

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Detección, discriminación de especie y determinación de carga de  
parásitos del género *Leishmania sp.* directo de muestras clínicas**

**Julia Moreno Ortega**

**Tesis presentada como requisito parcial  
para optar al Grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con  
Orientación en Biología Molecular**

**Ciudad de Panamá, República de Panamá**

**2024**

Página de Aprobación

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

Programa de Maestría en Ciencias Biológicas con énfasis en Biología Molecular

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Código: -----

Estudiante: Julia Moreno Ortega

Título al que aspira: Magister en Ciencias Biológicas con énfasis en  
Biología Molecular

Tema de Tesis: Detección, discriminación de especie y cuantificación de carga  
de parásitos del género *Leishmania* sp, directo de muestras  
clínicas.

Nombre del asesor: Dr. Franklyn Samudio

Firma del asesor: -----

Firma del estudiante: -----

Aprobado por: -----

Coordinador del Programa

-----

Director de Vice rectoría de Investigación y Postgrado

Fecha: -----

## CONTENIDO

|                                                                                                                                                     | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMEN.....                                                                                                                                        | v      |
| DEDICATORIA .....                                                                                                                                   | vii    |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                                                                               | viii   |
| INDICE DE FIGURAS .....                                                                                                                             | ix     |
| INDICE DE CUADROS.....                                                                                                                              | xi     |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....                                                                                                              | xii    |
| 1.0 INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                               | 1      |
| 1.1. Generalidades de la leishmaniasis y del parásito que la causa.....                                                                             | 4      |
| 1.2. Taxonomía de <i>Leishmania</i> sp.....                                                                                                         | 5      |
| 1.3. Ciclo de vida del parásito.....                                                                                                                | 7      |
| 1.4. Morfología de <i>Leishmania</i> sp.....                                                                                                        | 9      |
| 1.5 Biología del vector .....                                                                                                                       | 10     |
| 1.6 Epidemiología y transmisión de la leishmaniasis .....                                                                                           | 12     |
| 1.7 Características clínicas de la leishmaniasis.....                                                                                               | 15     |
| 1.8 Métodos de diagnóstico y tratamientos.....                                                                                                      | 18     |
| 1.8.1 Diagnóstico .....                                                                                                                             | 18     |
| 1.8.2 Tratamiento .....                                                                                                                             | 19     |
| 1.9 Marcadores moleculares utilizados para la detección y cuantificación de<br><i>Leishmania</i> sp.....                                            | 21     |
| 2.0 JUSTIFICACIÓN .....                                                                                                                             | 25     |
| 3.0 OBJETIVOS y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....                                                                                                      | 26     |
| 3.1 Objetivo general: .....                                                                                                                         | 26     |
| 3.2 Objetivos específicos: .....                                                                                                                    | 26     |
| 3.3 Pregunta de investigación e hipótesis .....                                                                                                     | 27     |
| 4.0 METODOLOGÍA .....                                                                                                                               | 28     |
| 4.1 Extracción de ADN de las muestras de lesiones cutáneas .....                                                                                    | 29     |
| 4.2 PCR anidada o nested, PCR externa y PCR interna.....                                                                                            | 29     |
| 4.3 Límite de detección de los cebadores internos en la técnica de PCR anidada. ....                                                                | 30     |
| 4.4 Electroforesis en gel de agarosa.....                                                                                                           | 31     |
| 4.5 Purificación de amplicones .....                                                                                                                | 31     |
| 4.6 Reacción de Secuenciación, planeación y purificación del plato de secuenciación<br>.....                                                        | 32     |
| 4.7 Determinación de carga parasitaria e implementación de la metodología de PCR<br>en Tiempo Real (q PCR) para uso del blanco molecular kDNA ..... | 33     |

