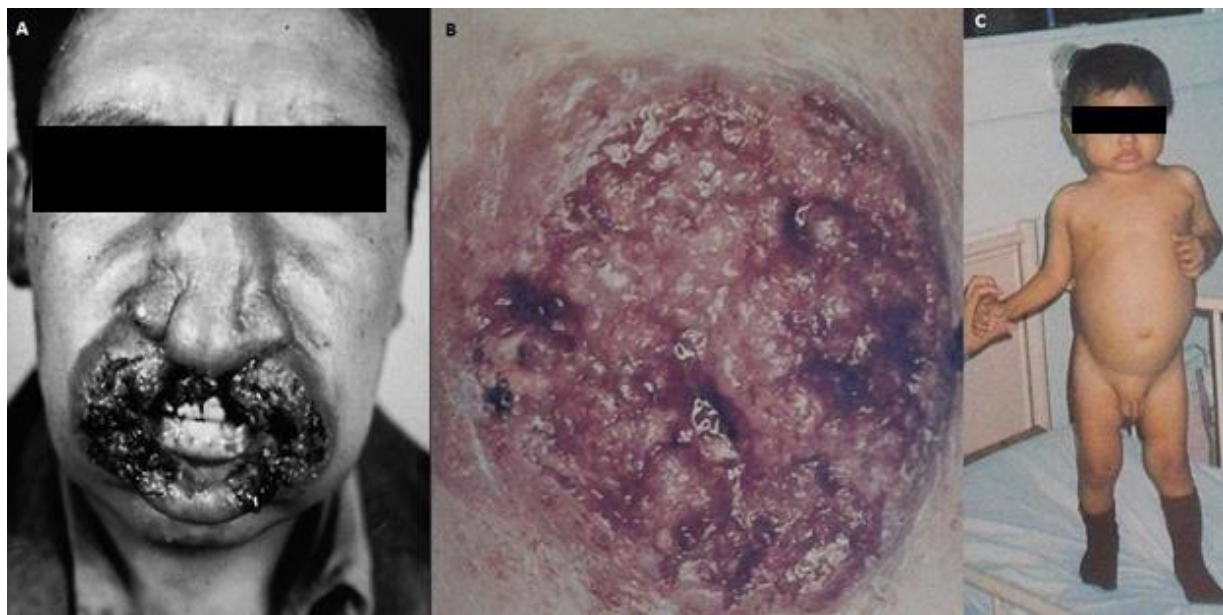


FIGURA 1. Los principales síndromes que se presentan por infección de leishmaniasis: A. leishmaniasis mucocutánea (LMC), B. leishmaniasis cutánea (LC), C. leishmaniasis visceral (LV). Fuentes: *Guía de apoyo para el diagnóstico de la leishmaniasis en los centros de salud en Guatemala, 1999* y *Universidad de Servicios Uniformados (USU), Medicina Tropical 2005*.

a. Leishmaniasis visceral (LV)

La leishmaniasis visceral o “Kala-azar” es una infección causada por parásitos del complejo *L. donovani* (*L. infantum*, *L. donovani* y *L. chagasi*) (Lukes *et al.*, 2007). Este tipo de leishmaniasis afecta normalmente las zonas rurales con población de bajos recursos y afecta a

personas con inmunodeficiencias (Chappuis *et al.*, 2007). En el 30% de los casos se presenta como una infección asintomática y el tiempo de incubación es de dos a seis meses luego de adquirida la infección, aunque algunas veces puede durar años. Los síntomas más comunes son fiebre, pérdida de peso, piel hiper-pigmentada, edemas en las articulaciones y organomegalia, lo que ocasiona hinchazón en el vientre (OGE 2000). Después de una atención adecuada, algunos casos desarrollan un cuadro clínico conocido como leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK), la cual ocurre seis meses después del tratamiento; los síntomas incluyen la aparición de lunares y pápulas en todo el cuerpo, desarrollándose más adelante en nódulos.

b. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) representa graves riesgos para la salud y se debe tratar inmediatamente. Es causada principalmente por parásitos del sub-género *L. (Viannia)* que incluyen *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffiy* y *L. lainsoni*, todos endémicos de las Américas. El cuadro clínico inicial de la LMC es idéntico a la LC, presentando en el 90% de los casos, cicatrices características de LC, pero después de uno a diez años los síntomas evolucionan en degradación del tejido (David y Craft, 2009). Los síntomas tempranos de la LMC son eritemas y úlceras alrededor de los labios y narinas, granulomas en el septum típicamente precedidos de adenopatía (Weigle y Saravia, 1996). Si no se trata se presentan edemas en las narinas, perforación del septum nasal, úlceras en el paladar, edema gingival y periodontitis. Finalmente se presenta la destrucción de la mucosa oronasofaríngea y los cartílagos faciales, ocasionando desfiguración y obstrucciones de las vías aéreas (Weigle y Saravia, 1996).

c. Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea (LC) está presente en todos los continentes excepto Antártica, siendo la más común de las leishmaniasis con 1.5 millones de casos al año, en comparación con la LV para la que se reportan 0.6 millones de casos anuales (WHO, 2016). Las especies responsables de las infecciones en América son *L. mexicana*, *L. braziliensis* o *L. guyanensis*, y en el viejo mundo *L. major* y *L. tropica*. Aunque esta enfermedad no pone en riesgo la vida del paciente, el hecho de tener úlceras abiertas aumenta el riesgo de infecciones secundarias por bacterias y hongos, y la morbilidad que ocasiona limita las actividades rutinarias de los

pacientes. El tiempo e incubación es de dos a ocho semanas desde el momento de la infección, aunque en algunos casos puede ser mayor. La lesión comienza como una pápula usualmente en las zonas expuestas de la piel, que con el tiempo va aumentando de tamaño y se convierte en un bulto que eventualmente progresa a una úlcera cubierta por una costra con un borde elevado muy característico. Generalmente es indolora a menos que se tenga una infección secundaria (Markle and Makhoul, 2004). A veces se puede presentar adenopatía y fiebre principalmente en infecciones causadas por *L. braziliensis* (al-Gindan *et al.*, 1989). El período de curación es especie-específico y región-específica; por ejemplo, la enfermedad causada por especies del viejo mundo suele sanar espontáneamente en la mayoría de casos, mientras que la ocasionada por especies del nuevo mundo tiende a desaparecer a los años, aún con tratamiento y normalmente dejando cicatriz (David y Craft, 2009). Se han hecho esfuerzos para identificar especies según las características de las lesiones, pero no se ha encontrado ningún patrón.

2. Agente causal

La leishmaniasis es causada por parásitos flagelados kinetoplastidos del género *Leishmania* dentro del orden Trypanosomatidae. Este género comprende unas 30 especies de las cuales 22 son causantes de la leishmaniasis en el humano (WHO, 2016). La *Leishmania* prolifera extracelularmente en su forma de promastigote en los intestinos de moscas de la sub-familia Phlebotominae de la familia Psychodidae. En esta etapa ocurre la reproducción asexual, aunque se ha observado intercambio genético. Se excluyen los parásitos del sub-género *L. (Viannia)* debido a que éstos se encuentran en el proctodeo del insecto cerca de la región pilar; el sub-género *L. (Leishmania)* se encuentra en el mesenterón.

a. Ciclo de vida

1). Ciclo de vida en el insecto hospedero

El parásito continúa su desarrollo dentro de las moscas flebótomas, transformándose de amastigotes a promastigotes en un proceso de ocho días (Sacks, 1989). La migración desde el intestino hacia el aparato bucal involucra diferentes morfotipos. Las nectomonadas, se alojan dentro la matriz quitinosa, que es posteriormente digerida por enzimas quitinólitas, y migran

hacia las células epiteliales del microvilli (Alexander *et al.*, 1999). En esta zona se originan las haptomonadas o metacíclicos, que posteriormente migrarán al esófago y faringe donde se transformarán en paramastigotes (Vannier-Santos *et al.*, 2002).

2). Ciclo de vida en el hospedero vertebrado

La infección en vertebrados ocurre cuando el flebótomo perfora el tejido epitelial, permitiendo el intercambio de fluidos, infectándolo con promastigotes (Vannier-Santos *et al.*, 2002). Han existido casos de infección por transfusión de sangre, hemodiálisis, trasplante de órganos, congénita o por contacto sexual. Una vez invadido el tejido, los parásitos son reconocidos por los fagocitos mononucleares que los engloban en una vacuola parasítica en donde se diferencian en amastigotes los cuales infectarán otros macrófagos y otros tejidos (OGE, 2000). El ciclo de transmisión continúa cuando otro flebótomo se alimenta de la sangre de un organismo infectado (Figura 2).

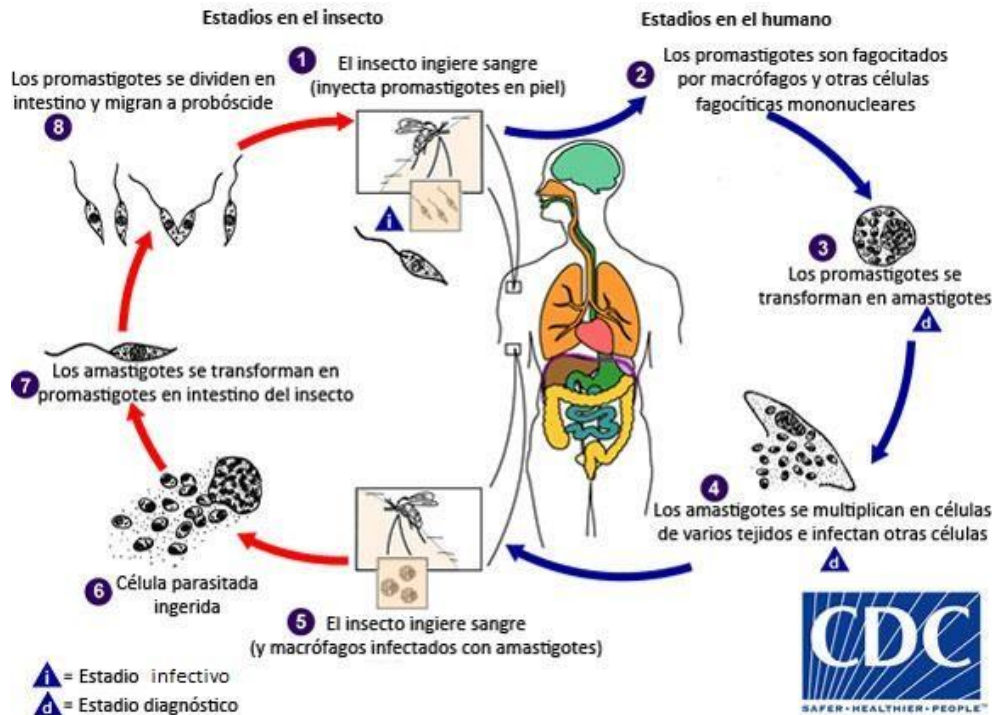


FIGURA 2. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. en el ser humano.

Fuente: modificado de CDC, 2013.

3. Vector

Los vectores de la leishmaniasis pertenecen a la sub-familia Phlebotominae, comprendiendo dípteros hematófagos vectores de *Leishmania* y otras enfermedades (i. e. Bartonellosis). En el viejo mundo la leishmaniasis es transmitida por dípteros del género *Phlebotomus* sp., mientras que en las Américas es transmitido por *Lutzomyia* sp. con alrededor de 400 especies descritas, de las cuales 50 son vectores de la *Leishmania* en humanos (WHO, 2013). Estos insectos miden 3.5 mm, las alas están dispuestas en forma de “V”, con numerosas setas (Figura 3). La venación de las alas es paralela. Poseen ojos negros, grandes y antenas filiformes con 16 segmentos. En América Latina las especies más recurrentes como vectores de la leishmaniasis en humanos son *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia evansi* y *Lutzomyia cruzi* (Carrasquilla y Kaufman, 2015).



FIGURA 3 Flebótomo mostrando el cuerpo lleno de setas y la disposición de las alas en de “V”.

Fuente: *Librería de imágenes de salud pública*, CDC, 2017.

Ciertas especies de flebótomos habitan en zonas desérticas y otras en zonas boscosas. El contacto con el humano ocurre en la cercanía a zonas rurales ya que la abundancia de los flebótomos es mayor en lugares con mucha vegetación (OGE, 2000). Dado que su desarrollo larval requiere de lugares húmedos y relativamente calientes, los lugares de anidamiento son madrigueras, heces u hojarasca. En el caso de *Lutzomyia* sp. se encuentran en bosques de

gambas o en cuevas (Claborn, 2010). El rango de vuelo de los flebótomos normalmente no sobrepasa los 300 metros del nido debido a que no son buenos voladores.

4. Reservorios

Se define un reservorio como un sistema de especies infectadas de forma crónica que mantienen la población de un agente infeccioso en la naturaleza y ayuda a su transmisión (Roque y Jansen, 2014). Dentro de los reservorios existen diferentes roles principalmente definidos por la competencia de transmisión del agente infeccioso. Se consideran los hospederos de mantenimiento aquellos que pueden ser infectados y mantienen la infección, y los hospederos amplificadores aquellos que además de mantener la infección presentan características que favorecen la transmisión, como por ejemplo el comportamiento, hábito, etc. (Miller y Huppert, 2014). Los estudios de hospederos reservorios no deben estar sesgados en un solo orden sino deben enfocarse en el orden con más biomasa o abundancia en determinada región para poder entender mejor las relaciones con el parásito (Haydon *et al.*, 2002).

Los parásitos del género *Leishmania* poseen una diversidad alta, lo que les permite tener una amplia disposición de huéspedes y por lo mismo un ciclo de transmisión complejo con características específicas a cada región. Se tienen documentadas infecciones del parásito en siete órdenes, cada uno con su nicho y comportamiento diferente, provocando que los reservorios sean inestables temporal y espacialmente (Rotureau, 2006).

Según Roque y colegas (2014) los siete órdenes de mamíferos reconocidos como los reservorios más recurrentes de la leishmaniasis son los siguientes:

Didelphimorfa: Principalmente el género *Didelphis* sp., los cuales son hábiles trepadores, viven en madrigueras o en la vegetación y se encuentran frecuentemente cerca de poblaciones humanas, alimentándose de la basura. En *Didelphis marsupialis* se han identificado cuatro especies de *Leishmania* diferentes.

Pilosa: Este orden incluye osos perezosos; se ha encontrado infecciones en *Bradypus* y *Choleopus* lo que los hace potenciales reservorios y una de las principales fuentes de transmisión de leishmaniasis en el estrato alto de los bosques.

Cingulata: La especie *Dasytus novemcinctus* ha reportado dos especies de *Leishmania*, es considerado un potencial reservorio debido a que usualmente invade gallineros introduciendo *Leishmania* a los flebótomos en las zonas domésticas.

Rodentia: Debido a la gran diversidad de nichos dentro del orden y a las estrategias reproductivas, es uno de los principales reservorios en el que se han identificado infecciones de unas 15 especies de *Leishmania*. Además, este orden es importante por su contacto frecuente con el ser humano.

Carnivora: Este orden posee un alto rango de nichos y comportamientos, pero los más importantes como reservorios son los perros y los gatos, reportándose la presencia de seis especies de *Leishmania* en ellos.

Primata: No se ha estudiado mucho su rol como reservorio, pero este podría influir en la introducción de reservorios a diferentes zonas, ya que por planes de conservación habitualmente son relocalizados, introduciendo la leishmaniasis en el ecosistema.

Chiroptera: No se ha estudiado mucho su rol como reservorios, pero debido a su ecología, son candidatos potenciales para la transmisión de *Leishmania*, principalmente por su comportamiento nocturno y lugar de anidamiento asociado a cuevas con alta cantidad de excretas acumuladas, muy similar al tipo de nicho que ocupa el flebótomo para su anidamiento.

5. Epidemiología y distribución

a. Epidemiología global

La epidemiología es el estudio del comportamiento de una enfermedad en poblaciones humanas. La leishmaniasis se encuentra distribuida en 98 países en todos los continentes, siendo la LC la más frecuente (WHO, 2013) (Figura 4). Se ha presenciado un crecimiento significativo en los casos de leishmaniasis atribuidos al transporte y turismo internacional y a operaciones militares, principalmente en países del noroeste europeo y norte de Estados Unidos (Devi *et al.*, 2014). Es endémica en Suramérica, Centroamérica, México, este del Mediterráneo, Asia y África.

En la región mediterránea se reporta LV y LC, y su transmisión es zoonótica y antroponótica. El principal causante de la LV es *L. donovani*. (Nuwayri-Salti *et al.*, 2000). En África la mayoría de casos están concentrados en el este, donde *L. donovani* es la especie más representativa causando 4 000 muertes anuales. Además, África presenta el 90% de la leishmaniasis visceral y la incidencia más alta de leishmaniasis dérmica post Kala azar (LDPK) (Devi *et al.*, 2014). En Asia los países más afectados son Bangladés, Nepal e India. India ha presentado problemas en el control de la leishmaniasis con 30 000 personas afectadas por la LV al año, principalmente por el desarrollo de resistencia de una cepa local de *L. donovani* (Devi *et al.*, 2014).

Recientemente ha surgido una infección oportunista entre LV y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección con VIH aumenta el riesgo de desarrollar LV en áreas endémicas, aumentando de 100 a 2 320 veces, disminuye las oportunidades terapéuticas e incrementa las probabilidades del deterioro de la salud (Pintado *et al.*, 2001). Además, representa un problema epidemiológico grave ya que los afectados por esta infección pueden servir como reservorios humanos. La infección con VIH y LV representa un 9% de todos los casos de LV. A la fecha, 35 países alrededor del mundo han reportado casos de infección de LV y VIH (Alvar *et al.*, 2008).

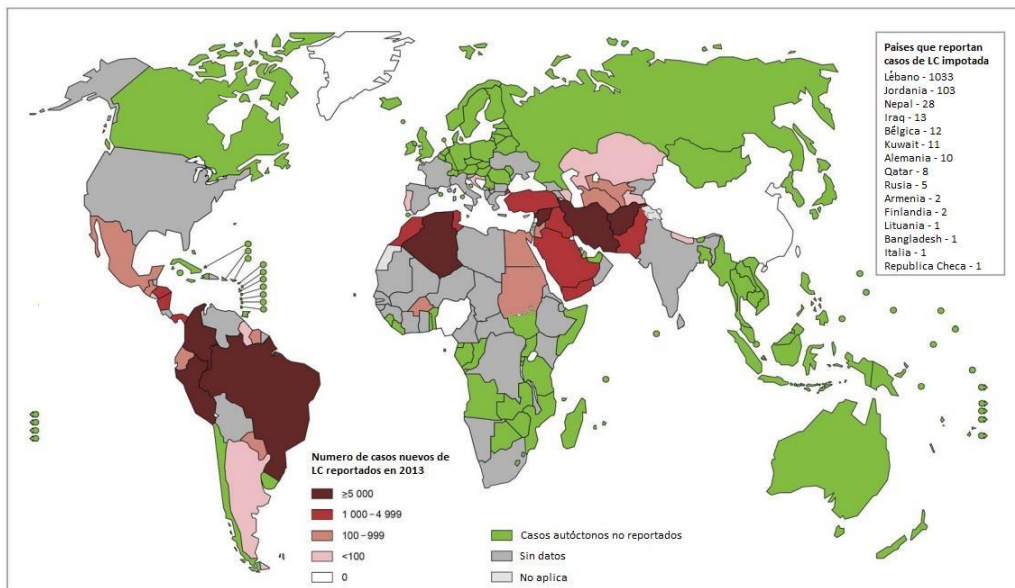


FIGURA 4. Distribución de la leishmaniasis cutánea alrededor del mundo.

Fuente: WHO, 2015.

b. Epidemiología en América

De los 98 países afectados por la leishmaniasis, 19 se ubican en América, en los que se han identificado 15 especies diferentes de parásitos de las 22 involucradas en infecciones en humanos. En América se pueden encontrar ambos sub-géneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*, y las especies que afectan al hombre son: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. colombiensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. liansoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lindenbergi*, *L. pifanoi* y *L. garnhami* (WHO, 2013). Entre las más distribuidas y que causan infecciones con mayor frecuencia están *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*.

En América los países afectados se pueden dividir en dos regiones, Suramérica y Centroamérica. En Suramérica el país con más casos reportados es Brasil. El número de casos ha aumentado de 4 500 a 35 700 en 15 años a causa de los frecuentes brotes. La incidencia es de 17,3 casos por cada 100 000 habitantes. Se documentó que la leishmaniasis afecta principalmente a hombres (78%) y personas mayores de diez años (90%) (Brandão-Filho *et al.*, 1999). En el caso de la LV se determinó una incidencia de 1,85 casos por cada 100 000 habitantes, afectando niños menores de diez años y mayoritariamente hombres. Además, se registró un aumento del 2,5% de co-infecciones leishmaniasis-VIH en 2006.