|     |                                                                                                                                                      |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.8 | Generación de la curva estándar. ....                                                                                                                | 36 |
| 4.9 | Preparación de la mezcla de reacción para realizar la PCR tiempo real (qPCR)..                                                                       | 37 |
| 5.0 | RESULTADOS .....                                                                                                                                     | 39 |
| 5.1 | Descripción de hallazgos de PCR anidada y secuenciación .....                                                                                        | 40 |
| 5.2 | Inferencia Bayesiana .....                                                                                                                           | 44 |
| 5.3 | Hallazgos, detección de polimorfismos y mutaciones no sinónimas que producen cambios en los aminoácidos resultantes en la secuencia en estudio ..... | 50 |
| 5.4 | Determinación de la distribución de las variables por el test de <i>Kolmogorov-Smirnov</i> .....                                                     | 55 |
| 5.5 | Pruebas de Hipótesis por el test U de <i>Mann y Whitney</i> .....                                                                                    | 57 |
| 5.6 | Resultados de la prueba de límite de detección de los cebadores internos para el gen HSP70, diseñados en el Instituto Conmemorativo Gorgas.....      | 63 |
| 6.0 | DISCUSIÓN.....                                                                                                                                       | 65 |
| 7.0 | CONCLUSIONES .....                                                                                                                                   | 75 |
| 8.0 | RECOMENDACIONES.....                                                                                                                                 | 77 |
| 9.0 | ANEXOS .....                                                                                                                                         | 78 |
|     | REFERENCIAS.....                                                                                                                                     | 92 |

## RESUMEN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad producida por parásitos intracelulares del género *Leishmania sp*, los cuales tienen una distribución endémica en las provincias de Bocas del Toro, Panamá Oeste, Veraguas, Coclé y Darién, provincias en las cuales se han reportado la presencia de *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*, así mismo, se considera a los insectos del género *Lutzomyia*, *Lu. panamensis*, *Lu. lephitelor*, *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi* como los vectores implicados en la transmisión de la enfermedad zoonótica que afecta entre 2000 a 3000 personas por año, según cifras de la Guía para el Abordaje Integral de la Leishmaniasis del año 2015 en Panamá, respaldado por el Ministerio de Salud (1,2).

Con la finalidad de desarrollar técnicas moleculares que permitan la discriminación de especie, detección y determinación de carga parasitaria directo de muestras clínicas se desarrolló un estudio observacional de tipo experimental en donde se reclutaron en un periodo de dos años 65 individuos que asistieron a la Unidad Clínica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) con sospecha de leishmaniasis y accedieron a participar voluntariamente en el estudio. Las muestras se obtuvieron mediante raspado directo de las lesiones cutáneas utilizando cepillos citológicos (*cytology brush*).

Para determinar las especies de *Leishmania* directo de las muestras clínicas se desarrolló una PCR anidada que amplificó un segmento de 1364 pb del gen HSP70 en el cromosoma 28, que codifica para una proteína de resistencia al antimonio. El segmento amplificado demostró tener un límite de detección de 100 fg equivalente a aproximadamente un parásito en condiciones experimentales. El segmento obtenido mediante esta metodología demostró tener suficientes polimorfismos de un simple nucleótido que facilitan la discriminación de especies del género *Leishmania* mediante amplificación por PCR y secuenciación seguido de análisis filogenético para la asignación de especie. La aplicación de esta técnica permitió la identificación de *L. panamensis* (83%), una especie del complejo guyanensis relacionada filogenéticamente a *L. shawi* (16%) y la determinación de la presencia de *L. braziliensis* (1%) en las muestras estudiadas.

Para la detección y determinación de carga parasitaria directo de muestras clínicas se implementó una técnica de PCR en tiempo real (qPCR) basada en sondas taqman que tiene como blanco molecular el ADN mitocondrial del parásito (kDNA). Esta metodología permitió la detección y estimación de la carga parasitaria de las muestras clínicas reunidas en el estudio utilizando un qPCR duplex que adicionalmente utiliza el gen de RNase P humano como control interno de amplificación y normalizador de la carga. La determinación de la carga nos permitió relacionar esta variable con otras variables como tamaño de la lesión, especie de *Leishmania*, sexo, edad y tiempo de evolución de la lesión.

El desarrollo e implementación de estas técnicas moleculares permitirá la detección, discriminación de especie y determinación de carga parasitaria directo de muestras clínicas lo que a su vez facilitará la realización de estudios futuros para evaluar la respuesta a las diferentes alternativas terapéuticas para la enfermedad de leishmaniasis.