La LC es prevalente en el sur de México, principalmente en la península de Yucatán. Solo Chiapas y Veracruz reportan LMC. La enfermedad se ha ido extendiendo desde Yucatán hacia zonas aledañas. En 1989 la leishmaniasis estaba restringida solo a la península y sur del país (Andrade-Narváez *et al.*, 1990). Se han registrado 17 000 casos de LC entre 1990-2007, el 90% de casos de LC. La LV es más común en la zona central árida. Entre 1981 y 2010 se reportaron 141 casos.

c. Epidemiología en Guatemala

En Guatemala la forma más común de leishmaniasis es la LC. La mayoría de los casos son lesiones localizadas en zonas expuestas del cuerpo principalmente en hombres (67%) mayores de diez años (84%), según los datos del 2000-2007 (Morales 2008). La mayoría de casos están asociados a poblaciones que trabajan en zonas boscosas o que habitan en zonas rurales. Guatemala posee una incidencia de 0,1 casos por cada 100,000 habitantes. La mayoría de

casos son causados por *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Los casos de LMC son muy raros y solo se han reportado en Huehuetenango. En 1949 se documentó el primer caso de LV en un niño de dos años. Entre el 2000 y 2007 solamente se han diagnosticado 67 casos de LV con una incidencia de 9,8 por 100 000 habitantes (Morales, 2008). No se han documentado co-infecciones VIH-LV.

En Guatemala se han descrito cuatro especies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*, la mayoría de las infecciones causadas por *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Morales, 2008). En cuanto a la LV los departamentos en riesgo son: Izabal, Petén, Alta Verapaz, Quiché, Huehuetenango y Chiquimula. Mientras que para la LC los principales departamentos de riesgo son Petén, Baja Verapaz, Alta Verapaz, Izabal, Quiché, Escuintla y Jalapa (Figura 5). Registros del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportan para el 2016 a Petén, Alta Verapaz, El Progreso, Huehuetenango, Quiché, Izabal, Sololá y Zacapa como departamentos con casos sospechosos de LC.

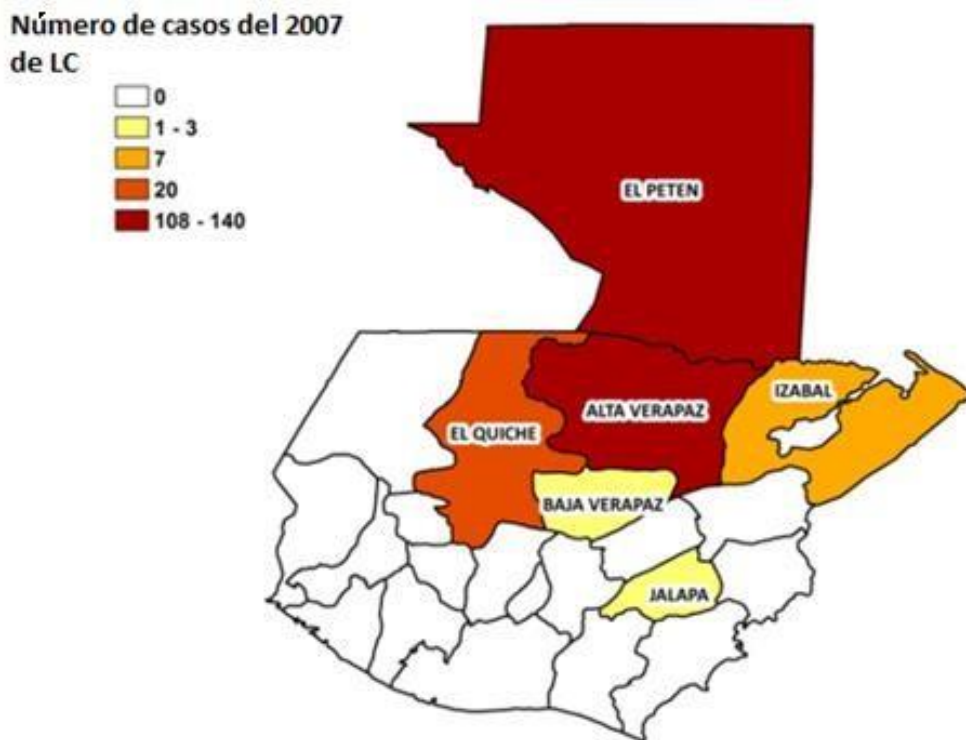


FIGURA 5. Distribución de casos de LC en Guatemala en el 2007.

Fuente: (Alvar *et al.*, 2012).

6. Diversidad genética

Leishmania incluye tres sub-géneros *L. (Sauroleishmania)*, *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)* (Cupolillo *et al.*, 2000). El sub-género *L. (Sauroleishmania)* incluye especies que afectan reptiles, *L. (Viannia)* son especies del nuevo mundo y *L. (Leishmania)* son especies del viejo mundo, aunque algunas se encuentran distribuidas en el nuevo mundo como *L. infantum*. Se sugiere que el género se originó en el Mesozoico y este divergió con la separación de África y Suramérica en el Cenozoico, formando los sub-géneros presentes hoy en día (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993). Dentro del género existen complejos de especies y subespecies. Los principales *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi* y *L. archibaldi*), *L. tropica* (*L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*), *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. garnhami* y *L. amazonensis*), *L. braziliensis* (*L. peruviana* y *L. braziliensis*), *L. guyanensis* (*L. panamensis* y *L. guyanensis*), *L. naiffi* y *L. liansoni*; todos estos complejos son defendidos por Fraga y colaboradores (2010) como especies y no como grupos.

Otros estudios confirman heterogeneidad genética explicando su alta variación y endemidad ampliamente distribuida en varios países (Cupolillo *et al.*, 1998). Otro estudio (Rougeron *et al.*, 2009) sostiene que existe un alto intercambio genético, ya que se encuentra baja heterocigosidad en las poblaciones de *L. braziliensis* explicando una fuerte estructura poblacional en una escala microgeográfica. La caracterización de *L. infantum* con microsatélites en el sureste de Francia reveló 121 diferentes genotipos, en total 91 son únicos y 30 son repetidos, sugiriendo variaciones en ciclos de transmisión entre dos áreas, diversidad de vector o huésped (Pomares *et al.* 2016). Debido a esta gran variabilidad existen problemas con la caracterización de las especies y el tratamiento de las infecciones que producen (Aronson *et al.*, 2016).

7. Tratamiento

Antes de darse cualquier tratamiento para la leishmaniasis debe considerarse cada caso como individual, debe ser evaluado dependiendo del cuadro clínico (si es LV o LMC debe ser tratado inmediatamente), y a qué grupo pertenece la persona a quien se le está ofreciendo tratamiento (i. e. niños, personas de la tercera edad, mujeres embarazadas o personas con problemas inmunológicos) (CDC, 2016). El tratamiento depende de la relación parásito-hospedero haciendo cada caso difícil de extrapolar. Los tratamientos para leishmaniasis de

primera línea son antimonio pentavalente (SbV), anfotericina b y pentamidina; otros tratamientos alternos incluyen miltesfosina, paromomicina, azoles, azitromicina, alopurinol, dapsona y rifampicina (Aronson *et al.*, 2016).

a. Antimoniales pentavalentes

El tratamiento con SbV ha sido el tratamiento de primera línea a nivel mundial desde 1940. Éstos interfieren con la glicólisis, tripanodina y la topoisomerasa Tipo I (Chakraborty y Majumder, 1988). Estos medicamentos son utilizados para todos los tipos de leishmaniasis, pero su efectividad varía dependiendo de la región geográfica y la especie; por ejemplo, en India se ha dejado de utilizar debido a que *L. donovani* ha desarrollado resistencia (Kobets *et al.*, 2012). Las desventajas de los antimoniales son los efectos secundarios que producen como artralgia, mialgia, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatitis, pancreatitis y náusea (CDC, 2016).

b. Anfotericina B

La anfotericina B fue introducida desde 1960; fue extraída de *Streptomyces nodulosus*, ésta se dosifica con otros lípidos de tejidos susceptibles para facilitar la distribución a todo el cuerpo. El medicamento es afín al ergosterol, un componente de la membrana plasmática del parásito, por lo que forma poros acuosos y lo destruye. Las desventajas de este medicamento son su baja solubilidad, baja disponibilidad y nefrotoxicidad. Este medicamento es ampliamente utilizado como tratamiento de tercera línea para la LV y es la mejor opción contra co-infección de leishmaniasis-VIH (Kobets *et al.*, 2012).

c. Pentamidina

La pentamidina es utilizada en América para el tratamiento de la LMC y la LC, principalmente ocasionadas por *L. panamensis* y *L. guyanensis* (Aronson *et al.*, 2016). Solamente se utiliza cuando no está disponible otra opción debido a sus efectos secundarios: nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, diabetes mellitus e hipoglucemia. Por esto se le considera un tratamiento de segunda línea (Kobets *et al.*, 2012).

d. Medicamentos alternos

1). Miltefosina

La miltefosina es el principal tratamiento oral para la leishmaniasis. Este causa que los promastigotes mueran por una apoptosis inducida debido a una amplia gama de interferencias bioquímicas en el parásito (Verma y Dey, 2004). Tiene efectos secundarios moderados: problemas gastrointestinales y nefrotoxicidad (Aronson *et al.*, 2016).

2). Paromomicina

La paromomicina es obtenida de cultivos de *Streptomyces rimosus*; a pesar que fue desarrollada en 1960, fue utilizada hasta 1980 en la LC. Su administración es tópica. Este medicamento afecta al parásito interfiriendo con la mitocondria, ácido ribonucleico, ribosomas e interfiere en la obtención de lípidos (Maarouf *et al.*, 1997).

3). Termoterapia

Existen otros tratamientos experimentales que pueden llegar a ser tratamientos de primera línea. El más destacado es la termoterapia, la cual tiene la ventaja de ser barato y no presentar síntomas secundarios. La termoterapia se ha realizado en comunidades en Suramérica, donde se cauterizan las heridas (Moreira *et al.*, 2002). La termoterapia está basada en la aplicación local de calor utilizando toallas húmedas calientes o agua circulante en compresas calientes, ultravioleta, infrarrojo y ultrasonido, generalmente se aplica con ayuda de instrumentos los cuales calientan la lesión a 50°C por 30 segundos; el número de aplicaciones varía según el tamaño (López *et al.*, 2012). La termoterapia es efectiva como método de curación, mostrando resultados similares al tratamiento con antimoniato. Además, es perfecto para pacientes con problemas de riñón, hígado y corazón, o pacientes especiales como niños, embarazadas y personas con problemas inmunes o VIH (Cardona-Arias *et al.*, 2015).

4). Fototerapia

Otro método que ha demostrado ser efectivo es el uso de fotosensibilizadores administrados tópicamente en la úlcera. Su mecanismo de acción está basado en moléculas que

absorben luz y transfieren la energía a receptores biológicos, generando un exceso de oxígeno reactivo, lo cual ocasiona la muerte de los parásitos con una efectividad de 90% en *L. major* (Asilian y Davami, 2006).

8. Vigilancia y manejo de casos en Guatemala

En Guatemala existe una guía para el manejo, vigilancia y tratamiento de leishmaniasis contenida en el Protocolo del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS, 2007). La guía fue diseñada para orientar la vigilancia en la identificación de casos de la enfermedad y fortalecer la respuesta de los servicios de salud para la atención de pacientes. Tiene como objetivos entender el comportamiento de la leishmaniasis en la población para poder establecer medidas de prevención y control adecuadas acorde a la región además de determinar los factores entomológicos involucrados en la transmisión de la enfermedad.

La vigilancia en Guatemala es de dos tipos: activa y pasiva. La vigilancia activa se realiza cuando surgen brotes, para lo cual el personal toma dos muestras por cada diez casos sospechosos ya sea en lugares de alta endemicidad o en pacientes migrantes con la finalidad de identificar eventos de forma temprana. La vigilancia pasiva consiste en la identificación de personas con cuadros clínicos sospechosos entre las personas que asisten a los servicios de salud. En caso de que se identifique un migrante atendido por demanda se inicia la fase de vigilancia activa. Las acciones de vigilancia contempladas en los protocolos incluyen la vigilancia de la morbilidad, la vigilancia de la mortalidad y la vigilancia, tanto como monitorización de la respuesta de servicios. este último involucra la capacitación anual del personal, análisis de balance de requisición y envío de suministros), el control de brotes y su eficiencia (detección del 100% de brotes en menos de 48 horas) y monitorización en el diagnóstico y tratamiento (MSPAS, 2007).

De acuerdo a las guías nacionales, los casos se definen en cinco tipos. Caso sospechoso de LC o LMC, caso confirmado de LC o LMC, caso sospechoso de LV y caso de muerte confirmada debido a LV. El diagnóstico se realiza a través de observación microscópica para LC y LMC, ambos métodos se rigen por controles de calidad del Laboratorio de Salud Nacional.

a. Tratamiento en Guatemala

La primera línea de tratamiento en Guatemala es el antimonio de meglumina (Glucantime®), aplicado por vía intramuscular profunda durante 7 a 20 días. Este tratamiento es administrado periódicamente por el personal de salud en los Centros de Salud correspondientes. En Guatemala se han hecho estudios terapéuticos con otros medicamentos o métodos que han mostrado ser buenas alternativas de uso; por ejemplo la paromomicina (Arana *et al.*, 2001), el ketoconazol (Navin *et al.*, 1992) y la termoterapia (Navin *et al.*, 1990).

9. Métodos de diagnóstico

El método de diagnóstico considerado como estándar para leishmaniasis es la observación directa del parásito a través de microscopía de extendidos de material obtenidos de úlceras o tejidos infectados. También se realizan comúnmente cultivo *in vitro* de los parásitos y pruebas moleculares o serológicas (Aronson *et al.*, 2016).

a. Microscopía

La microscopía es una herramienta de fácil disponibilidad y un método rápido para identificar parásitos de *Leishmania* y es el estándar de oro para el diagnóstico de la leishmaniasis. Sin embargo, no permite la identificación de la especie responsable de la infección. La microscopía se basa en la visualización de amastigotes en extendidos de tejido obtenidos de la lesión, a un aumento de x1000 (Weina *et al.*, 2004), ver Figura 6. Entre las tinciones más utilizadas se encuentra la de hematoxilina y eosina o la de Wright-Giemsa, pero principalmente se utiliza Giemsa, luego de la fijación con metanol (CDC, 2016). El diagnóstico microscópico de la leishmaniasis se puede complicar si hay presencia de otras enfermedades como la Enfermedad de Chagas, ya que los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* tienen morfología idéntica, requiriendo de otras herramientas complementarias (Kobets *et al.* 2012; Aronson *et al.*, 2016).

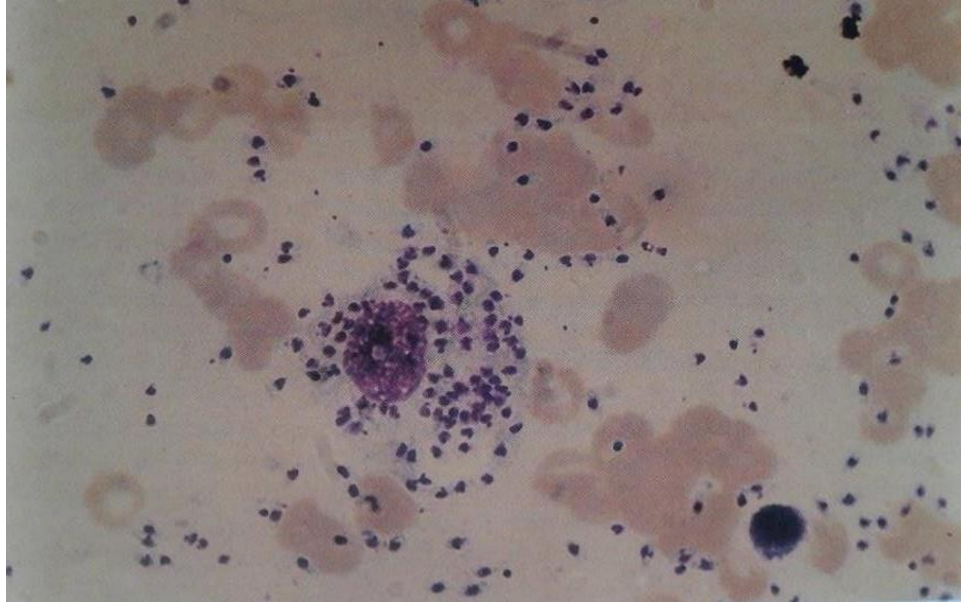


FIGURA 6. Amastigotes de *Leishmania* sp. en un extendido de tejido de una lesión teñida con Giemsa y observada en el microscopio

Fuente: *Guía de Apoyo Para El Diagnóstico De La Leishmaniasis en Los Centros de Salud*, en Guatemala, 1999.

b. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una herramienta poco versátil y sensible, pero con gran poder de detección. El cultivo se inicia con un aspirado o por medio de una biopsia (requiere de solución salina y antibióticos antes de cultivar) (OGE, 2000). El medio de cultivo más utilizado es el Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) normalmente a 26-24°C (CDC, 2016). Este método permite la confirmación parasitológica y puede ser utilizado para pruebas adicionales, identificación y almacenamiento de muestras. Es poco versátil debido a que *Leishmania* sp. puede tardar varias semanas para crecer y lograr obtener resultados positivos. Algunas veces los cultivos no son viables (44-69% de éxito) por lo que los resultados deben confirmarse a través de otras técnicas (Kobets *et al.*, 2012).

c. Métodos moleculares

1). Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE)

La técnica MLEE está basada en el análisis de isoenzimas y requiere de la preparación de cultivos del parásito. Es uno de los métodos más utilizados para la identificación de *Leishmania* y fue la técnica en la que se basaron los primeros estudios filogenéticos y una de las bases de la taxonomía actual de *Leishmania* (Kobets *et al.*, 2012). Esta técnica utiliza 15 enzimas para describir efectivamente una especie pero se ha encontrado enzimas con variabilidad suficiente para un diagnóstico rápido, entre éstas están: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-phosphogluco deshidrogenasa (6-GPD), manosa fosfoisomerasa (MPI) y aspartato deshidroisomerasa (Kreutzer and Christensen, 1980). La técnica MLEE y la técnica de isoenzimas requieren del cultivo y la subsecuente extracción de enzimas que son analizadas mediante electroforesis, esto define el zimodemo, que es el perfil de electroforesis de las enzimas (Rioux *et al.*, 1990). Este perfil es comparado con los zimodemos de cepas de referencia para definir especies y es utilizado para diagnóstico, pero su uso se ve limitado por su alto costo.

2). Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y derivados

Existen otros métodos moleculares de detección para *Leishmania* que utilizan diferentes marcadores y desempeño; en general todos pueden proveer resultados en menos de 24 horas sin necesidad de tener muestras viables con una sensibilidad y especificidad muy altas. Estos métodos son capaces de discernir entre género, sub-género o especie particular. Entre estos métodos se puede mencionar el PCR, el principal representante de los métodos moleculares (algunas de sus variaciones son PCR- en Tiempo Real (Q) y PCR anidado), NASBA y LAMP (Aronson *et al.*, 2016).

Las muestras para realizar un diagnóstico por medio de PCR no necesitan estar estériles ni ser abundantes, lo cual facilita su transporte. Sin embargo, idealmente deben ser almacenadas en alcohol absoluto. La principal desventaja de estas pruebas moleculares es la amplia variedad de protocolos que existen, lo cual hace difícil la validación de las pruebas entre diferentes regiones y hace necesario comprobar su reproducibilidad constantemente (Kobets *et al.*, 2012). El PCR es una herramienta útil y versátil para la detección e identificación de las especies causantes de la LC y LMC.

El PCR es una técnica con una alta gama de usos, desde el control de calidad de productos hasta la detección de patógenos difíciles de identificar, como en el caso de la leishmaniasis. Esta herramienta es fácil de utilizar y proporciona resultados confiables. Con el desarrollo del PCR en tiempo real (Q-PCR) se ha logrado un diagnóstico más específico, menos laborioso y rápido.