## SUMMARY

Cutaneous leishmaniasis is a disease caused by intracellular parasites of the genus *Leishmania sp*, which has an endemic distribution in the Panamanian provinces of Bocas del Toro, Panama Oeste, Veraguas, Coclé and Darién, where it have been reported the presence of *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. amazonensis*, and *L. mexicana*. At the same time, insects from *Lutzomyia* gender such as *Lu. panamensis*, *Lu. lephytelor*, *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi*, phlebotomins are considered the vectors linked to the transmission of this zoonotic disease (1) that has affected about 2000-3000 people per year according to figures from the *Guía para el Abordaje Integral de la Leishmaniasis en Panamá* (2)

In order to develop molecular techniques that allow species discrimination, parasite detection and determination of parasite load direct from clinical samples we carried out an observational and experimental study in which it was enrolled 65 individuals that came to the clinical unit of the Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud to ruled out leishmaniasis and agreed to participate in the study. Clinical samples were obtained by direct collection from cutaneous lesion using a cytology brush.

To determine the *Leishmania* species directly from the clinical samples, a nested PCR was developed that amplifies a 1364 bp segment of the HSP70 gene on chromosome 28, which codes for an antimony resistance protein. The amplified segment was shown to have a detection limit of 100 phentograms equivalent to approximately one parasite under experimental conditions. The segment obtained through this methodology demonstrated to have sufficient single nucleotide polymorphisms that facilitate the discrimination of species of the *Leishmania* genus through PCR amplification and sequencing followed by phylogenetic análisis for species assignment. The application of this technique allowed the identification of *L. panamensis* (83%), a species of the *guyanensis* complex phylogenetically related to *L. shawi* (16%) and the determination of the presence of *L. braziliensis* in the studied samples.

In order to detect and determinate parasites load direct from clinical samples, we implemented a taqman real time PCR based upon the amplification of the mitochondrial DNA of *Leishmania* parasites (kDNA). This methodology allowed us to detect *Leishmania* parasites and assess parasite load in the samples obtained in this study using a multiplex qPCR that also amplify the human RNase P gene as internal control and parasite load normalizer. The determination of parasite load aided us to establish the relation between parasite load and other variables such as lesion size, sex, age, *Leishmania* species and time of evolution of cutaneous lesions.

Our nested PCR method combined with standardized Real-Time qPCR strengthens the detection and quantification of *Leishmania* parasite load directly from clinical samples and the capacity to develop future studies to monitor response to leishmaniasis therapy in Panama.

## **DEDICATORIA**

*A Octavio Moreno, mi querido papá,  
un hombre excepcional,  
quién me inspiró a empezar esta aventura, pero la vida  
no le permitió acompañarme hasta el final ....*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto ha sido realizado gracias a la gestión y apoyo del personal científico del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) y con financiamiento procedente del Ministerio de Economía y Finanzas de la República de Panamá.

Mi especial agradecimiento a mi asesor, el Dr. Franklyn Samudio, quien con entusiasmo y dedicación transmite sus conocimientos y experiencia procurando avances en la investigación contra las enfermedades parasitarias en Panamá, en especial la leishmaniasis.

Mi agradecimiento al personal docente y administrativo del programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad de Panamá, quienes hicieron posible nuestra formación académica de post grado.

Mi agradecimiento al Departamento de Parasitología del ICGES, lugar donde se realizó todo el trabajo técnico para esta investigación. Muchísimas gracias al Dr. Azael Saldaña y al Dr. José Calzada, así como a todo el personal de ese departamento por su cordial ayuda.

Igualmente, mi agradecimiento a mis compañeros de maestría, entre risas y lágrimas, ha sido un gusto compartir con ustedes esta experiencia académica.



## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                              | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i> sp. ....                                                    | 6      |
| Figura 2. Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i> sp. ....                                              | 8      |
| Figura 3. Forma promastigote del parásito. ....                                                              | 8      |
| Figura 4. Forma amastigote del parásito. ....                                                                | 8      |
| Figura 5. Flebótomo vector de leishmaniasis. ....                                                            | 11     |
| Figura 6. Países endémicos de América mostrando proporción de casos segun forma clínica en el año 2020. .... | 12.    |
| Figura 7. Mapa de Panamá mostrando sitios de transmisión de leishmaniasis .....                              | 14     |
| Figura 8. Leishmaniasis cutánea difusa.....                                                                  | 17     |
| Figura 9. Leishmaniasis cutánea diseminada.....                                                              | 17     |
| Figura 10. Lesión única de leishmaniasis.....                                                                | 17     |
| Figura 11. Minicírculo de KDNA (kDNA) de <i>Leishmania</i> sp. y sus componentes. ....                       | 24     |
| Figura 12. Kit con perlas magnéticas para purificación del ADN de amplicones.....                            | 32     |
| Figura 13. Curva estándar de <i>Leishmania panamensis</i> CP008.....                                         | 36     |
| Figura 14. Curva estándar de <i>Leishmania panamensis</i> y de ADN humano.....                               | 36     |
| Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa para el gen HSP70.....                                           | 40     |
| Figura16. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR anidada para el gen HSP70.....                          | 40     |
| Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones purificados.....                                   | 41     |
| Figura 18. Árbol filogenético bayesiano basado en un segmento interno del<br>gen HSP70.....                  | 46     |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19. Árbol filogenético Bayesiano basado en las secuencias de proteínas<br>codificadas por el segmento del gen HSP70 en estudio..... | 47 |
| Figura 20. Tamaño de la lesión en individuos con diferente carga parasitaria.....                                                          | 62 |
| Figura 21. Carga parasitaria en individuos de ambos sexos.....                                                                             | 62 |
| Figura 22. Tamaño de la lesión con respecto al tiempo de evolución de la lesión.....                                                       | 63 |
| Figura 23. Cepa 566. <i>Leishmania braziliensis</i> . Estudio de sensibilidad para los<br>cebadores internos HSP70.....                    | 64 |
| Figura 24. Cepa <i>Leishmania panamensis</i> . Estudio de sensibilidad para los cebadores<br>internos HSP70.....                           | 64 |
| Figura 25. Cepa 565. <i>Leishmania guyanensis</i> . Estudio de sensibilidad para los cebadores<br>internos HSP70.....                      | 64 |

## INDICE DE CUADROS

|                                                                                                                  | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Cuadro 1. Cepas de referencia utilizadas en este estudio.....                                                    | 34     |
| Cuadro 2. Concentración de ADN de los amplicones purificados.....                                                | 42     |
| Cuadro 3. Secuencias de referencia utilizadas para alineamiento.....                                             | 45     |
| Cuadro 4. Identificación de especies de <i>Leishmania sp.</i> en las heridas cutáneas.....                       | 48     |
| Cuadro 5. Determinación de la carga parasitaria de <i>Leishmania sp</i> en las heridas cutáneas<br>por qPCR..... | 53     |

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                   |                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|
| ABI.....          | formato de archivo binario                                    |
| BioEstat 5.3..... | programa para análisis estadístico                            |
| BLAST.....        | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                      |
| BDT.....          | <i>Big Dye Terminator</i>                                     |
| BHI.....          | medio de cultivo Cerebro Corazón                              |
| °C.....           | grado centígrado                                              |
| CPB.....          | cisteína proteasa b                                           |
| Ct.....           | umbral de ciclo                                               |
| DNA.....          | ácido desoxiribonucleico                                      |
| DNAasa.....       | enzima que destruye el DNA                                    |
| DNTP's .....      | deoxinucleósido – triphosphate                                |
| fg.....           | fentogramo                                                    |
| Fw.....           | <i>Forward</i> (se refiere a cebador directo)                 |
| GPI.....          | glicosyphosphatidylinositol                                   |
| GP63.....         | glicoproteína 63                                              |
| G6PD.....         | glucosa-6-phosphatodehydrogenasa                              |
| HSP70.....        | proteína de choque térmico 70 KDa                             |
| ICGES.....        | <i>Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud</i> |
| IB.....           | método filogenético de Inferencia Bayesiana                   |
| IFN-y.....        | Interferon                                                    |
| ITS 1.....        | espaciador transcrito interno                                 |
| Kb.....           | kilobase                                                      |
| KDNA.....         | DNA del cinetoplasto                                          |
| mA.....           | miliamperio                                                   |
| ml.....           | mililitro                                                     |
| m RNA.....        | ácido ribonucleico mensajero                                  |
| NCBI.....         | <i>National Center for Biotechnological Information</i>       |