El Q-PCR se basa en el método convencional de PCR (ver Figura 7), pero involucra el uso de marcadores fluorescentes que son detectados en el mismo termociclador y permiten cuantificar los productos de amplificación con mayor sensibilidad y rapidez. El Q-PCR se ha utilizado extensamente para la detección de ADN de *Leishmania* (Schulz *et al.*, 2003). En el caso de la leishmaniasis, las regiones más utilizadas para la aplicación de pruebas moleculares son el ácido desoxirribonucleico (ADN) contenido en el kinetoplasto (ADNk), el gen *cytb* mitocondrial (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Asato *et al.*, 2009), el gen *hsp70* (Fraga *et al.*, 2010), y la región espaciadora ribosomal interna transcriptora (ITS1) ubicada entre las regiones 18S y 5.1S del gen del ARN ribosomal (Cupolillo *et al.*, 1995). El ADNk es ampliamente utilizado en Q-PCR y es considerado la prueba de oro para la detección del parásito pero no para la identificación de especie (Bensoussan *et al.*, 2006).

Otros genes han sido muy importantes en la tipificación de especies, entre éstos el gen ITS ha sido uno de los primeros genes utilizados para tipificar la diversidad de leishmaniasis (Cupolillo *et al.*, 1995), mientras que el gen *hsp70* ha permitido discernir con más detalle la diversidad dentro de *Leishmania* demostrando ser un marcador confiable para la identificación de especies y cepas (Fraga *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2013). En un estudio realizado en Perú, se utilizó Q-PCR para la identificación de los genes que codifican para las enzimas metabólicas manosa fosfato isomerasa (MPI) y 6-fosfogluco deshidrogenasa (6-GPD). Estos genes poseen mutaciones que permiten diferenciar entre especies del nuevo y del viejo continente (Tsukayama *et al.*, 2013).

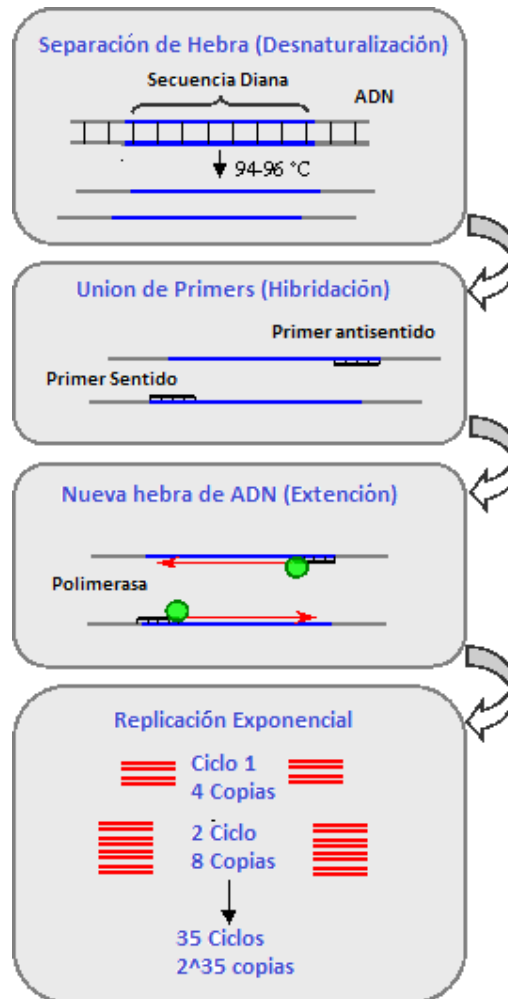


FIGURA 7. Método de PCR convencional

Fuente: Modificado de NCBI: “Probe Databases”.

El método de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) es un método basado en PCR versátil para la identificación más sensible de especies dentro del género *Leishmania* (Montalvo *et al.*, 2010). En el RFLP, las enzimas de restricción actúan sobre secciones ADN que presentan un patrón de bases específico para cada enzima. Normalmente esta herramienta está diseñada sobre patrones de bases que presentan variabilidad entre especies o individuos. Cuando estas actúan en una muestra generan un grupo de fragmentos de diferentes longitudes, la cual determina la identificación de la muestra. Este método ha probado ser muy útil en los estudios de identificación de *Leishmania*, compitiendo por efectividad y accesibilidad

con el método MLEE, el cual es considerado un estándar en la identificación de especies (Kobets *et al.*, 2012).

10. Análisis filogenético

La filogenética es el estudio de las relaciones evolutivas entre varios grupos de organismos. Esta relación puede evaluarse mediante la morfología, historia natural, ecología, distribución geográfica, comportamiento o molecularmente a través de secuencias de ADN o proteínas donde se busca definir la estructura e historia evolutiva de un determinado grupo taxonómico (Tsokana *et al.*, 2014). Entre las aplicaciones de la filogenia se pueden mencionar la identificación en diferentes regiones epidemiológicas, taxonomía e identificación, patrones de evolución de ciertos genes, proteínas o especies y cómo se distribuye la diversidad por medio de genética de poblaciones. Para realizar un análisis filogenético se requieren cuatro pasos: (I) identificar y adquirir secuencias homólogas; (II) alinear las secuencias; (III) estimar un árbol con las secuencias dadas; (VI) presentar el árbol de una manera que muestre información relevante y fácil de comprender (Tamura *et al.*, 2011).

El género *Leishmania* comprende organismos unicelulares, por lo que es imposible definir especies por medio de caracteres morfológicos lo que ha llevado a utilizar métodos bioquímicos y moleculares para su identificación (Banñls *et al.*, 1999), así como análisis filogenéticos para explorar la diversidad dentro del género. El primer método que se utilizó para hacer análisis filogenéticos en *Leishmania* fue el método MLEE (Rioux *et al.*, 1990). Eventualmente fue desplazado por métodos moleculares basados en PCR y secuenciación Sanger, que resultan ser más sencillos de usar y brindan información más detallada de las relaciones intraespecie e interespecie (Tsokana *et al.*, 2014). Entre los más destacados están la secuencias contenidas en los marcadores polA (Croan *et al.*, 1997), NAGT (Waki *et al.*, 2007), 7LS ARN (Zelazny *et al.*, 2005), la región ITS (Copolillo *et al.* 1995), el citocromo b mitocondrial (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Asato *et al.*, 2009) y el más reciente, el gen *hsp70* (Fraga *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2012).

B. Justificación

La leishmaniasis es considerada una enfermedad tropical desatendida que afecta a 98 países tropicales y subtropicales, entre ellos Guatemala. En el país, la leishmaniasis presenta sus tres formas clínicas: cutánea, visceral y mucocutánea, siendo la forma cutánea la más prominente. A pesar que las primeras investigaciones sobre leishmaniasis cutánea en Guatemala datan de finales de los años 50, su estudio tuvo un auge en la década de los 80. En Guatemala, la leishmaniasis cutánea se presenta en un 87,4% en personas con edades mayores a los diez años y afecta principalmente a hombres (67%) (Herwaldt *et al.*, 1992); se estima que 4 262 387 de personas están en riesgo de contraer la enfermedad en seis departamentos del país, según reportes del 2008 (Alvar *et al.*, 2012).

Los métodos de diagnóstico que se han utilizado en Guatemala tanto para investigación como para la evaluación de pacientes, son métodos tradicionales como la microscopía, cultivo *in vitro*, electroforesis de isoenzimas y últimamente, técnicas moleculares debido a su mejor accesibilidad, precio y sensibilidad en comparación con otros métodos (Wortmann *et al.*, 2007). Sin embargo, uno de los problemas que presenta la aplicación de la técnica de PCR es la amplia variedad de métodos y marcadores que se han desarrollado para las distintas regiones endémicas, lo cual complica la estandarización de los métodos y la comparación de resultados (Kobets *et al.*, 2012). Un método desarrollado en Perú por la Unidad 6 de investigación naval médica de los Estados Unidos (NAMRU-6), utiliza genes que codifican para isoenzimas (*mpi* y *6-gpd*) para la identificación de las principales especies de leishmaniasis cutánea del nuevo mundo (Tsukayama *et al.*, 2013). El método anterior resulta importante para el diagnóstico en Suramérica, pero su importancia filogenética y taxonómica no se ha comparado con métodos más ampliamente utilizados como los que se basan en la amplificación del marcador *hsp70*. Tampoco se ha explorado la habilidad de detección de los genes anteriores en la diversidad de *Leishmania* en otras regiones de América, mucho menos se ha explorado la diversidad de *Leishmania* presente en Guatemala.

Guatemala se ha enfocado en la investigación principalmente del diagnóstico, historia natural, inmunología, tratamiento y epidemiología de la enfermedad. Pero la investigación taxonómica y filogenética de los parásitos circulantes en el país ha quedado postergada. Sin embargo, este conocimiento es de suma importancia para entender la diversidad de las especies,

cepas y poblaciones de parásitos que existen en el país, que es considerado como área de endemismo del parásito. A pesar de que se ha realizado una amplia investigación sobre el parásito en otras regiones del mundo, la filogenia aún sigue en conflicto. Teniendo presente a un grupo de parásitos cuyas especies y cepas son difíciles de identificar debido a sus patrones de intercambio genético, hibridación y diferentes dinámicas poblacionales a nivel regional (Brito *et al.*, 2009; Boité *et al.*, 2012), más la falta de investigación en países en vías de desarrollo, los cuales suelen ser países endémicos de *Leishmania*, es prioritario impulsar la investigación epidemiológica, clínica y sistemática del parásito en estas regiones.

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar las especies y cepas de parásitos responsables de la leishmaniasis cutánea en Guatemala por homología de secuencias y sus relaciones filogenéticas. Al mismo tiempo se comparó la validez taxonómica de este método contra el marcador *hsp70*, el cual ha sido estandarizado con el estándar de oro MLEE y ha demostrado concordancia con este (Montalvo *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2013). Este método proporcionará información que puede ser utilizada en el futuro para estudios sobre tratamientos clínicos, diagnóstico y estudios epidemiológicos en el país.

C. Objetivos

1. General

Determinar las relaciones filogenéticas entre especies y cepas de *Leishmania* responsables de las infecciones por leishmaniasis cutánea en Guatemala, mediante el uso de los marcadores *mpi*, *6-gpd* y *hsp70* utilizando la técnica de PCR.

2. Específicos

- Determinar la validez taxonómica de las variaciones en las secuencias encontradas para los genes *mpi* y *6-gpd* en comparación con el marcador *hsp70* y su secuenciación.
- Evaluar la factibilidad de un método de extracción de ADN de *Leishmania* a partir de muestras de extendido de tejido de las lesiones en láminas teñidas con Giemsa.
- Estandarizar y evaluar las técnicas de amplificación por PCR de los genes *mpi*, *6-gpd* y *hsp70* para cepas de *Leishmania* de Guatemala.
- Caracterizar molecularmente las especies y cepas identificadas en las muestras mediante análisis de homología de secuencias.

D. Hipótesis de trabajo

Debido a la naturaleza exploratoria-descriptiva del estudio no se plantearon hipótesis de trabajo.

II. Métodos

La metodología consistió en la extracción de ADN de muestras de raspado de lesiones de LC teñidas con Giemsa, seguida por la amplificación, purificación y secuenciación de los productos de amplificación de los genes *hsp70*, *mpi* y *6-gpd* de *Leishmania* sp. Posteriormente se utilizó la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local (por sus siglas en inglés BLAST) para identificar las secuencias mediante un análisis de homología, seguido de un análisis filogenético de las especies identificadas en Guatemala. La metodología se resume en la Figura 7.

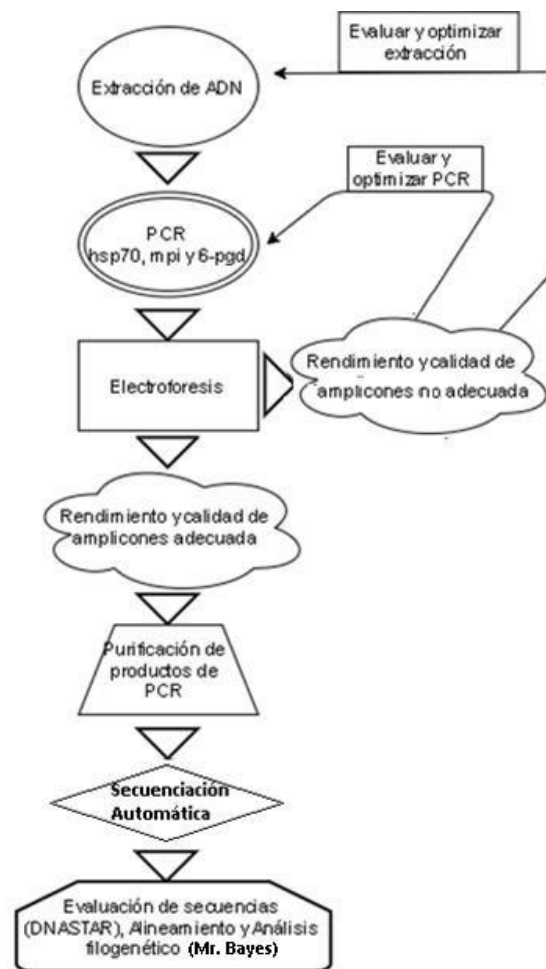


FIGURA 8. Esquema general de la metodología utilizada.

A. Toma de muestra

Las muestras utilizadas en este proyecto provinieron del laboratorio de Leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud de la UVG. Estas muestras fueron recolectadas como parte de

actividades de investigación y diagnóstico que ha realizado este laboratorio desde finales de los años 80 hasta la fecha. Todas las muestras utilizadas fueron extendidos de tejido humano en láminas, obtenidos de raspados de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea, fijadas con metanol y teñidas con Giemsa. Para el uso de estas muestras se solicitó autorización de los Comités de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Sociales y del Centro de Estudios en Salud. Dado que se obtuvieron las muestras codificadas y no se tuvo acceso a la información privada de los pacientes de los que provenían, la aprobación obtenida fue como investigación no sujeta a las regulaciones con sujetos humanos (Anexo 1).

Para la selección de las muestras se tomaron en consideración los factores siguientes: (1) cantidad de amastigotes (mayor a diez por cada 100 campos, correspondiente a una codificación de “+2”), (2) que el raspado se hubiera obtenido en el día 0, previo al tratamiento, y (3) cuando fue posible, se eligió aleatoriamente una muestra por año abarcando el período de 1989 hasta el 2016. De acuerdo a estos criterios, se seleccionaron 30 muestras. Como controles positivos se utilizó ADN de referencia de las especies *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*, proporcionados por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Colombia (Anexo 2) y como control negativo se utilizó agua grado PCR.

1. Extracción de ADN

Se evaluaron dos métodos de extracción de ADN del parásito de láminas con extendido de tejido teñidas con Giemsa. Estos se escogieron debido a sus ventajas prácticas, económicas y de rendimiento. Para cada tipo de extracción se utilizó todo el material de la lámina. El material fue raspado utilizando un bisturí que se lavó con alcohol etílico al 80% (v/v) y se secó con papel esterilizado por autoclave entre una muestra y otra.

a. Extracción de ADN con el kit comercial PureGenome™ Tissue DNA Extraction.

Se utilizó el kit “PureGenome™ Tissue DNA Extraction” (Merk, Catalogo: 72635). La muestra raspada se colocó en un tubo cónico de 1,5 ml con 100µl de agua UltraPure™ tratada con dietilpírocarbonato (DEPC-H₂O) (Thermo Fisher Scientific, Catalogo 750024). Luego se le añadió 95µl de buffer de dilución 2X con 5µl de proteinasa K y se dejó incubando por 20 minutos a 55 °C. Luego se añadió 700µl de buffer de lisis y se mezcló con un agitador vórtex.

Esta solución se transfirió a la microcolumna “IIC” en un tubo colector y se centrifugó por 1 minuto a 10 000 x g. Luego de la centrifugación se desechó el tubo colector, se colocó la microcolumna en otro tubo colector, se le añadió 200µl de buffer de pre-lavado y se centrifugó por un 1 minuto a 10 000 x g. Se desechó el tubo colector y se colocó la microcolumna en uno nuevo, se le agregó 400µl de buffer de lavado y se volvió a centrifugar a 10 000 x g por 1 minuto. Se desechó el tubo recolector y se colocó la microcolumna en un tubo de 1.5ml. Se añadió 50µl de buffer de elución a la microcolumna y se incubó por dos a cinco minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12 000 x g. El material se almacenó a -20 °C hasta el momento de utilizarlo para el PCR. No se realizó cuantificación de ADN debido a que los extendidos de tejido teñidos en Giemsa contienen un alto contenido de ADN humano y otros interferentes que son imposibles de eliminar. Se optó por amplificar por PCR directamente y evaluar la calidad de las amplificaciones mediante la presencia o ausencia de bandas en geles de agarosa al 1.5% (p/v).

b. Extracción con agua.

En esta extracción se utilizó el método desarrollado por Volpini y colaboradores (2006). El material raspado se suspendió en 25µl de DEPC-H₂O en un tubo cónico de 1.5 ml. Las muestras se calentaron a 70°C por diez minutos en un bloque térmico y luego se centrifugaron a 12 000 x g por cinco min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó en otro tubo y almacenó a -20 °C hasta su utilización.

B. PCR

Se realizó el método de PCR para amplificar las regiones de interés. Se utilizaron tres marcadores moleculares. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando la enzima Classic++™ Hot Start Taq (Tombo, Catálogo: 31-5011) con DEPC-H₂O y utilizando el termociclador MasterCycler 5331 (Eppendorf®). Se prepararon las mezclas de reacción para la amplificación de cada marcador en microtubos de 1,5 ml y se dividieron en la cantidad respectiva en tubos de reacción de 0,2 ml.

1. Marcador *hsp70*

Para el marcador *hsp70* se utilizaron los cebadores HSP70-F25 (5'-GGACGCCGGCACGATTKCT3-') y HSP70-R617 (5'-CGAAGAAGTCCGATACGAGGG-3') esperando un amplicón de 593 pares de bases (Van der Auwera *et al.*, 2014). La mezcla de reacción de PCR para el par de cebadores del marcador se describe en el Cuadro 1 y el programa de PCR se describe en el Cuadro 2.

CUADRO 1. Mezclas de reacción para el PCR del marcador *hsp70*.

<i>hsp70</i> (593pb)	Componentes	Concentración de la solución madre	Concentración final	Volumen
	DEPC-H ₂ O	n/a	aforar a 25µl	7.3µl
	Buffer de PCR	5x	1x	5µl
	MgCl ₂	25mM	2.5mM	2.5µl
	dNTPs	2.5mM	0.2mM	2µl
	Cebador sentido	20µM	0.8µM	1µl
	Cebador antisentido	20µM	0.8µM	1µl
	Buffer Q	10x	1x	5µl
	Polimerasa	5U/µl	0.5U	0.1µl
	ADN	n/a	n/a	1µl
	Volumen total			25µl

CUADRO 2. Programas de amplificación de PCR para cada set de cebadores del marcador *hsp70*

<i>hsp70</i> (593pb)	Etapa	Temperatura	Ciclos
	Desnaturalización inicial	5 min 95°C	1
	Desnaturalización	40 seg 94°C	35
	Hibridación	1 min 61°C	
	Extensión	1 min 72°C	
Extensión final	10 min 72°C	1	

2. Marcadores *mpi* y *6-gpd*

Para el marcador *mpi* se utilizaron los cebadores MPI.1082.F (5'-ACGCCCAAGTGAAGGATG -3') y MPI.1082.R (5'-ACACCACTGTACCGTTCACC-3') con un amplicón de aproximadamente 270 pares de bases. Para el marcador *6-gpd* se utilizaron

los cebadores 6GPD.1262.F (5'-CAAGGAGATGAAGGAGGGTC-3') y 6GPD.1262.R (5'-CTTGTC AACACGTTTCGTAGC-3'), esperando un amplicón de 200 pares de bases (Tsukayama *et al.*, 2013). La mezcla de la reacción de PCR de los marcadores se describe en el Cuadro 3 y el programa del termociclador en el Cuadro 4.

CUADRO 3. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los marcadores *mpi* y *6-gpd*.

	Componentes	Concentración de la solución madre	Concentración final	Volumen
<i>mpi</i> & <i>6-gpd</i>	ddH ₂ O	n/a	aforar a 25µl	13.3µLl
	Buffer	5x	1x	5µl
	MgCl ₂	25mM	1.5mM	1.5µl
	dNTPs	2.5mM	0.2mM	2µl
	Cebador sentido	20µM	0.8µM	1µl
	Cebador antisentido	20µM	0.8µM	1µl
	Polimerasa	5U/µl	1U	0.2µl
	ADN	n/a	n/a	1µl
	Volumen total			25µl

CUADRO 4. Programas de amplificación por PCR los marcadores *mpi* y *6-gpd*

	Etapa	Temperatura	Ciclos
<i>mpi</i> & <i>6-gpd</i>	Desnaturalización inicial	5 min 95°C	1
	Desnaturalización	10 seg 95°C	45
	Hibridación	20seg 6°C	
	Extensión	20 seg 72°C	
	Extensión final	5 min 72°C	1

3. Electroforesis

Los productos obtenidos del PCR fueron visualizados utilizando electroforesis en geles de agarosa 1,5% (p/v). Los geles se prepararon utilizando 0,75g de agarosa disueltos en 50 ml de Buffer Tris-Borato-EDTA 1X (TBE). Luego se calentó la solución en un microondas hasta que se disolvió completamente. Finalmente se enfrió a temperatura agradable al tacto (~40°C). Se utilizó 0.5µl de “Gel Red[®]” 1000X para visualizar los productos bajo luz UV. El gel tibio se

vertió en el molde y se colocó un peine para la formación de los pozos. Se dejó polimerizar por 20 min.

Previo a la corrida, se cargaron 0.5µl de marcadores de masa molecular de 1Kb. En cada pozo se cargó 5µl de producto de PCR mezclado con 1µl de buffer de corrida 1x. Se corrió con un voltaje de 100V por 30 min. Una vez terminada la corrida, se visualizaron las bandas en un transiluminador UVP de luz UV (302 nm). Las fotografías de los geles fueron editadas utilizando el programa GelAnalyzer 2010^a.

C. Purificación productos PCR y secuenciación

Una vez confirmada la presencia de producto de amplificación por el gel de agarosa se procedió a su purificación. Se utilizó el Kit de Novagen® SpinPrep™ PCR Clean-up Kit (Merck: No. Catalogo 70976) de acuerdo a la metodología propuesta por el fabricante. Previo a iniciar, se precalentaron 50µl por muestra de buffer de elución (SpinPrep Elution Buffer) a 70°C.

Se agregaron cuatro volúmenes de buffer de acoplamiento (SpinPrep Binding Buffer) a los productos del PCR. Esta mezcla se colocó en una micro columna “SpinPrep PCR Filter” en un tubo colector de 2ml y se centrifugó a 10 000 x g por un minuto. Una vez terminado se descartó el contenido del tubo recolector y se agregó al micro columna 400µl de buffer de acoplamiento, se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Se descartó el contenido del tubo recolector y se agregó a la micro columna 500µl de buffer de lavado (SpinPrep Wash Buffer). Se centrifugó con las mismas condiciones. Se descartó el contenido del tubo colector y se volvió a centrifugar esta vez por dos minutos a 10 000 x g. Una vez terminado se transfirió la micro columna a un tubo de 1.5ml y se le agregaron 50µl del buffer de elución precalentado. Se dejó incubar por cinco minutos. Finalmente se centrifugó a 12 000 x g y se descartó la micro columna.

El producto se guardó a -20 °C hasta su envío a secuenciar. La secuenciación se realizó utilizando el servicio de secuenciación automática de la empresa Macrogen® (Corea del Sur), obteniéndose las secuencias sentido y contrasentido para cada muestra y gen evaluado.

D. Análisis de datos

1. Análisis filogenético

Se generaron y editaron las secuencias consenso de cada muestra utilizando el programa DNASTAR y se utilizaron únicamente los consensos con más del 85% de residuos, en relación con el tamaño esperado de cada marcador (*hsp70* 593 bp, *mpi* 270 pb y *6-gpd* 200 pb) . Según las secuencias consenso obtenidas, se identificaron todas las muestras mediante un análisis de homología, utilizando la herramienta BLAST.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando ClustalW con el algoritmo ClustalW 1.6 y optimizada con el algoritmo Muscle, utilizando el paquete MEGA7 (Tamura *et al.*, 2011). Se utilizó secuencias de *Tripanosoma cruzi*, *Endotrypanum* y *Leptomonas* como grupo externo. Como controles se utilizaron secuencias de la base de datos del “GeneBank”. Los controles utilizados son los siguientes: tres cepas de *L. braziliensis*, una de *L. guyanensis*, tres cepas *L. infantum*, una de *L. major*, dos cepas de *L. mexicana*, dos cepas de *L. panamensis*, una de *L. naiffi* y una de *L. liansoni* (Anexo 3).

Para elaborar el árbol filogenético se utilizó el algoritmo estadístico “Maximum likelihood” utilizando inferencia bayesiana con ayuda del programa MrBayes v.3.2, utilizando 1 000 000 generaciones. Se determinó el modelo de sustitución de nucleótidos utilizando jModelTest v.2.1, el cual evalúa el mejor modelo evolutivo de 88 modelos para las alineación de secuencias a evaluar (Posada 2008; Darriba *et al.*, 2012). El mejor modelo se evaluó automáticamente en el programa con el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés) para definir el modelo más adecuado según las características de los datos.

Estos modelos evolutivos permiten calcular la probabilidad de la topografía de los individuos dentro de los árboles filogenéticos. Estos modelos poseen diferentes tasas de sustitución de bases (Citosina, Adenosina, Guanidina y Tirosina (C, A, G, T)), frecuencia de bases, proporción de sitios invariables (+I) y tasa de variación entre bases (+G). Se utilizaron en este estudio el modelo dos transicional (TIM2; AC = AT, CG = GT, AG = CT), el modelo de Hasegawa (HKY; AC = AT = CG = GT, AG = CT) y el modelo del parámetro 3 (TPM1; AC = GT, AT = CG, AG = CT) (Posada, 2008).

Se realizaron cuatro árboles, uno por cada marcador (*hsp70*, *mpi*, *6-gpd*) y uno concatenando las secuencias de los tres pares de marcadores, para cada muestra. El valor de significancia que se usó en este estudio fue de 90%.

III. Resultados

A. Características de las muestras

Las muestras utilizadas provinieron de personas con infecciones activas de leishmaniasis cutánea con un rango de edad de seis a 62 años (promedio 26), el 86.7% mayores de 12 años. Los individuos de donde provinieron las muestras fueron mayoritariamente de sexo masculino (90%). Las concentraciones de amastigotes de las muestras utilizadas variaron entre +2 y +4, lo que equivale a 10-200 amastigotes por cada 100 campos. Se tiene un mínimo de una muestra por año del período de 1989 a 2016, exceptuando los años 1991, 1994, 1996, 2007 y 2012. En cuanto a la ubicación geográfica el 73% de las muestras provienen del departamento del Petén y 13% de los departamentos de Izabal, Alta Verapaz y Guatemala. Solo una muestra no poseía información de procedencia. Los detalles de las características de las muestras utilizadas se incluyen en el Anexo 4.

1. Extracción de ADN

Ambos métodos de extracción (Volpini y kit comercial) utilizados fueron exitosos para extraer el ADN del parásito de láminas de raspados de lesiones ocasionadas por *Leishmania*. Con el método de Volpini se obtuvo productos de amplificación de PCR que presentaron barridos e impurezas al separarse en geles de agarosa al 1.5% (p/v) (muestra Volpini en Figura 9). Con el método de extracción del kit comercial PureGenome™ Tissue DNA Extraction se obtuvieron bandas más íntegras y sin impurezas (muestra kit de la Figura 9). Utilizando ambos métodos combinados se observa un aumento en el rendimiento de la extracción de ADN, tanto como en la re-extracción del precipitado obtenido como subproducto del método de Volpini (Metodología sección A.1.1).

El método que se utilizó para la extracción de ADN en las muestras fue con kit debido a la mejor resolución de las bandas amplificadas por PCR. Con este método se logró la amplificación por PCR de al menos un marcador en todas las muestras.



FIGURA 9. Comparación de la calidad del ADN extraído utilizando diferentes métodos de extracción, mediante la resolución de las bandas de amplificación del PCR del marcador *hsp70* (593pb) separadas en un gel de agarosa al 1,5%.

B. PCR

1. Marcador *hsp70*

El 93% (28/30) de las muestras amplificaron exitosamente para el fragmento de 593 pb del gen *hsp70*. Se realizaron dos corridas de PCR. La primera corrida con las condiciones descritas en la sección B.1., con lo que se obtuvo la amplificación de 22 muestras, que equivale al 73% (Figura 10). En algunas de las muestras se pudo observar bandas de amplificación anchas y con poca resolución como las muestras 22 y 29 (Figura 10). En la segunda corrida de PCR, utilizando muestras que no amplificaron en la corrida anterior, se utilizó doble volumen de templado, con lo cual se obtuvo un 20% más de amplificación (primera fila, Figura 13). Dado que las bandas obtenidas para el gen de interés se mostraron ensanchadas y con poca resolución,

se cambiaron las condiciones de corrida utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, en lugar de Tris-Borato-EDTA, con lo que se obtuvo bandas más definidas (Anexo 5).

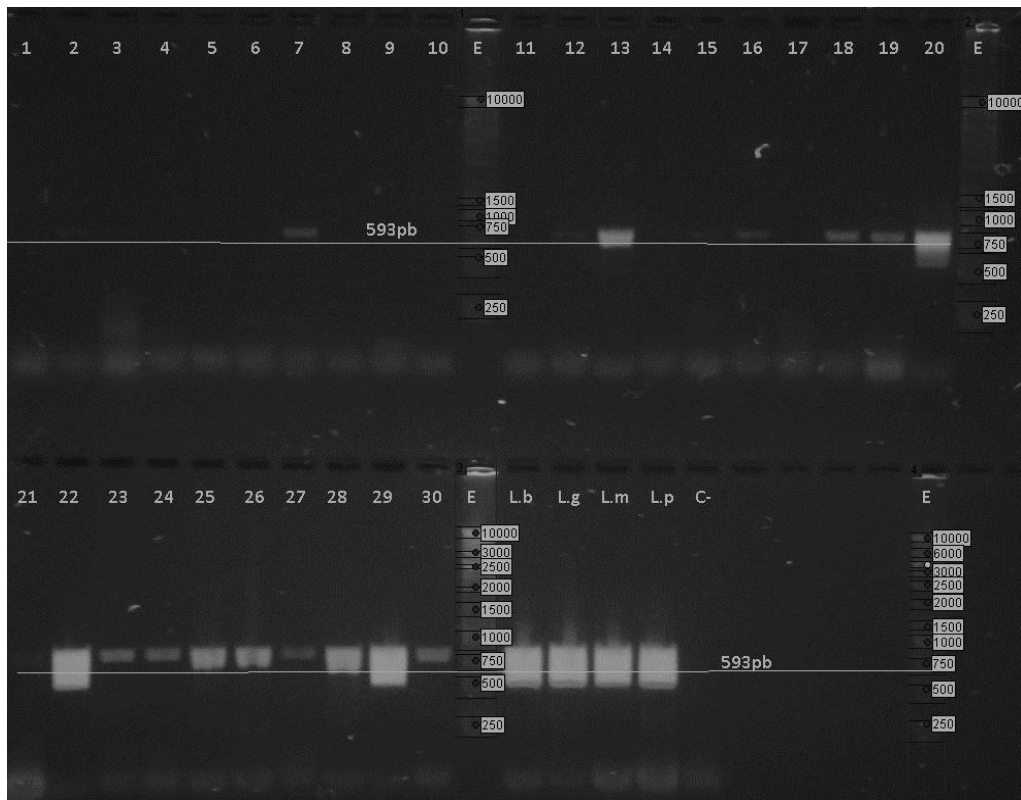


FIGURA 10. Productos de amplificación del marcador *hsp70* (593pb) separados en un gel de agarosa 1.5% (p/v). (E): Marcadores de masa molecular de 1Kb; (1-30) muestras utilizadas; controles positivos (L.b: *L. braziliensis*, L.g: *L. guyanensis*, L.m: *L. mexicana* y L.p: *L. panamensis*); (C-) control negativo.

2. Marcador *mpi*

El marcador *mpi* resultó ser exitoso con un alto rendimiento de amplificación. Se obtuvo un 93% de amplificación positiva en la primera corrida, con bandas claramente definidas. El control negativo presentó una banda de amplificación (Ver Figura 11, (C-)) por lo que se realizó una corrida adicional para comprobar si hubo contaminación cruzada al momento de cargar en gel o en la elaboración del master mix. Se determinó que la banda en el control negativo fue un falso positivo debido a contaminación entre pozos en el momento de cargar el gel (Ver Anexo 6). Sin embargo, en todas las muestras se observó una banda difusa en el frente de migración, de

menor masa que el amplicón esperado. El control positivo de *L. mexicana* muestra una banda de menor intensidad (Figura 11).

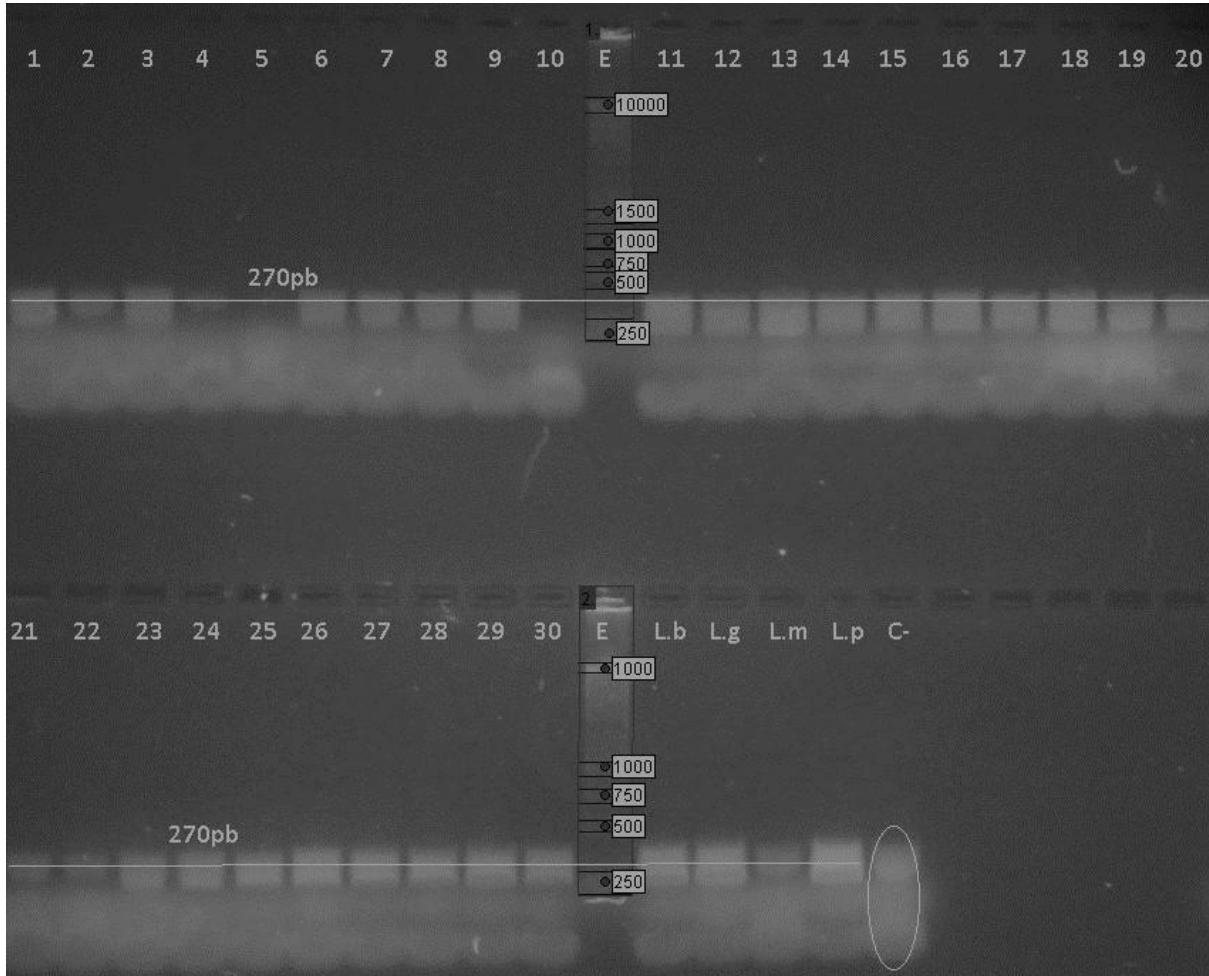


FIGURA 11. Productos de amplificación del marcador *mpi* separados en un gel de agarosa 1.5% (p/v). (E): Marcadores de masa molecular de 1Kb; (1-30) muestras utilizadas; (L.b: *L. braziliensis*, L.g: *L. guyanensis*, L.m: *L. mexicana* y L.p: *L. panamensis*) controles positivos; (C-) control negativo.

3. Marcador *6-gpd*

Este marcador tuvo un bajo rendimiento de amplificación (80% que equivale a 24 muestras) comparado con los marcadores *hsp70* y *mpi*. Con este gen se obtuvo baja resolución de las bandas de amplificación como se observa en las muestras 3 y 27 de la Figura 12. Además se

obtuvo amplificación de productos no específicos en las muestras 19 y 24. Para este gen se realizaron también dos amplificaciones. Con la primera, utilizando las condiciones descritas en la sección B.2., solo el 53% de las muestras amplificaron satisfactoriamente. Con la segunda amplificación, utilizando muestras no amplificadas anteriormente, se utilizó el doble de templado de ADN (2 μ l). Como resultado, amplificó el restante 27% de las muestras (segunda fila de pozos en Figura 13). En este gel se observaron también productos inespecíficos como las muestras 11, 16 y 25.

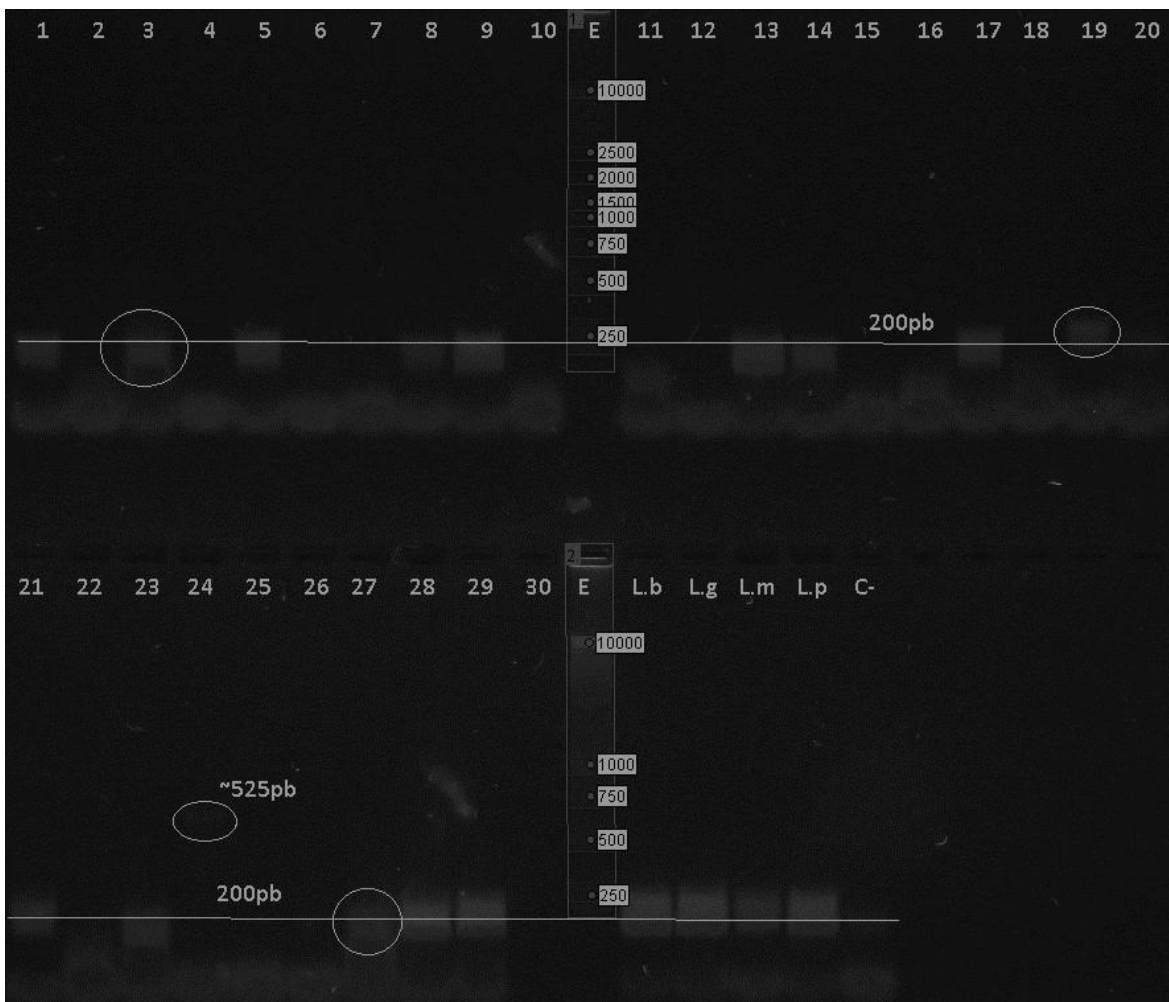


FIGURA 12. Productos de amplificación del marcador *6-gpd* separados en un gel de agarosa 1.5% (p/v). (E): Marcadores de masa molecular de 1Kb; (1-30) muestras utilizadas; controles positivos (L.b: *L. braziliensis*, L.g: *L. guyanensis*, L.m: *L. mexicana* y L.p: *L. panamensis*); (C-) control negativo.