|                 |                                                      |
|-----------------|------------------------------------------------------|
| Ng.....         | nanogramo                                            |
| NNN.....        | medio de cultivo bifásico de Novey, McNeal y Nicolle |
| OMS.....        | Organización Mundial de la Salud                     |
| OPS.....        | Organización Panamericana de la salud                |
| pb.....         | pares de bases                                       |
| PCR.....        | Reacción en Cadena de la Polimerasa                  |
| pg.....         | picogramo                                            |
| q PCR.....      | PCR en tiempo real                                   |
| rDNA.....       | DNA ribosomal                                        |
| RFLP.....       | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>      |
| rpm.....        | revoluciones por minuto                              |
| RNA.....        | Ácido Ribonucleico                                   |
| Rv.....         | <i>reverse</i> (se refiere a cebador reverso)        |
| RNAsa.....      | enzima que destruye el RNA                           |
| RNAsaP.....     | gen de control interno de la reacción                |
| SAM.....        | extensión de archivo de bioinformática               |
| SEQ.....        | extensión de archivo de bioinformática               |
| SL RNA .....    | RNA líder empalmado                                  |
| SNP's.....      | polimorfismo de un solo nucleotido                   |
| 18s rDNA.....   | subunidad pequeña 18s ribosomal                      |
| SYBR green..... | colorante para cuantificación de ADN                 |
| TBE.....        | buffer Tris-Borate-Edta                              |
| UGENE.....      | programa informático UNIPRO GENE                     |
| μl.....         | microlitro                                           |
| V.....          | voltios                                              |
| VIH.....        | virus de de la inmunodeficiencia humana              |

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una infección producida por un protozooario del género *Leishmania* sp. el cual es transmitido por la picadura de un pequeño díptero hematófago de la familia *Psychodidae*, lo que puede causar leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea o leishmaniasis mucocutánea. La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que puede comprometer la piel, las mucosas y las vísceras y donde la interacción entre reservorios y parásitos es compleja, multifactorial, circunstancial y dinámica por lo que constituye una unidad biológica que puede variar en función de los cambios del medio ambiente (3,4).

En la India antes del año 1900, la enfermedad conocida como *kala azar* (hoy día conocida como leishmaniasis visceral) se consideró en aquella época como una forma virulenta de malaria, y no fue hasta 1903 que el investigador Leishman W. B describió el protozooario causante de la enfermedad, el cual fue recuperado por un frotis con tinción tipo *Romanowsky*, del bazo de un hombre que murió por esa supuesta virulenta malaria (128). La búsqueda del vector se realizó por muchos años, hasta que en 1921, los hermanos Edouard y Etienne Sergent demostraron la existencia del flebótomo que estaría implicado en la transmisión de la enfermedad (5).

Más del 90% de los casos globales de leishmania visceral ocurren en la India, Bangladesh, Sudán, Etiopía y Brazil. En América Latina la leishmaniasis visceral es causada por la especie *Leishmania infantum* o *Leishmania chagasi* y los vectores asociados son *Lutzomya longipalpis* y *Lutzomya evansi*, y la mayoría de los casos reportados están en Brazil, Paraguay, Colombia, Argentina y México. La leishmaniasis tegumentaria (cutánea o mucocutánea) se encuentra más ampliamente distribuida que la leishmaniasis visceral y ocurre en las regiones de América, cuenca del Mediterráneo y Asia Occidental. A nivel global los 10 países con mayoría de casos de leishmaniasis tegumentaria son Afganistán, Argelia, Colombia, Brazil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del Norte, Costa Rica y Perú (6,7).

La identificación del parásito que causa la leishmaniasis se hacía tradicionalmente por métodos parasitológicos, ya sea observando los frotis teñidos de las lesiones cutáneas,

cultivando los parásitos en medios de cultivo o en pruebas con base en la respuesta inmune de las personas como la prueba de Montenegro (8,9).

Durante los años 90 se utilizaban perfiles de isoenzimas para realizar fonogramas que ayudaban en la taxonomía de los parásitos del género *Leishmania* (10). Sin embargo, con el desarrollo de las técnicas de la biología molecular se fue recomendando e implementando cada vez más el uso de esta herramienta demostrando una mayor sensibilidad y precisión en la detección del parásito, comparada a los medios tradicionales de la época (11,12). La leishmaniasis tegumentaria es una enfermedad condicionada a regiones montañosas y a mamíferos reservorios silvestres que portan y mantienen la estructura poblacional del parásito que puede de una u otra forma alcanzar los ambientes domésticos/peridomésticos. La distribución geográfica a través de los escenarios del cambio climático global actual proporciona una nueva panorámica sobre la interacción de las especies, los vectores y los reservorios del parásito y su influencia en la problemática corriente de la enfermedad (13).