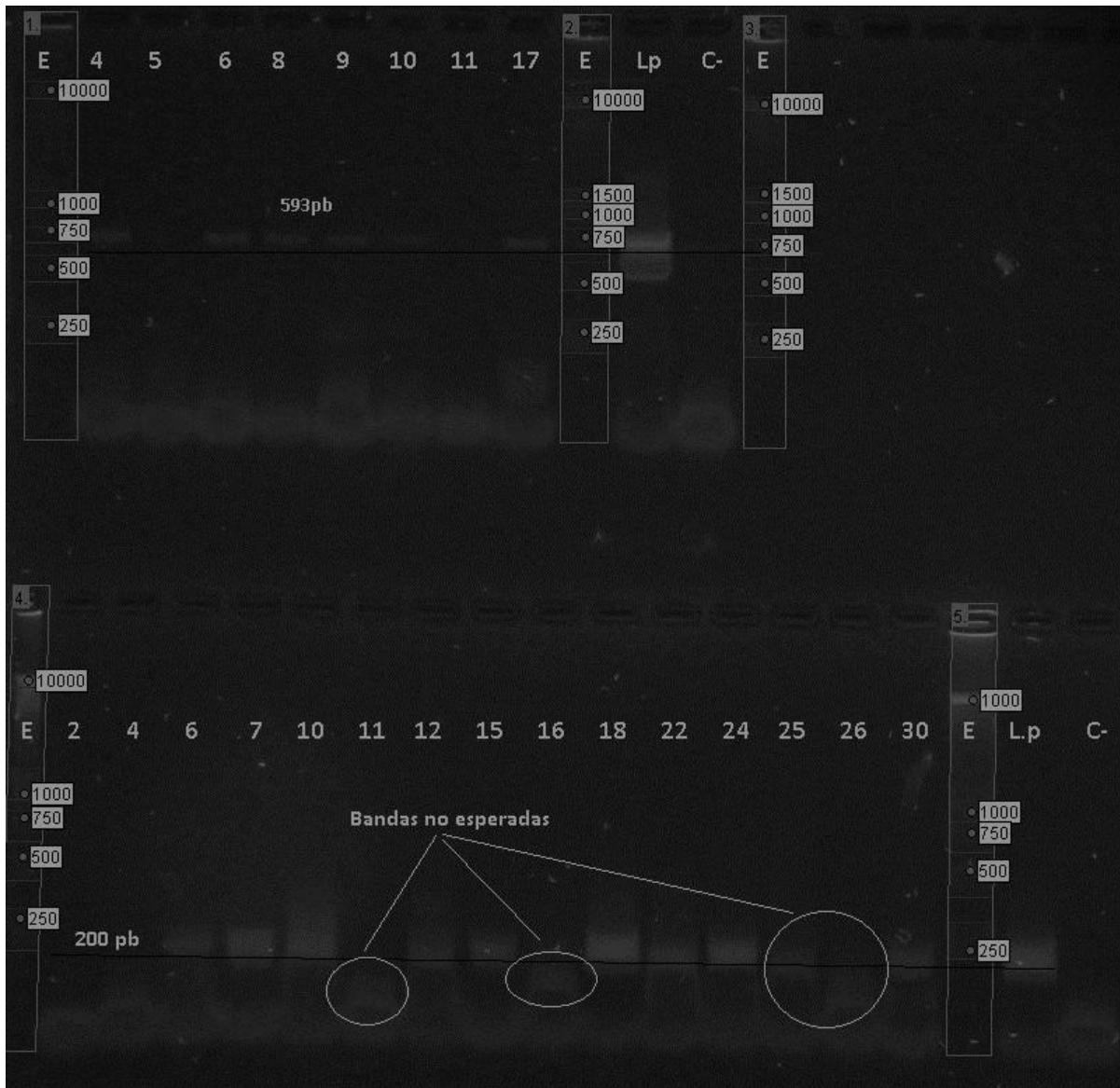


FIGURA 13. Re-amplificación de los marcadores *hsp70* (563pb, fila superior) y *6-gpd* (200pb, fila inferior) en muestras negativas utilizando mayor volumen de templado de ADN (2 μ l) y separados en un gel de agarosa 1.5% (p/v). (E): Marcadores de masa molecular de 1Kb; (2-30) muestras; (L.p) control positivo de *L. panamensis*; (C-) control negativo.

C. Identificación y análisis filogenético

1. Identificación de secuencias por análisis de homología (BLAST)

De las 80 amplificaciones obtenidas para las 30 muestras con los tres genes (Cuadro 5), se obtuvo secuencias exitosas para 68 muestras (85%) (ver ejemplo en Anexo 7), tanto para las secuencias sentido como contrasentido. Para cada una de estas muestras se obtuvo la secuencia consenso respectiva combinando los resultados obtenidos para las secuencias sentido y contrasentido. No se pudo obtener secuencias consenso para las muestras que no contaban con secuencias sentido o contrasentido, por lo que no se utilizaron en el análisis filogenético. En total, para el marcador *hsp70* se secuenció el 86% de las muestras amplificadas, para el marcador *mpi* se secuenció el 100% de las muestras amplificadas y para el marcador *6-gpd* un 66% de las muestras amplificadas. El marcador *6-gpd* resultó difícil de secuenciar, con presencia de señales mixtas según el reporte de la casa comercial Macrogen, evidenciado en los electroferogramas generados por dicha empresa (ver ejemplo en Anexo 8).

Los resultados del análisis de homología utilizando la herramienta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) sugieren que el 52% de las muestras identificadas como *Leishmania* pertenecen al Complejo *L. mexicana* para el marcador *hsp70*. Sin embargo, se encontró una secuencia homóloga a *Trichoderma* sp. (porcentaje de identidad de 87% con 507 nucleótidos evaluados). Además, se encontró homología inusual de dos muestras con *L. major* (porcentaje de identidad del 99% con 514 nucleótidos evaluados). La muestra GE-0765 presentó una secuencia consenso de baja calidad por lo que no fue utilizada en el análisis filogenético. Para el marcador *mpi* se reportó un 100% muestras con secuencias homólogas a *L. braziliensis*. En cuanto al marcador *6-gpd* un 61% de las muestras fueron homólogas a secuencias reportadas para *L. peruviana*, que es considerada como una subespecie de *L. braziliensis*. Como resultado excepcional se encontró una secuencia homóloga a material genético humano con un porcentaje de identidad del 91% con 192 nucleótidos evaluados (Muestra GE-2019). El resumen de los resultados se presenta en el Cuadro 5.

CUADRO 5. Resultados de identificación, amplificación y secuenciación de las muestras seleccionadas.

#	Código de la muestra	<i>hsp70</i>		<i>mpi</i>		<i>6-gpd</i>	
		Amplicón positivo	Homología según BLAST	Amplicón positivo	Homología según BLAST	Amplicón positivo	Homología según BLAST
1	GE-0042	X	<i>L.ma</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
2	GE-0232	X	<i>L.ma</i>	X	<i>L.br</i>		
3	GE-0256	X		X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
4	GE-0321	X		X	<i>L.br</i>		
5	GE-0493					X	<i>L.guy</i>
6	GE-0494	X		X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pan</i>
7	GE-0547	X		X	<i>L.br</i>	X	<i>L.guy</i>
8	GE-0637	X	<i>L.pan</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
9	GE-0765	X	<i>Trich. sp.</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
10	GE-0792	X	<i>L.br</i>			X	<i>L.pv (br)</i>
11	GE-1119			X	<i>L.br</i>		
12	GE-1308	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	
13	GE-1485	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
14	GE-1488	X		X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
15	GE-1761	X		X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
16	GE-1800	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.br</i>		
17	GE-1893	X	<i>L.pan</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
18	GE-1905	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
19	GE-1952	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	
20	GE-2019	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>H. sapiens</i>
21	GE-2107	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	
22	GE-2156	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pan</i>
23	GE-2285	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	
24	GE-2484	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pan</i>
25	GE-2591	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>		
26	GE-2610	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>		
27	GE-2617	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	
28	GE-2631	X	<i>L.mx</i>	X	<i>L.br</i>	X	
29	GE-2639	X	<i>L.nf</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>
30	GE-2708	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.br</i>	X	<i>L.pv (br)</i>

Nota: “x”: representa muestras para las que se obtuvo un amplicón; las casillas resaltadas en gris representan secuenciaciones utilizables; casillas resaltadas en café presentan secuencias consenso de baja calidad; casillas en blanco son muestras que no se secuenciaron; **L.guy**: *Leishmania guyanensis*; **L.mx**: *Leishmania mexicana*; **L.ma**: *Leishmania major*, **L.pv**: *Leishmania peruviana*, **L.br**: *Leishmania braziliensis*, **L.pan**: *Leishmania panamensis*, **L.nf**: *Leishmania naiffi* y **Trych**: *Trichoderma sp.*

2. Análisis filogenético

a. Árbol filogenético generado con el marcador *hsp70*

Para la elaboración del árbol se utilizó el modelo de sustitución TIM2+G. Los resultados de este árbol hacen concordancia con la identificación por homología de secuencias de BLAST. Este árbol sostiene la inclusión del género *Leishmania* como clado monofilético y como taxón hermano a *Endotrypanum* (ver Figura.14).

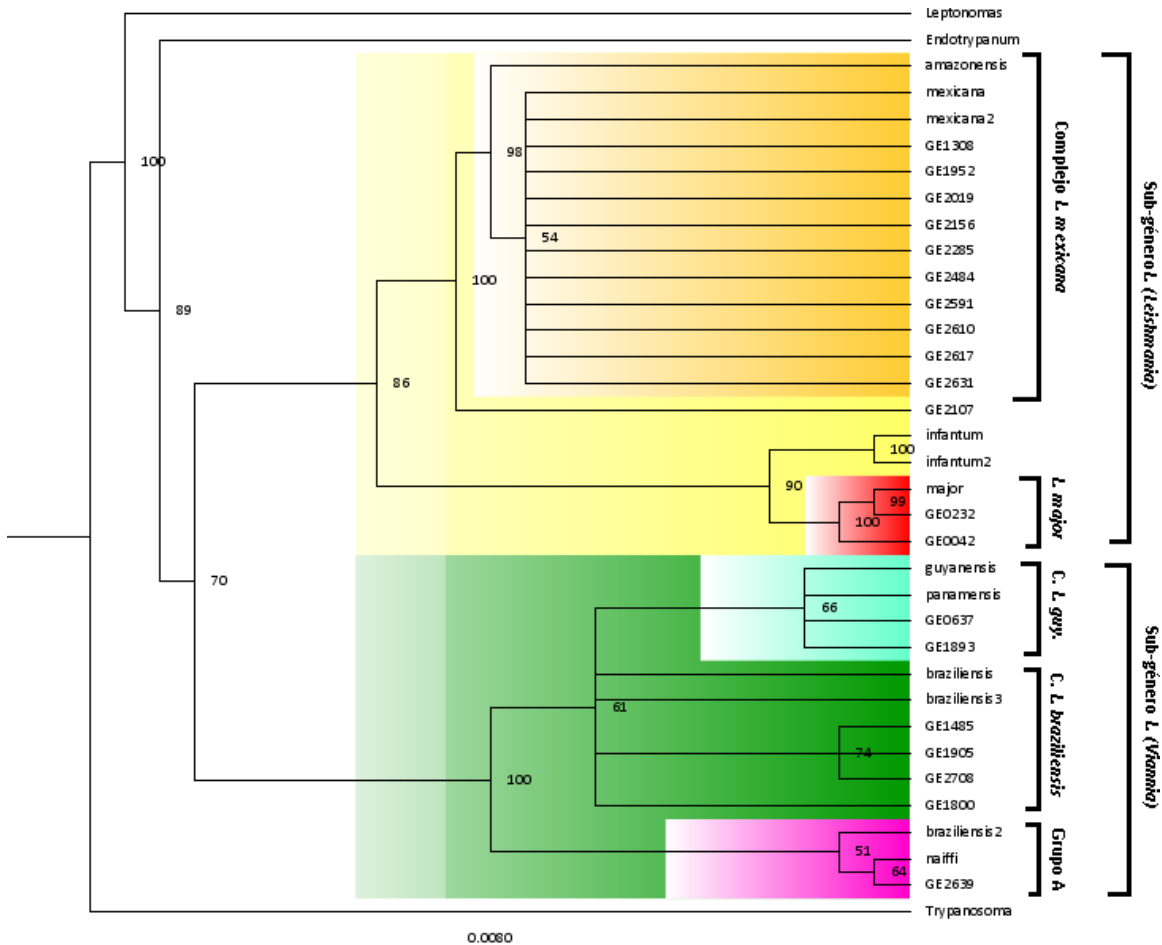


FIGURA 14. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen *hsp70* utilizando el método “máximo likelihood” con inferencia bayesiana de acuerdo al modelo TIM2+G. C: complejo; *L.*: *Leishmania*; *guy.*: *guyanensis*

El árbol sugiere una división en dos grupos monofiléticos entre sub-género *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*. Dentro de *L. (Leishmania)* es posible definir entre las especies del Viejo y del

Nuevo mundo. Tal como se identificó por BLAST, existen dos muestras que se encuentran fuertemente relacionadas con *L. major*, principalmente la muestra GE-0232. El grupo de *L. mexicana* presenta una gran cantidad de individuos similares entre sí. La muestra GE-2107, previamente identificada como *L. mexicana* por homología, se encuentra ubicada como clado hermano del complejo *L. mexicana*, sugiriendo ser una cepa diferente de la especie. En cuanto a *L. braziliensis* se identifican cuatro muestras como dicha especie. El árbol sugiere que estas muestras constan de dos cepas diferentes. La muestra GE-2639 se encuentra anidada fuertemente a *L. naiffi* y a un control de *L. braziliensis* diferente a las demás cepas, este grupo está representado como “Grupo A” dentro del árbol. Para el complejo *L. guyanensis* las cuatro muestras parecen ser similares entre *L. guyanensis* y *L. panamensis*, pero es poco sustentado (P = 66%).

b. Árbol filogenético generado con el marcador *mpi*

El modelo que se utilizó en este árbol fue TPM1uf+I. Los resultados en este árbol no tienen conflicto con las identificaciones por homología de secuencias de BLAST, ni refuerzan los resultados de este. Este árbol no apoya una relación monofilética del género *Leishmania* y contiene como subgrupos a los géneros *Endotrypanum* y *Leptomonas*. Aun así, presenta a *L. (Viannia)* como un grupo monofilético separándolo en tres grupos distinguibles: el complejo *L. guyanensis* (III), un grupo de 17 muestras (IV) y un grupo pequeño de tres muestras (V) (Ver Figura.15). Para el sub-género *L. (Leishmania)* no parece haber conflicto para separar entre especies (I e II), sin embargo, ninguna muestra utilizada es similar a este grupo. Adicionalmente la región utilizada de este marcador parece no poder distinguir entre *Endotrypanum* y *Leptomonas*.

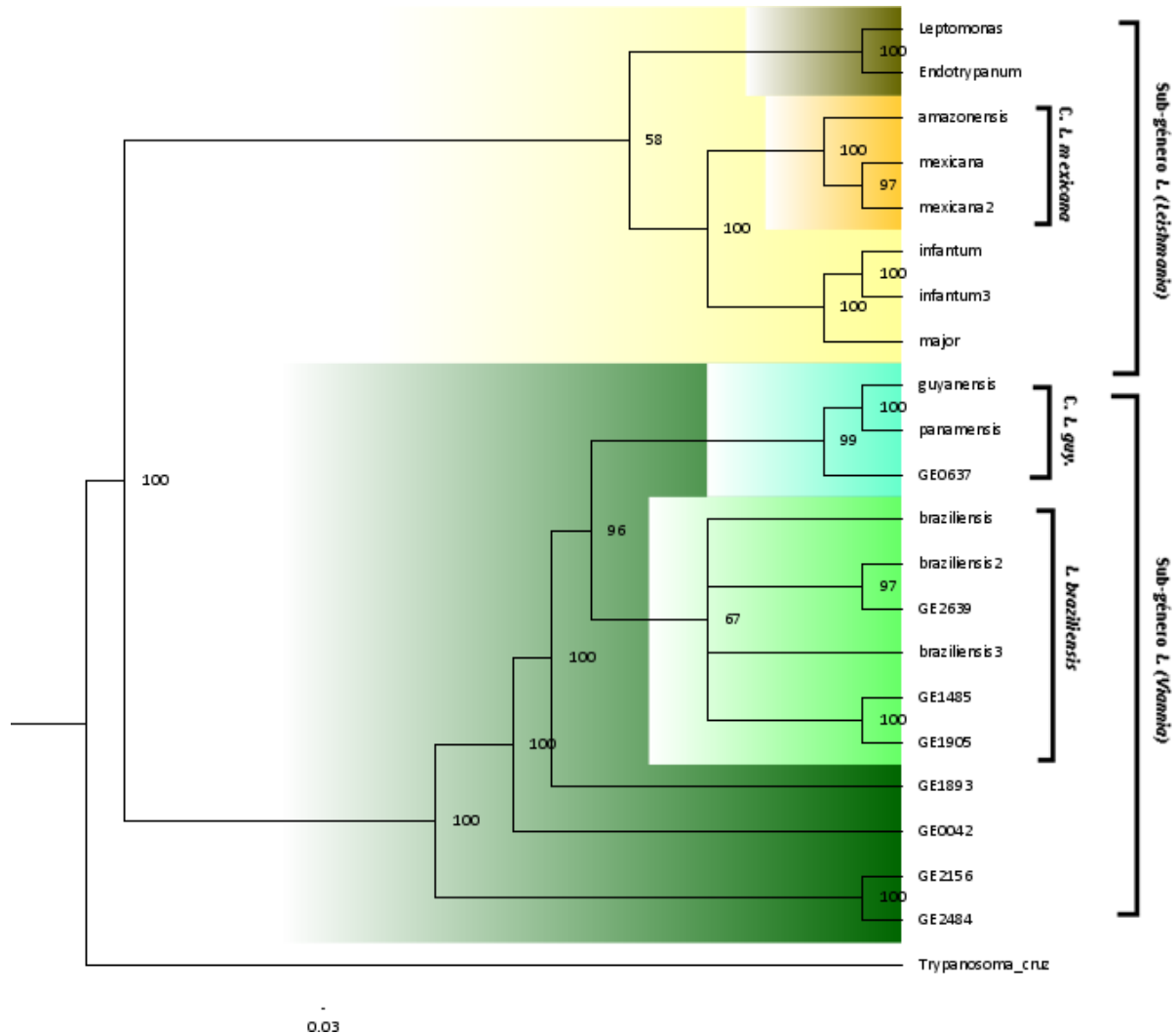


FIGURA 17. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias concatenadas de los genes *hsp70*, *mpi*, *6-gpd* utilizando el método “máximo likelihood” con inferencia bayesiana de acuerdo al modelo TIM2+G. **C:** complejo; **guy:** *guyanensis*.

Este árbol presenta a *Endotrypanum* y *Leptomonas* como parte de *Leishmania*, sin embargo, este presenta una probabilidad de 58% por lo que no es confiable. Nuevamente se generan las divisiones entre sub-géneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*. Dentro de *L. (Leishmania)* no presenta mayor detalle en complejos de especies y los controles de este grupo se organizan en la topografía adecuada. En el sub-género *L. (Viannia)* se observan dos clados sólidamente definidos que representan el complejo *L. guyanensis* y *L. braziliensis*. Dentro del complejo *L. guyanensis* se encuentra la muestra GE-0637 dentro de una rama diferente de las secuencia de referencia de *L. guyanensis* y *L. panamensis*, evidenciando un linaje diferente de las

muestras de referencia del GeneBank. En cuanto al grupo con controles *L. braziliensis*, se evidencian cuatro clados, dos de ellos son secuencias de referencia individuales, un grupo de una secuencia control y una muestra; y un grupo de muestras. Esto sugiere una alta diversidad en *L. braziliensis*. Existe un grupo de muestras que no se encuentran anidadas en ningún grupo (GE-1893, GE-0042, GE-2156 y GE-2484). Este análisis no permitió asignar estas muestras a ninguno de los grupos de especies y tampoco se observó concordancia con los resultados de los árboles individuales de cada marcador ni con la homología de secuencias realizada con BLAST. También se realizaron árboles filogenéticos exploratorios con las concatenaciones de *hsp70-mpi* y *hsp70-6-gpd*, sin embargo, estos fueron aún más inconsistentes.

Debido a la inconsistencia de resultados entre marcadores, solamente se toman como válidos los resultados del marcador *hsp70* debido a su respaldo bibliográfico de su poder taxonómico y secuencia con mayor número de nucleótidos, por lo tanto, más informativa. Los resultados se muestran en el Cuadro 6 donde se observa un 19% de las muestras identificadas como *L. braziliensis* y un 52% de las muestras identificadas como *L. mexicana*.

CUADRO 6. Identificación de las muestras utilizadas por inferencia del análisis filogenético.

#	Código de la muestra	Homología según BLAST <i>hsp70</i>	Homología según BLAST <i>6-gpd</i>	Identificación final
1	GE-0042	<i>L.ma</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.ma</i>
2	GE-0232	<i>L.ma</i>		<i>L.ma</i>
3	GE-0256			
4	GE-0321			
5	GE-0493		<i>L.guy</i>	<i>L.guy</i>
6	GE-0494		<i>L.pan</i>	<i>L.pan</i>
7	GE-0547		<i>L.guy</i>	<i>L.guy</i>
8	GE-0637	<i>L.pan</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.pan</i>
9	GE-0765		<i>L.pv (b)</i>	<i>L.pv (b)</i>
10	GE-0792		<i>L.pv (b)</i>	<i>L.pv (b)</i>
11	GE-1119			
12	GE-1308	<i>L.mx</i>		<i>L.mx</i>
13	GE-1485	<i>L.br</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.br</i>
14	GE-1488		<i>L.pan</i>	<i>L.pan</i>
15	GE-1761		<i>L.pv (b)</i>	<i>L.pv (b)</i>
16	GE-1800	<i>L.br</i>		<i>L.br</i>
17	GE-1893	<i>L.pan</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.pan</i>
18	GE-1905	<i>L.br</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.br</i>
19	GE-1952	<i>L.mx</i>		<i>L.mx</i>
20	GE-2019	<i>L.mx</i>		<i>L.mx</i>

#	Código de la muestra	Homología según BLAST <i>hsp70</i>	Homología según BLAST <i>6-gpd</i>	Identificación final
21	GE-2107	<i>L. ama (mx)</i>		<i>L. ama (mx)</i>
22	GE-2156	<i>L. mx</i>	<i>L.pan</i>	<i>L. mx</i>
23	GE-2285	<i>L. mx</i>		<i>L. mx</i>
24	GE-2484	<i>L. mx</i>	<i>L.pan</i>	<i>L. mx</i>
25	GE-2591	<i>L. mx</i>		<i>L. mx</i>
26	GE-2610	<i>L. mx</i>		<i>L. mx</i>
27	GE-2617	<i>L. mx</i>		<i>L. mx</i>
28	GE-2631	<i>L. mx</i>		<i>L. mx</i>
29	GE-2639	<i>L.n</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.n? (L.br)</i>
30	GE-2708	<i>L.br</i>	<i>L.pv (b)</i>	<i>L.br</i>

Notas: L.br: *L. braziliensis*; L.m: *L. major*; L.mx: *L. mexicana*; L.pan: *L. panamensis*; L.n: *L. naiffi*; L.guy: *L. guyanensis*; L.pv(b): *L. peruviana (braziliensis)* y L.ama(mx): *L. amazonensis (mexicana)*. Resultados en negritas representan datos generados por *6-gpd*, no poseen respaldo taxonómico con el gen de *hsp70*, que de acuerdo a este estudio, es el más concluyente.

IV. Discusión

A. Factibilidad de extracción y calidad de ADN en muestras de raspados de lesiones de leishmaniasis cutánea teñidas con Giemsa

En muchos laboratorios del mundo donde se estudia y diagnostica leishmaniasis tienen como estándar la evaluación por microscopía de casos sospechosos de leishmaniasis utilizando raspados de las lesiones ulcerosas teñidas con Giemsa (Aronson *et al.*, 2016). Debido a estas prácticas, se elaboran placas de raspado que se almacenan como referencias futuras y que poseen un alto valor en la investigación post-diagnóstico. La extracción de ADN proveniente de este material presenta varios obstáculos. El principal obstáculo es la contaminación con ADN humano y microorganismos como bacterias y hongos que podrían estar co-infectando la lesión; según estudios recientes en Brasil, la frecuencia de infecciones secundarias en lesiones de *Leishmania* es de 23.6-81% (Antonio *et al.*, 2017). Ante la posibilidad de infecciones secundarias y/o material genético humano en las lesiones, no se realizó la cuantificación de ADN, optando por evaluar cualitativamente la presencia de ADN del parásito por medio de la presencia de bandas de amplificación de PCR. La herramienta semi-cuantitativa más recomendada para estimar la concentración de ADN son las escaleras de masa molecular diseñadas con diferentes concentraciones conocidas para inferir la concentración de las bandas en el gel de agarosa, las cuales pueden analizarse utilizando software de procesamiento de imágenes. Este recurso no se encontraba disponible para la elaboración de este estudio.

Ambas metodologías de extracción proporcionaron amplificaciones exitosas del ADN de láminas teñidas con Giemsa. El método de extracción en agua o método de Volpini, es de bajo costo y fácil de realizar, pero las bandas obtenidas presentan barridos luego de las amplificaciones por PCR que sugiere cierto grado de degradación del ADN y/o contaminantes provenientes del tejido. A pesar de esto, la banda de amplificación es lo suficientemente íntegra para ser utilizada en metodologías posteriores como RFLPs o secuenciación, aunque impactando en la sensibilidad de los mismos. Es por esto que para aplicar estos métodos se recomienda el uso de kits de purificación (Rohit *et al.*, 2016), para poder detectar algunas bandas difusas que fácilmente se pierden por cualquier contaminación de ADN o ARN. En caso no se cuente con los recursos para utilizar estos kits de extracción, pueden realizarse extracciones orgánicas o bien precipitando el ADN con acetato de sodio, centrifugación, evaporación y resuspensión.

La extracción mediante el kit “PureGenome™ Tissue DNA Extraction”, tal como se espera de un producto comercial, proporciona material genético óptimo y sin contaminantes. Sin embargo, este método requiere recursos económicos altos para obtener los kits. Debido a la disponibilidad del kit se utilizó esta metodología a lo largo de todo el estudio.

Aunque el método de extracción fue el óptimo, aún existieron problemas a lo largo de la metodología. Según comentarios de la empresa que realizó la secuenciación automática, muchas de las muestras poseían señales mixtas, principalmente para los productos de amplificación del marcador *6-gpd*, que resultó con una baja tasa de éxito. Los resultados no parecen tener ninguna correlación a la cantidad de amastigotes reportados en las placas, indicando que la presencia de ADN no parece un factor determinante. Algunas muestras poseían muy baja calidad de secuencia o secuencias consenso con menos del 85% del tamaño esperado para el gen, razones por las que no fueron incluidas en el análisis. El fenómeno podría ser el resultado de los siguientes factores: (1) presencia de regiones de baja complejidad en la secuencia, (2) presencia de contaminantes en la muestra que afectaran el desempeño de las enzimas durante la reacción de secuenciación, o (3) infecciones múltiples por más de una especie de *Leishmania* que pudieran ocasionar señales dobles.

Indudablemente el tejido humano está presente en las placas de raspado de la lesión, el cual pudo haber aportado contaminantes que afecten el desempeño de las enzimas, interviniendo en la calidad de la amplificación y secuenciación. Hay que considerar que los cebadores de los marcadores *6-gp* y *mpi* fueron diseñados originalmente para la segunda reacción en un **Q-PCR anidado** (Tsukayama *et al.*, 2013). Es posible que con las condiciones particulares de este estudio existiera hibridación no específica que ocasionó la amplificación de múltiples fragmentos simultáneamente y comprometió la calidad de las secuenciaciones. Es importante mencionar que ninguna fuente consultada reporta explícitamente la secuenciación de fragmentos de ADN utilizando como punto de partida el material obtenido de las placas de raspado de lesión.

El segundo factor (infecciones múltiples de *Leishmania*) se ha reportado ampliamente en la literatura (Shirian *et al.*, 2012; Adui *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2015) y podría explicar las señales mixtas en las secuencias o la inconsistencia entre los marcadores. Sin embargo, para confirmar si este fue el caso, se necesitaría clonar los productos de PCR y analizar la mayor cantidad de clones posibles.

Para evitar este tipo de problemas se recomienda utilizar una fuente de material génico de alta calidad y pureza, utilizando métodos de amplificación más sensibles como PCR anidado o marcadores más específicos, como el minicírculo de ADN del kinetoplasto (Bhattacharyya *et al.*, 1996), reconocido como el estándar de oro para detección molecular del parásito (Kobets *et al.*, 2012). En caso se hubiera realizado un cultivo *in vitro*, la calidad del ADN obtenido definitivamente hubiera mejorado, pero el costo-beneficio de este método se ve comprometido por los requisitos de experiencia, alto costo e inversión de tiempo (Kobets *et al.*, 2012) requerido para el cultivo de los parásitos de *Leishmania*. Aunque las placas de raspado no constituyen un material óptimo para la amplificación y secuenciación, se podría mejorar los resultados si se realiza una purificación del ADN extraído, previo a realizar el PCR y purificar los productos obtenidos antes de la secuenciación. Si bien las láminas teñidas con Giemsa, poseen algunos contaminantes son el tipo de muestras con más disponibilidad dado que la microscopía es el método de diagnóstico rutinario de los servicios de salud en Guatemala.

B. Utilidad taxonómica de los marcadores *mpi* y *6-gpd*

Los marcadores utilizados fueron diseñados específicamente para diferenciar un polimorfismo de nucleótido único dentro de estos genes conservados utilizando Q-PCR en regiones de Suramérica. Según Tsukayama y colaboradores (2013) estos marcadores son lo suficientemente conservados para poder identificar especies del nuevo mundo a lo largo de la cuenca amazónica, la costa peruana y regiones de alta elevación. Según los autores, estos genes en un PCR anidado son específicos de especies de *Leishmania* del nuevo mundo y no presentan amplificaciones de material genético humano o de *Trypanosoma cruzi*; sin embargo, nunca mencionan la especificidad de los sets de cebadores de los fragmentos internos sin un PCR anidado. Importante resaltar lo anterior para el marcador *6-gpd*.

1. Marcador *mpi*

Los resultados con el marcador *mpi* identificaron consistentemente a los parásitos responsables de las infecciones como *L. braziliensis* por el análisis de homología de BLAST. Los autores utilizan este gen para hacer distinción entre *L. braziliensis*, *L. peruana* y *L. mexicana* (Tsukayama *et al.*, 2013). Es interesante observar que el marcador evidencia tener la

información adecuada para identificar especies del complejo de *L. guyanensis* obtenidas de las secuencias de referencia, lo cual no se indica en la metodología de Tsukayama y colaboradores (2013). Sin embargo, todas las muestras evaluadas en este estudio no dan ningún indicio taxonómico concreto y solo separa las muestras en clados, pero sin ningún detalle taxonómico aparente. Adicionalmente, los resultados de BLAST por este marcador son cuestionables debido a que todas las muestras fueron identificadas como *L. braziliensis* y *L. peruviana* (subespecies). Esto puede ser resultado de que el marcador utilizado para la región no posee ningún valor taxonómico ni sistemático fuera de diferenciar entre *L. braziliensis* o *L. peruviana*. Se observó que para todas las muestras se tenían un 99-95% de similitud con las muestras en el GeneBank y ese 1-5% de diferencia se reportó en los extremos que es resultado de la pérdida de bases en los extremos de la secuencia durante la reacción de PCR. El hecho de que la similitud sea tan elevada en el centro de la secuencia es un sinónimo de una excelente calidad. Estos factores contrastan con los resultados para el gen *hsp70*, un marcador más ampliamente estudiado para sistemática y taxonomía (Fraga *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2010), que presenta mayor sensibilidad para diferenciar entre especies y cuenta con una gran cantidad de registros en el “GeneBank”, para diferentes especies. Como detalle adicional, el marcador *hsp70* presenta a los géneros *Endotrypanum* y *Leptomonas* como taxones hermanos del subgénero *L. (Leishmania)*, fenómeno que no se encuentra apoyado por la literatura, estos dos taxones son hermanos del género *Leishmania* en su totalidad (Cupolillo *et al.*, 2000; Espinosa *et al.*, 2016).

El marcador utilizado en este estudio no tiene el potencial de ser una herramienta útil para la sistemática de *Leishmania*, pero el marcador reportado por Tsukayama y colaboradores (2013) para una secuencia de mayor tamaño, sí reporta ser útil para realizar un diagnóstico rápido de las especies responsables de la infección. Para estudios futuros se recomienda evaluar nuevamente este, utilizando los primers para una región mayor, reportados por Tsukayama *et al.*, 2009.

2. Marcador 6-gpd

Este marcador organiza correctamente a *Leishmania* como género monofilético y define muy detalladamente los complejos de especies dentro del género y sub-géneros, especialmente dentro del complejo *L. guyanensis*. Sin embargo, incluye a *Endotrypanum* como taxón hermano del sub-género *L. (Leishmania)*. La relación entre *Endotrypanum* y *Leishmania* ha sido abordada

en la literatura, argumentándose que es un género totalmente diferente de *Leishmania* pero cercano a él (Cupolillo *et al.*, 2000; Espinosa *et al.*, 2016). La enzima *6-gpd* ha sido ampliamente utilizada para caracterizar los parásitos de *Leishmania* (Arana *et al.*, 1990; Tsukayama *et al.*, 2009) y Tsukayama y colaboradores (2013) identificaron un marcador que codifica para esta enzima que es capaz de distinguir entre *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Cabe resaltar que *L. panamensis* es considerada una sub especie de *L. guyanensis* (Fraga *et al.*, 2010).

Los resultados de este estudio apoyan la utilidad del marcador *6-gpd* para diferenciar entre estas especies, ya que en el árbol se encuentran bien definidos estos dos grupos.

A pesar de que este árbol detecta mayor diversidad que el marcador *mpi*, los resultados no son del todo consistentes con los resultados del marcador *hsp70*. Entre éstos están las muestras GE-0673 y GE-1893 que se identificaron como *L. panamensis* con el marcador *hsp70*, pero en el caso del marcador *6-gpd*, diseñado específicamente para estas especies, identifica estas muestras como *L. braziliensis*. Se obtuvo un resultado similar con las muestras GE-2156 y GE-2484 que son identificadas como *L. mexicana* por el marcador *hsp70*, pero como *L. panamensis* por el marcador *6-gpd*. Otros resultados no son comparables debido a que el marcador *hsp70* no amplificó o no se pudo secuenciar para algunas muestras (GE-0494 y GE-574) y éstas solo se pudieron evaluar con el marcador *6-gpd*. Este marcador identifica a GE-0494 y GE-0574 como *L. guayanensis*, especie que no ha sido reportada previamente en Guatemala en infecciones autóctonas (Morales 2008; Alvar *et al.*, 2012). Sin embargo, dada la inconsistencia de los demás resultados ya discutidos, no es posible confirmar la presencia de esta especie. Aunque se reporta que este marcador sí detecta a *L. braziliensis*, este marcador no brindó información detallada a nivel de intra-especie.

Este fue el marcador con menos éxito en la amplificación y la secuenciación. Estos resultados son contradictorios con las propiedades reportadas en el estudio en donde fue propuestos (Tsukayama *et al.*, 2013). Cabe resaltar que ellos utilizaron Q-PCR anidado, resultando en mayor sensibilidad hacia *Leishmania* en comparación del método utilizado en esta investigación, PCR de punto final. Adicionalmente, la empresa a cargo de la secuenciación reportó señales mixtas en las secuencias obtenidas para este gen, lo que sugiere amplificación no específica o la presencia de infecciones mixtas. Cuatro muestras (GE-2019, GE-1952 y GE-2631) reportaron homología con material genético humano del cromosoma 12p24 y el gen de la

proteína CDC5, según resultados de BLAST. Todas las muestras mencionadas anteriormente no fueron utilizadas debido a la baja calidad de la secuenciación y los resultados inusuales por homología de secuencias del BLAST. Esta alta ocurrencia de interferencias posiblemente afectaron los resultados del análisis filogenético a través de la metodología, que, aunque el árbol filogenético tenga una topología adecuada a nivel de sub-géneros, existan inconsistencias de identificación específica en comparación con el marcador *hsp70*. La homología por BLAST señala a todas las especies como *L. peruviana*, una subespecie de *L. braziliensis*, según sugiere el trabajo de Fraga y colaboradores (2010).

Boité y colaboradores (2012) señalan en un análisis taxonómico de *L. (Viannia)* basado en MLEE, que *6-gpd* es uno de los marcadores con más sitios polimórficos. Sin embargo, en este estudio utiliza una sección más grande del gen, el cual se recomienda para próximos análisis filogenéticos. El marcador evaluado de este gen tiene potencial para ser utilizado como herramienta taxonómica, siempre y cuando se amplíe la longitud de secuencia para incluir residuos menos conservados.

3. Marcador *hsp70*

El marcador *hsp70* fue utilizado para comparar y validar los resultados obtenidos con los marcadores *mpi* y *6-gpd*, debido a que actualmente se reconoce como un marcador importante para la taxonomía y sistemática de *Leishmania* alrededor del mundo ya ofrece más información para establecer las relaciones filogenéticas de esta especie (Fraga *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2010, 2012). La región óptima previamente designada para validar la capacidad de detección taxonómica fue un fragmento de 1422 pb, sin embargo, este no se logró amplificar exitosamente. La causa más probable de este fenómeno es la baja concentración del ADN del parásito. Al realizar las pruebas de estandarización se observó que las muestras control con menor concentración (3.8 ng/μL) no amplificaron. Se realizaron pruebas adicionales variando el volumen de templado de ADN (desde 1 μL hasta 5 μL), pero el resultado siguió siendo negativo. Solamente cuatro muestras y los controles positivos amplificaron exitosamente, por lo que se confirmó que los métodos de extracción y amplificación por PCR no tenían problemas. Además, dado que con los otros dos marcadores se obtuvo un 88% de amplificación, se comprueba que el método de extracción es adecuado para la extracción de ADN.

Se observó también que las únicas muestras que amplificaron fueron fijadas y teñidas recientemente (entre el 2010 al 2016), por lo que existe la posibilidad que el ADN de las muestras procesadas hace más tiempo se haya degradado parcialmente, afectando la amplificación de un fragmento largo de 1422 pb.

Debido a la imposibilidad de estandarizar la amplificación del fragmento de 1422 pb, se optó por amplificar únicamente un fragmento interno de 593pb, como herramienta de identificación de especies por PCR-RFLP (da Silva *et al.*, 2010). Sin embargo, esta región posee la desventaja de no poder diferenciar entre *L. guyanensis* y *L. panamensis*, dado que la secuencia de este gen es conservada entre ellas. Sin embargo, hasta la fecha no se han documentado infecciones autóctonas de *L. guyanensis* en Guatemala, por lo que se presume que un resultado positivo en la amplificación con este marcador, correspondería a *L. panamensis*. Pese a lo anterior, el marcador es capaz de poder diferenciar entre las demás especies que han sido reportadas en Guatemala hasta la fecha (*L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*) y algunas otras especies presentes en Suramérica, además de la capacidad de identificar *L. infantum*, una especie causante de leishmaniasis visceral en el nuevo mundo y presente en Guatemala.

Las topografías de los árboles filogenéticos obtenidos con los marcadores *hsp70* y *6-gpd* coinciden. El único marcador que reportó homología a *L. mexicana* fue el *hsp70* en un 52% de las muestras analizadas. Esta especie presentó poca diversidad genética según el árbol filogenético, hecho que concuerda con estudios de análisis de genética poblacional de *L. mexicana*, donde señalan poblaciones genéticamente homogéneas desde Texas hasta Venezuela, a excepción de las regiones del Ecuador y República Dominicana que presentan heterogeneidad poblacional (Kreutzer 1990). Esta información apoya las características intraespecíficas de *L. mexicana* observadas en este estudio. Adicionalmente, este marcador reportó una muestra con homología a *L. amazonensis*, aunque este marcador no tiene la capacidad de discernir entre *L. mexicana* y *L. amazonensis*, las cuales son consideradas como una misma especie (Fraga *et al.*, 2010).

Este marcador también reportó la presencia de dos muestras identificadas como *L. panamensis* y cuatro muestras de *L. braziliensis*. Este marcador identificó el 19% (cuatro de 21 muestras) de las infecciones de leishmaniasis cutánea causadas por la especie *L. braziliensis*,

contrastando estos resultados con investigaciones previas que reportan en Guatemala una frecuencia de infección del 73% causadas por *L. braziliensis* (Herwaldt *et al.*, 1992).

Otra especie identificada en este estudio, previamente no reportada para Guatemala, fue *L. naiffi* (muestra GE-2639). Esta especie es autóctona de Suramérica, causa muy pocos casos clínicos y responde rápidamente al tratamiento con medicamentos o se cura de forma espontánea, por lo que el estudio de esta especie ha sido de menor prioridad (Fagundes-Silva *et al.*, 2015). Debido al escaso conocimiento sobre esta especie no se tiene bien delimitado su rango específico de distribución y es posible que la misma se extienda a la región centroamericana. Sin embargo, es más probable que sea una variación de *L. braziliensis* que posee la misma secuencia que *L. naiffi* para este marcador (Montalvo *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2013), además, *L. naiffi* solo se ha reportado en Suramérica, principalmente Brasil (Fagundes-Silva *et al.*, 2015). Debido a que no fue posible amplificar el fragmento de 1422 pb, estos resultados necesitan más análisis para poder confirmarse (Montalvo *et al.*, 2010).

Excepcionalmente se identificó a GE-0232 y GE-0042 como *L. major*, especie que se encuentra solamente en el viejo mundo y su presencia podría ser explicada únicamente como infecciones importadas. Sin embargo, se requiere realizar más análisis, sobre todo amplificando una región mayor del gen con ayuda de otros marcadores, antes de poder confirmar este resultado. Sin embargo, este marcador fue diseñado para ser capaz de distinguir sin problemas esta especie (Montalvo *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2013).

C. Inferencias de la diversidad de especies en Guatemala

Según reportes anteriores solamente se habían descrito *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. mexicana* como especies causantes de leishmaniasis cutánea en Guatemala (Morales, 2008; Alvar *et al.*, 2012). Para esta investigación, de acuerdo a las homologías de secuencia de BLAST y el análisis filogenético de cada marcador (principalmente *hsp70* y *6-gpd*) se reportan las siguientes especies de parásitos responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea en Guatemala: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, y *L. mexicana*, y es necesario confirmar los resultados para *L. naiffi*, *L. major* y *L. guyanensis*, para lo que se recomienda utilizar la región de 1422 pb del marcador *hsp70*. Al combinar todos los marcadores para crear un árbol filogenético

combinado se pierde mucha de la diversidad identificada de manera individual, por lo que los datos de este árbol no fueron tomados en consideración para concluir.

Para realizar estudios de diversidad genética es recomendable utilizar un tamaño de muestra mayor al utilizado en este estudio para mejorar el nivel de confianza; la regla de aplicación más amplia entre la comunidad científica recomienda utilizar no menos de 200 muestras (Lanfear *et al.*, 2016). En este estudio se utilizaron 30 muestras, dadas las restricciones de presupuesto. Hay que tomar en cuenta que no todas las muestras amplificaron exitosamente y no se obtuvieron secuencias satisfactorias para todas las muestras amplificadas. Como resultado se ve comprometido el tamaño de la muestra y conlleva una pérdida de robustez y confianza de las posibles inferencias a partir de los resultados obtenidos. Agregando a lo anterior, un estudio de diversidad requiere de una mayor cantidad de marcadores, en este caso solamente se pudieron utilizar tres, debido a recursos y tiempo.

Este estudio fue de nivel exploratorio y se recomienda profundizar en el análisis de especies responsables de otros síndromes de la leishmaniasis. Además de utilizar una mayor cantidad de muestras y marcadores para adentrarse más en la genética de poblaciones y/o en las tipificaciones de secuencias multilocus. Esto permitiría explorar la diversidad a través de un enfoque biogeográfico que requiere de información de reservorios de los parásitos, información clave para los estudios de dispersión y evolución a nivel mundial (Akhoundi *et al.*, 2016). Dicha información es escasa en Guatemala, por ende, se insta a generar información relevante a este tema. Ya se ha comprobado en este trabajo que la utilización de las placas Giemsa es adecuado para estudios de diversidad y taxonomía. El resumen de las muestras identificadas se encuentra en el Cuadro 6 al final de la sección de resultados.

Varios estudios han observado una dinámica poblacional bastante compleja de recombinaciones entre otras especies de *Leishmania* dentro del sub-género *L. (Viannia)* (Kuhls *et al.*, 2013) y alta diversidad de esta especie a nivel geográfico (Rougeron *et al.*, 2009). Sería de mucha importancia estudiar los patrones y comportamientos poblacionales de este parásito en el ambiente clínico y su comportamiento en reservorios naturales, principalmente de *L. braziliensis* ya que es la especie más reportada en Guatemala, la más difícil de tratar y la más peligrosa debido al potencial que se presenta en otras regiones del mundo de poder causar LMC (Herwaldt *et al.*, 1992).

V. Conclusiones

Los árboles filogenéticos de *Leishmania*, utilizando los marcadores *mpi* y *6-gpd* y comparándolos con el marcador *hsp70*, no son consistentes para representar concluyentemente las relaciones entre las especies y cepas en Guatemala.

El marcador *mpi* utilizado en este estudio es muy conservado y poco informativo para poder utilizarlo como marcador de la diversidad genética de *Leishmania* y no posee ninguna utilidad filogenética.

El árbol generado con el fragmento del marcador *6-gpd* utilizado en este estudio tiene la capacidad de diferenciar relaciones entre sub-géneros y difícilmente identificar especies por lo que tiene limitada capacidad como herramienta taxonómica y sistemática.

El árbol generado utilizando el marcador *hsp70* utilizado en ese estudio posee fidelidad filogenética y los resultados obtenidos están en correspondencia con reportes previos.

El método de extracción descrito por Volpini y adaptado en este estudio es de bajo costo, rápido y eficiente, con resultados exitosos para la obtención de material genético de *Leishmania* apto para ser utilizado en PCR.

Las láminas de extendido de tejido de úlceras de leishmaniasis cutánea teñidas con Giemsa son una fuente de material genético sub-óptimo para pruebas moleculares en *Leishmania*.

En esta investigación se reportan *L. mexicana* (52%), *L. braziliensis* (24%) y *L. panamensis* (9%) como las principales especies causantes de leishmaniasis cutánea en Guatemala.

La especie molecularmente más diversa es *L. braziliensis*, que presenta tres diferentes variantes genéticas en las secuencias de nucleótidos obtenidas por el marcador *hsp70*, una de ellas idéntica a *L. naiffi*.

Se reporta la presencia de dos muestras identificadas como *L. major* en Guatemala.

VI. Recomendaciones

Se recomienda acoplar la extracción del método Volpini con purificación orgánica y/o utilizando acetato de sodio para precipitar y recuperar ADN más puro.

Se recomienda la herramienta de PCR-RFLP del marcador *hsp70* para identificar y respaldar los resultados de cualquier estudio filogenético de *Leishmania*.

Se recomienda utilizar más sets de cebadores informativos para estudiar a más detalle la diversidad en *Leishmania*, principalmente usando el transcriptor espacial interno (ITS1) y el citocromo b, así como aumentar el tamaño de muestra y/o utilizar PCR anidado.

Se recomienda utilizar el set de cebadores de 1422 pares de bases del gen *hsp70* para estudiar más a detalle la diversidad en *Leishmania* y validar con mayor solidez los resultados obtenidos.

Se recomienda reevaluar las muestras con regiones más extensas del marcador *6-gpd* para poder evaluar su verdadera capacidad taxonómica en Guatemala.

Se recomienda explorar la utilización de parásitos aislados de *Leishmania* por medio de cultivo *in vitro* para realizar controles de los parásitos como referencia de identificación y control.

Se recomienda realizar estudios poblacionales multilocus de *L. braziliensis* en Guatemala e implementar clonación por vectores de las amplificaciones del PCR para observar describir hibridación presente en Guatemala dentro del sub-género *L. (Viannia)*.

Es recomendable una investigación más profunda para determinar contundentemente la presencia de *L. major*, *L. guyanensis*, y *L. naiffi*, ya que la evidencia presente en este estudio no es suficiente para afirmar estos resultados.

Se recomienda profundizar en estudios de *Leishmania* en regiones endémicas para identificar los patrones de distribución espacial, relacionada a la actividad de otros mamíferos con nichos importantes como quirópteros y roedores en zonas cercanas a comunidades y zonas selváticas aisladas de poblaciones humanas.

VII. Literatura

- Adaui, V., Veland, N., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J., Boggild, A.K., Valencia, B.M. and Alba, M. 2013. Simultaneous Infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *L. (V.) lainsoni* in a Peruvian Patient with Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (4): 774–777.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P. and Sereno, D. 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (3): e0004349.
- Alexander, J., Satoskar, A.R. and Russell, D.G. 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* 112 Pt 18: 2993–3002.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den and the WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7 (5): e35671.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. and Moreno, J. 2008. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (2): 334–359.
- Andrade-Narváez, F.J., Simmonds-Díaz, E., Rico-Aguilar, S., Andrade-Narváez, M., Palomo-Cetina, A., Canto-Lara, S.B., García-Miss, M.R., Madera-Sevilla, M. and Albertos-Alpuche, N. 1990. Incidence of localized cutaneous leishmaniasis (chiclero’s ulcer) in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84 (2): 219–220.
- Antonio, L. de F., Lyra, M.R., Saheki, M.N., Schubach, A. de O., Miranda, L. de F.C., Madeira, M. de F., Lourenço, M.C. da S., Fagundes, A., Ribeiro, É.A. dos S., Barreto, L. and Pimentel, M.I.F. 2017. Effect of secondary infection on epithelialisation and total healing of cutaneous leishmaniasis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112 (9): 640–646.
- Arana, B.A., Mendoza, C.E., Rizzo, N.R. and Kroeger, A. 2001. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65 (5): 466–470.
- Arana, M., Evans, D.A., Zolessi, A., Cuentas, A.L. and Arevalo, J. 1990. Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84 (4): 526–529.
- Aronson, N., Herwaldt, B.L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E.M., Ephros, M., Jeronimo, S. and Magill, A. 2016. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases*: ciw670.
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C.K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J.D., Mimori, T., Gomez, E.A.L., Hashiguchi, Y. and Uezato, H. 2009. Phylogenetic analysis of the genus

- Leishmania by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology* 121 (4): 352–361.
- Asilian, A. and Davami, M. 2006. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical and Experimental Dermatology* 31 (5): 634–637.
- Banúls, A.L., Hide, M. and Tibayrenc, M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology* 29 (8): 1137–1147.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L.F. and Jaffe, C.L. 2006. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (4): 1435–1439.
- Bhattacharyya, R., Das, K., Sen, S., Roy, S. and Majumder, H.K. 1996. Development of a genus specific primer set for detection of *Leishmania* parasites by polymerase chain reaction. *FEMS microbiology letters* 135 (2–3): 195–200.
- Boité, M.C., Mauricio, I.L., Miles, M.A. and Cupolillo, E. 2012. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (*Viannia*) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (11): e1888.
- Brandão-Filho, S.P., Campbell-Lendrum, D., Brito, M.E., Shaw, J.J. and Davies, C.R. 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (5): 488–494.
- Brito, M.E.F., Andrade, M.S., Mendonça, M.G., Silva, C.J., Almeida, E.L., Lima, B.S., Félix, S.M., Abath, F.G.C., Da Graça, G.C., Porrozzi, R., Ishikawa, E.A., Shaw, J.J., Cupolillo, E. and Brandão-Filho, S.P. 2009. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil: Species diversity of *Leishmania* parasites. *Tropical Medicine & International Health* 14 (10): 1278–1286.
- Cardona-Arias, J.A., Vélez, I.D. and López-Carvajal, L. 2015. Efficacy of Thermootherapy to Treat Cutaneous Leishmaniasis: A Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. *PLOS ONE* 10 (5): e0122569.
- Carrasquilla, M. and Kaufman, P. 2015. *Lutzomyia longipalpis*. .
- CDC. 2013. Life Cycle Of *Leishmania*.
- CDC. 2016. *Leishmaniasis - Resources for Health Professionals*. Downloaded from http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html on 29 January 2017.
- Chakraborty, A.K. and Majumder, H.K. 1988. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 152 (2): 605–611.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. and Boelaert, M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 5 (11): S7–S16.
- Claborn, D. 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of Global Infectious Diseases* 2 (2): 127.

- Croan, D.G., Morrison, D.A. and Ellis, J.T. 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89 (2): 149–159.
- Cupolillo, E., Momen, H. and Grimaldi Jr, G. 1998. Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93 (5): 663–668.
- Cupolillo, E., Grimaldi Júnior, G., Momen, H. and Beverley, S.M. 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73 (1–2): 145–155.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H. and Grimaldi, G. 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today (Personal Ed.)* 16 (4): 142–144.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8): 772–772.
- David, C.V. and Craft, N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy* 22 (6): 491–502.
- Devi, C.S., Saravanan, H., Joseph, R.E., Koturan, S. and Srinivasan, V.M. 2014. *Leishmaniasis*: A review on global epidemiological trends. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 7 (5): 569–574.
- Espinosa, O.A., Serrano, M.G., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. and Shaw, J.J. 2016. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*: 1–13.
- Fagundes-Silva, G.A., Romero, G.A.S., Cupolillo, E., Yamashita, E.P.G., Gomes-Silva, A., Guerra, J.A. de O. and Da-Cruz, A.M. 2015. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (6): 797–800.
- Ferreira, E. de C., Cruz, I., Cañavate, C., de Melo, L.A., Pereira, A.A.S., Madeira, F.A.M., Valério, S.A.N., Cunha, H.M., Paglia, A.P. and Gontijo, C.M.F. 2015. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Veterinary Research* 11 (1).
- Fraga, J., Montalvo, A.M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C. and Van der Auwera, G. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2): 238–245.
- Fraga, J., Montalvo, A.M., Maes, Ilse, Dujardin, J.-C. and Van der Auwera, G. 2013. HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77 (3): 245–247.
- al-Gindan, Y., Kubba, R., el-Hassan, A.M., Omer, A.H., Kutty, M.K. and Saeed, M.B. 1989. Dissemination in cutaneous leishmaniasis. 3. Lymph node involvement. *International Journal of Dermatology* 28 (4): 248–254.
- Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H. and Laurenson, M.K. 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases* 8 (12): 1468–1473.
- Herwaldt, B.L., Arana, B.A. and Navin, T.R. 1992. The Natural History of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *Journal of Infectious Diseases* 165 (3): 518–527.
- Kobets, T., Grekov, I. and Lipoldova, M. 2012. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Current Medicinal Chemistry* 19 (10): 1443–1474.

- Kreutzer, R.D. 1990. Genetic analysis of *Leishmania mexicana* populations from Texas, Latin America, and the Caribbean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43 (4): 367–372.
- Kreutzer, R.D. and Christensen, H.A. 1980. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29 (2): 199–208.
- Kuhls, K., Cupolillo, E., Silva, S.O., Schweynoch, C., Côrtes Boité, M., Mello, M.N., Mauricio, I., Miles, M., Wirth, T. and Schönian, G. 2013. Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (10): e2490.
- Lanfear, R., Hua, X. and Warren, D.L. 2016. Estimating the Effective Sample Size of Tree Topologies from Bayesian Phylogenetic Analyses. *Genome Biology and Evolution* 8 (8): 2319–2332.
- López, L., Robayo, M., Vargas, M. and Vélez, I.D. 2012. Thermoherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials* 13 (1).
- Lukes, J., Mauricio, I.L., Schonian, G., Dujardin, J.-C., Soteriadou, K., Dedet, J.-P., Kuhls, K., Tintaya, K.W.Q., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pralong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F.J. and Miles, M.A. 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (22): 9375–9380.
- Luyo-Acero, G.E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., Gomez-Landires, E., Hashiguchi, Y. and Nonaka, S. 2004. Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 128 (5): 483–491.
- Maarouf, M., Lawrence, F., Brown, S. and Robert-Gero, M. 1997. Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitology Research* 83 (2): 198–202.
- Markle, W.H. and Makhoul, K. 2004. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician* 69 (6): 1455–1460.
- Miller, E. and Huppert, A. 2014. Correction: The Effects of Host Diversity on Vector-Borne Disease: The Conditions under Which Diversity Will Amplify or Dilute the Disease Risk. *PLoS ONE* 9 (1).
- Montalvo, A.M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C. and Van der Auwera, G. 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31 (7): 1453–1461.
- Montalvo, A.M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J.C. and Van der Auwera, G. 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 137 (8): 1159–1168.
- Morales, Z. 2008. Leishmaniasis en la Región de las Américas. Reunión de coordinadores de Programa Nacional de Leishmaniasis. .
- Moreira, R. da C.R., Rebelo, J.M.M., Gama, M.E.A. and Costa, J.M.L. 2002. [knowledge level about of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and use of alternative therapies in an endemic area in the Amazon Region in the State of Maranhão, Brazil]. *Cadernos De Saude Publica* 18 (1): 187–195.

- MSPAS. 2007. Protocolos Nacionales de vigilancia de Salud Pública. .
- Navin, T.R., Arana, B.A., Arana, F.E., Berman, J.D. and Chajón, J.F. 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The Journal of Infectious Diseases* 165 (3): 528–534.
- Navin, T.R., Arana, B.A., Arana, F.E., de Mérida, A.M., Castillo, A.L. and Pozuelos, J.L. 1990. Placebo-controlled clinical trial of meglumine antimonate (glucantime) vs. localized controlled heat in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42 (1): 43–50.
- Nuwayri-Salti, N., Baydoun, E., El-Tawk, R., Makki, R.F. and Knio, K. 2000. The epidemiology of leishmaniasis in Lebanon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94 (2): 164–166.
- OGE, O.G. de E. 2000. *Leishmaniasis*. Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología: Instituto Nacional de Salud, Lima, .
- Pintado, V., Martín-Rabadán, P., Rivera, M.L., Moreno, S. and Bouza, E. 2001. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine* 80 (1): 54–73.
- Pomares, C., Marty, P., Bañuls, A.L., Lemichez, E., Pratlong, F., Faucher, B., Jeddi, F., Moore, S., Michel, G., Aluru, S., Piarroux, R. and Hide, M. 2016. Genetic Diversity and Population Structure of *Leishmania infantum* from Southeastern France: Evaluation Using Multi-Locus Microsatellite Typing. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (1): e0004303.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253–1256.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. and Perieres, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee* 65 (3): 111–125.
- Roque, A.L.R. and Jansen, A.M. 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3 (3): 251–262.
- Rotureau, B. 2006. Ecology of the *leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (1): 81–96.
- Rougeron, V., De Meeus, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J.-C., De Doncker, S., Le Ray, D., Ayala, F.J. and Banuls, A.-L. 2009. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (25): 10224–10229.
- Sacks, D.L. 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 69 (1): 100–103.
- Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B. and Drosten, C. 2003. Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic *Leishmania* Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (4): 1529–1535.
- Shirian, S., Oryan, A., Hatam, G.R. and Daneshbod, Y. 2012. Mixed Mucosal Leishmaniasis Infection Caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (11): 3805–3808.

- da Silva, L.A., de Sousa, C. dos S., da Graça, G.C., Porrozzi, R. and Cupolillo, E. 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (1): 77–83.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731–2739.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pralong, F., Martini-Dumas, A. and Serres, E. 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee* 68 (2): 107–108.
- Tsokana, C., Athanasiou, L., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K. and Billinis, C. 2014. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. In: Claborn, D. (ed.), *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, InTech.
- Tsukayama, P., Lucas, C. and Bacon, D.J. 2009. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 39 (3): 355–362.
- Tsukayama, P., Núñez, J.H., De Los Santos, M., Soberón, V., Lucas, C.M., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., Ore, M., Baldeviano, G.C., Edgel, K.A., Lescano, A.G., Graf, P.C.F. and Bacon, D.J. 2013. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (1): e1956.
- Van der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J.J., Bart, A., Schonian, G. and Felger, I. 2014. Evaluation of Four Single-Locus Markers for *Leishmania* Species Discrimination by Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (4): 1098–1104.
- Vannier-Santos, M., Martiny, A. and Souza, W. 2002. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design* 8 (4): 297–318.
- Verma, N.K. and Dey, C.S. 2004. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (8): 3010–3015.
- Volpini, â. C., Marques, M.J., Lopes dos Santos, S., Machado-Coelho, G.L., Mayrink, W. and Romanha, A.J. 2006. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (8): 815–818.
- Waki, K., Dutta, S., Ray, D., Kolli, B.K., Akman, L., Kawazu, S.-I., Lin, C.-P. and Chang, K.-P. 2007. Transmembrane molecules for phylogenetic analyses of pathogenic protists: *Leishmania*-specific informative sites in hydrophilic loops of trans- endoplasmic reticulum N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. *Eukaryotic Cell* 6 (2): 198–210.
- Weigle, K. and Saravia, N.G. 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 14 (5): 433–450.
- Weina, P.J., Neafie, R.C., Wortmann, G., Polhemus, M. and Aronson, N.E. 2004. Old World Leishmaniasis: An Emerging Infection among Deployed US Military and Civilian Workers. *Clinical Infectious Diseases* 39 (11): 1674–1680.
- WHO. 2013. *Leishmaniasis Epidemiological Report of the Americas*. .
- WHO. 2016. Leishmaniasis.

- Wortmann, G., Hochberg, L.P., Arana, B.A., Rizzo, N.R., Arana, F. and Ryan, J.R. 2007. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Guatemala using a real-time polymerase chain reaction assay and the Smartcycler. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (5): 906–908.
- Zelazny, A.M., Fedorko, D.P., Li, L., Neva, F.A. and Fischer, S.H. 2005. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (4): 415–420.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Carta de aprobación del Comité de Ética del Centro de Estudios en Salud (CES).



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 Calle 15-79, Zona 15 V.H. III
PBX 2369 0791 al 95
Tels. 2364 0336 al 40
2364 0492 al 97
2507 1500
www.uvg.edu.gt
Apartado Postal No. 82, 01901
Guatemala, Guatemala, C.A.



Guatemala, 8 de septiembre de 2017

No. Protocolo 169-09-2017


De: Comité de Ética en Investigación
Centro de Estudios en Salud
Universidad del Valle de Guatemala

Para: Lcda. Renata Mendizábal de Cabrera
Investigador Prinicpal

Asunto: Evaluación del protocolo titulado: "Caracterización y filogenia de especies de Leishmania (Tripanosomatida) responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea humana en Guatemala"

El protocolo arriba indicado ha sido revisado por el Comité de Ética en Investigación del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala y consideró que de acuerdo a los lineamientos de este Comité el mismo se clasifica como "Investigación que no involucra sujetos humanos", dado que únicamente se analizará el material genético de los parásitos el cual se obtuvo de muestras desligadas de información privada identificable de las personas que los proporcionaron y no se recolectarán muestras adicionales.

Consecuentemente se determina que no es necesario revisiones posteriores de este estudio por parte de este Comité, a menos que se hicieran modificaciones al protocolo evaluado y que éste cambiara de naturaleza.


Jorge Jara, MD, EE
Presidente
Comité de Ética en Investigación
Centro de Estudios en Salud
Universidad del Valle de Guatemala



ANEXO 2. Controles positivos utilizados en las pruebas de PCR, proporcionados por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia.

Control	Cepa	ng/ul
<i>L. mexicana</i>	Bel21	38,43
<i>L. panamensis</i>	LS94	136,44
<i>L. guyanensis</i>	M4147	65,08
<i>L. braziliensis</i>	M2903	71,91

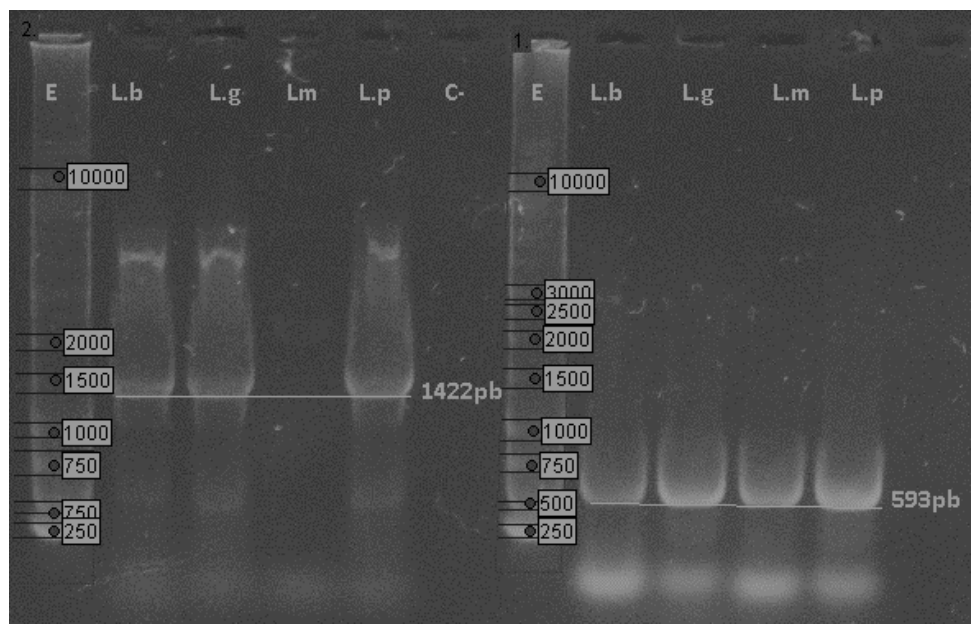
ANEXO 3. Cuadros de información de secuencias utilizadas como controles para el análisis filogenético.

Taxón Control	Códigos de las secuencias por marcador		
	<i>hsp70</i>	<i>mpi</i>	<i>6-gpd</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	KC959996.1	XM_799918.1	CP015669.1
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	AOFS00000000.2		
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	XM_015798028.1	XM_015797624.1	XM_015796813.1
<i>L. mexicana amazonensis</i>	EU599090.1	EU053123.1	EU370972.1
<i>L. mexicana Brasil</i>	EU599091.1	EU053124.1	AY386372.1
<i>L. infantum</i>	HF586350.1	DQ449766.1	JX021394.1
<i>L. infantum</i>	HF586408.1	DQ449759.1	KU175206.1
<i>L. infantum</i>	no alineada	DQ449758.1	KU175213.1
<i>L. guyanensis Brasil</i>	EU599093.1	EU053120.1	EU153347.1
<i>L. panamensis</i>	EU599094.1	EU053121.1	XM_010704442.1
<i>L. braziliensis Perú</i>	EU599088.1	EU327893.1	EU327921.1
<i>L. braziliensis Perú</i>	FR715990.1	EU327894	EU153346.1
<i>L. braziliensis Brasil/Perú</i>	HF586369.1	EU053117.1	EU327920.1
<i>L. major</i>	GCA_000002725.2		
<i>L. panamensis</i>	GCA_000755165.1		
<i>L. mexicana Guatemala</i>	CADB00000000.1		
<i>L. lainzoni</i>	no disponible	EU053122	no disponible
<i>L. naiffi</i>	FN395056	no disponible	no disponible

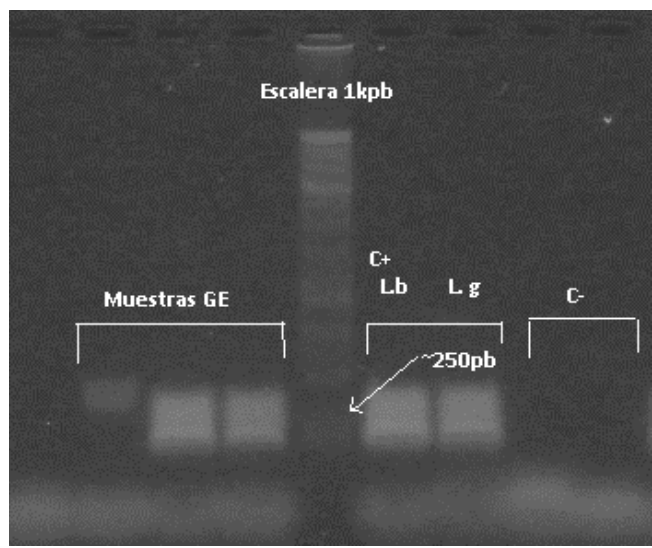
ANEXO 4. Cuadro con información general de las muestras seleccionadas que corresponden al período desde 1989 al 2016.

Etiqueta	Código	Edad	Sexo	Amastigotes	Resultado (+)	Año de toma de muestra	Departamento	Municipio
1	GE-0042	22	F	236	6	1989	Guatemala	Guatemala
2	GE-0232	15	M	1418	6	1990	Petén	San José
3	GE-0256	14	M	23	2	1992	Sin Dato	Sin Dato
4	GE-0321	53	M	1226	6	1993	Petén	Santa Elena
5	GE-0493	26	M	253	2	1995	Petén	La Libertad
6	GE-0494	8	M	545	4	1995	Petén	La Libertad
7	GE-0547	7	M	102	3	1997	Petén	Poptún
8	GE-0637	24	F	59	2	1998	Petén	La Libertad
9	GE-0765	12	M	171	3	1998	Petén	Dolores
10	GE-0792	22	M	625	5	1999	Petén	Poptún
11	GE-1119	27	M	901	6	2000	Izabal	Livingston
12	GE-1308	17	M	199	2	2001	Petén	Poptún
13	GE-1485	23	M	203	3	2002	Petén	Dolores
14	GE-1488	30	M	125	2	2002	Petén	San Luis
15	GE-1761	43	M	216	3	2003	Petén	Dolores
16	GE-1800	38	M	67	4	2003	Petén	Dolores
17	GE-1893	16	M	45	3	2004	Petén	Poptún
18	GE-1905	25	F	210	3	2004	Petén	Poptún
19	GE-1952	55	M	29	5	2005	Petén	Poptún
20	GE-2019	46	M	184	3	2005	Petén	San Luis
21	GE-2107	62	M	150	4	2005	Petén	Melchor de Mencos
22	GE-2156	12	M	1572	6	2005	Petén	San Luis
23	GE-2285	21	M	120	4	2006	Petén	Poptún
24	GE-2484	26	M	152	3	2008	Petén	Poptún
25	GE-2591	22	M	505	6	2009	Petén	Poptún
26	GE-2610	25	M	2016	6	2009	Guatemala	Villa Nueva
27	GE-2617	33	M	51	3	2010	Guatemala	Fraijanes
28	GE-2631	24	M	338	6	2013	Alta Verapaz	Cobán
29	GE-2639	32	M	66	3	2015	Guatemala	Guatemala
30	GE-2708	20	M	12	2	2016	Alta Verapaz	Fray Bartolomé de Las Casas

ANEXO 5. Prueba control de corrida utilizando buffer y cámara de electroforesis, marcador *hsp70* (1422 pb y 593 pb) en gel de agarosa 1.5%. (L.b: *L. braziliensis*, L.g: *L. guyanensis*, L.m: *L. mexicana* y L.p: *L. panamensis*) controles positivos; (C-) control negativo.



ANEXO 6. Segunda corrida del control negativo de la amplificación del marcador *mpi* para control de calidad del control negativo en gel de agarosa al 1.5%. L.b: *Leishmania braziliensis*; l.g: *Leishmania guyanensis*



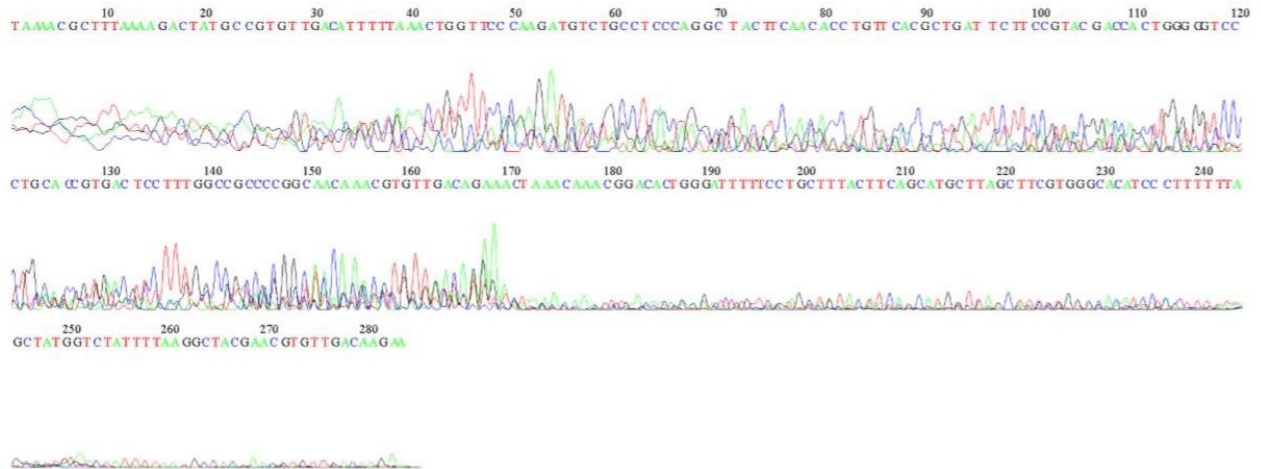
ANEXO 7. Electroferograma exitoso de la muestra 6-gpd_5 con la reacción del cebador sentido.

File: 6GDP_5_6GDP1262F.ab1 Run Ended: 2017/10/21 1:22:56 Signal G:2950 A:2080 C:4749 T:3053
Sample: 6GDP_5_6GDP1262F Lane: 8 Base spacing: 13.268781 171 bases in 2098 scans Page 1 of 1



ANEXO 8. Electroferograma con señales mixtas de la muestra 6-gpd_12 utilizando el cebador sentido.

File: 6GDP_12_6GDP1262F.ab1 Run Ended: 2017/10/21 1:22:56 Signal G:195 A:182 C:271 T:191
Sample: 6GDP_12_6GDP1262F Lane: 27 Base spacing: 12.9919195 284 bases in 3499 scans Page 1 of 1



ANEXO 9. Secuencias consenso obtenidas de las muestras utilizadas en esta investigación (Formato Fasta).

- Hsp70

>GE0042

```
TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGGCGACGAACGGCGATACACACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGAGAACATTGAC
TTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGC
AGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG
```

>GE0232

```
TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCAGCGGCCAACGCGTACGGTCTAGACAAGGTTCGACGACGGCAAAGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGGCGACGAACGGCGATACACACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGC-
CACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCG
AGATCGACGCGCTGTTTCGAGAACATTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCT
TCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCC-
CAGCACGATCCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAGGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG
```

>GE0637

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTC
GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGACATCGACGCGCTGTTGACAACGTGAC
TTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGC
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE1308

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE1485

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTC

GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGAC
TTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGC
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE1800

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTCTCGTC
GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGAC
CTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGC
AGCGCAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE1893

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTGTCGTC
GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGAC
TTCCAGGCCAACATCACGCGCGCSCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGC
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE1905

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAAGACCTTTCGTC
GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGAC
TTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGC
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE1952

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGGATTCTTCGACCTTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGA
CCATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGC
GGCGAGGACTTCGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAA
GAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTCGAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGG
CGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGCTGTTCGTCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATC
GACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAG
GAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCA
GGACGC-AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2019

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC

TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2107

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGTCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2156

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2285

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2484

TGTTGCGCATCAATC-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCBCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2591

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC

GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2610

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2617

TGTTGCGCATCA--T-
CAACGAAGCCCAAAGCCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACG
GCAAGGAGCGCAACGTGCTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
AAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2631

TGTTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCGACGGCGGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGTCGTC
GAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACT
TCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCA
GCACGATTCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCAGAAGATGGACAAGCGCTC
CGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2639

TGCTGCGCATCA--T-CAACGAG--
CCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGC
GCAACGTGCTGA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTC
GAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGAC
TTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGC
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTGGG

>GE2708

GTTTGCCCATCA--
TCCAACGAAGCCAAACAACGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGAC
GCCAAGGAGCGAACGTGTTCA--TCTTCGACC-
TTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGG
TGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTC
GTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAAGACCTTTCGTC

GAGCCACCGCGCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGC
TGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGAC
TTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGC
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC-
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGC-TGGTAGG

- MPI

>GE0042

ACGCCCAAGT-
GAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGC-
GTGCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCGTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGA--CAGTGGTGT

>GE0232

ACGCCCAAGTGGAAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGGACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCGTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE0256

ACGCCCAAGTGGAAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCGTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGA--CAGTGGTGT

>GE321

ACGCCCAAGTGGAAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGGACGAC
CGGCCTTGC-
GTGCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGGGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCGTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTCCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE0494

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-

GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE0547

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATCCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-

GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE0637

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-

GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE0765

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-

GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA--CAGTGGTGT

>GE1119

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-

GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE1308

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-

GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT

GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA--CAGTGGTGT

>GE1485

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGAA-CCAGTGGTGT

>GE1488

ACGCCCAAGT-
GAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE1761

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE1800

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE1893

ACGCCCAAGT-
GAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA--CAGTGGTGT

>GE1905

ACGCCCAAGT-
GAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE1952

ACGCCCAAGTGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE2019

ACGCCCAAGTGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE2107

ACGCCCAAGTGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATCCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE2156

ACGCCCAAGTGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGTGTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGC
AGGTGCAATGCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGATTTTGCCTGTACCGCATGC
AGTACGACCACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACAATTGGG
CTGGGCTTCTGTCTGGAAGGGTTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE2285

ACGCCCAAGTGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATCCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT

GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GCCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE2484

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGT-ACAGTGGTGT

>GE2591

ACGCCCAAGTGGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA--CAGTGGTGT

>GE2610

ACGCCCAAGT-
GAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGACCCAGTGGTGT

>GE2617

ACGCCCAAGT-
GAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE2631

ACGCCCAAGGTGAAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

>GE2639

ACGCCCAAG-
GGTGGGATGTGCCACGCTGCTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGACCGGCCTTGT-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGACGCAGCACAGTGGCAAGTCCAGT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA--CCGTGGTGT

>GE2708

ACGCCCAAGGGTGAGGATGTGCCACGCTGGTGAGCATGCTGAAGTACAGCACGAC
CGGCCTTGC-
GTCCGCTCGCTTCGAGAAGAATTGCAGTGAGGATGCAGCACAGTGGCAGGTGCAAT
GCTACCAACCGCCGGCGCAGTTCCCCGACTTTTGCCTGTACCGCATGCAGTACGACC
ACACTTCTGGAAGCGGGACGACCTCCGTGACGCTGCCGACGATTGGGCTGGGCTTCT
GTCTGGAAGGGTCGGCTAGGGTGAACGGA-CCAGTGGTGT

- 6-gpd

>GE0042

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACACTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE0493

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
TTCGCTGTGAGCATAGCAATAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE0494

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCTGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACACGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTC-
TTCGCTGTGAGCATGGCAATAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE0574

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
TTCGCTGTGAGCATAGCAATAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE0637

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-CTCGCTGTGAGCATGGCAA-
AATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCCTTG

>GE0765

CTTGTCAACAC-
TTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCAGCTGTCCGTAC--
GGAAGAATCA-GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE0792

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTGCTTCGCTGTGAGCATGGCAATAATCTGTC
GATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCCTTG

>GE1485

CTTGTCAACAC--
TTCTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCAGCTGTCCGTAC--
GGAAGAATCA-GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTC-
TTCATCTCCTTG

>GE1488

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGCCACGCTGCAGGGACACCA
GATGTCCGTTC--
GGAAGAATCTAGCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGCACGTCATCACC
GGTAACGATACAGCCGTG-

TTCGCTGTGAGCATGGCAATAATCTGTTCGATAGGCCGAAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE1761

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE1893

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--
GGAAGAATCAGGCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE1905

CTTGTCAACAC-
TTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCAGCTGTCCGTAC--
GGAAGAATCA-GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE2156

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTC-
TTCGCTGTGAGCATGGCAATAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE2484

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCATGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTACGTGTAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCCCCGGTAACGATGAAGCCGTC-
TTCGCTGTGTGCATGGCAATAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TTG

>GE2639

CTTGTCAACACG-
TCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCAGCTGTCCGTAC--
GGAAGAGTCC-GCGTGTACATGGCGTTGATGCACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGGCGATAGGCCGGAGGAGTTTCTTTCATCTCC
TGG

>GE2708

CTTGTCAACACGTTTCGTAGCCGTGACGGCCAAAGACGTCACGCTGCAGGGACACCA
GCTGTCCGTAC--GGAAGAATCA-
GCGTGTACATGGCGTTGATGTACGCCAGGGAGGC-
AGTCATCACCGGTAACGATACAGCCGTG-
CTCGCTGTGAGCATGGCAACAATCTGTTCGATAGGCCGGAAGACCCTCCTTCATCTCC
TT