Dentro de este escenario global, las condiciones climáticas se han relacionado con la abundancia del vector y a su vez con la dinámica de los ciclos de leishmaniasis tegumentaria en Panamá (14). No existen reportes en Panamá de casos de leishmaniasis visceral aunque *Lutzomya longipalpis*, principal vector de leishmaniasis visceral en América ha sido definido como una especie críptica en Altos de Campana y la isla de Bona en Panamá (2,15) En cuanto a informes de leishmaniasis mucocutánea, los reportes describen afectaciones leves de la mucosa y en bajos porcentajes entre los pacientes afectados por leishmaniasis en Panamá (16).

En Panamá Este, a lo largo de la carretera Interamericana encontramos reportes de leishmaniasis en comunidades como San Miguel, Tortí, Santa Fé, Boca de Sábalo y Metetí (1). En Panamá Oeste, está el caso particular de Trinidad de las Minas donde la alta incidencia del vector se asocia a la alta incidencia y endemidad de leishmaniasis cutánea en ese corregimiento del distrito de Capira (17,18) La deforestación y el crecimiento de la población que migra a regiones selváticas, podrían ser factores significativos del aumento de la incidencia de casos de leishmaniasis en Panamá durante los últimos 30 años (19).

Así pues, se hace necesario promover esfuerzos conjuntos entre el gobierno, la población y las instituciones de salud encaminado a la educación ambiental, el control de vectores, la detección eficiente del parásito y tratamientos adecuados, en un abordaje integral para disminuir las afectaciones a la población en áreas geográficas vulnerables.

Por otro lado, generar información, investigación y métodos estandarizados y reproducibles en la identificación, detección y caracterización molecular del parásito resulta esencial para el abordaje integral del problema y coloca a Panamá y a sus instituciones de salud en el camino hacia la solución de la problemática. Como una contribución en ese sentido, se estandarizó una PCR anidada para un segmento interno del gen HSP70(*Heat Shock Protein*), gen que codifica para una proteína de 657 aminoácidos de la cual se sugiere que le confiere al parásito resistencia al antimonio pentavalente, el principio activo en los medicamentos contra la leishmaniasis (20). Dicho gen se encuentra en el cromosoma 28 del genoma del parásito. Se utilizaron para esa PCR anidada, cebadores internos especialmente diseñados para los fines de este estudio en el departamento de Investigación en Parasitología del *Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud*. El blanco molecular que se utilizó para identificar las diferentes especies de *Leishmania* sp. fue un segmento de 1364 pb del gen HSP70, el cual se amplificó mediante una PCR anidada. Esta PCR anidada nos permitió obtener la secuencia consenso del parásito, para determinar la especie de *Leishmania* proveniente de la lesión cutánea de cada individuo que decidió participar voluntariamente en este estudio.

Además, se estandarizó un método qPCR, utilizando el biomarcador kDNA cuya molécula posee un gran número de copias por genoma mitocondrial dentro de la cual encontramos una región corta conservada de 784 pb lo que hace este blanco molecular ideal para amplificar debido a su alta sensibilidad y sus regiones conservadas. El ensayo duplex llevó un control interno de *RNAseP* y utilizamos sondas *Taqman* para la evaluación de la cantidad de copias del gen kDNA y cuantificar así, la carga parasitaria en las lesiones cutáneas de las personas.

Nuestra población de estudio corresponde a muestras de las lesiones cutáneas, tomadas adecuadamente con un cepillo citológico (*citology brush*) a personas de diferentes lugares



de Panamá, que acudieron voluntariamente al *Instituto Conmemorativo Gorgas* por sospecha de leishmaniasis. Las colectas se realizaron entre enero del 2019 a junio del 2021 y nuestra metodología corresponde con un estudio observacional de tipo experimental en el cual se identificaron las especies de *Leishmania* sp. obtenidas de las lesiones cutáneas y se cuantificó la carga parasitaria expresada como DNA equivalente parásitos por microgramos de células humanas.

### **1.1. Generalidades de la leishmaniasis y del parásito que la causa.**

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad producida por parásitos intracelulares del género *Leishmania* sp, los cuales tienen una distribución endémica en las provincias de Bocas del Toro, Panamá Oeste, Veraguas, Panamá, Coclé y Darién, produciendo leishmaniasis cutánea a más de 33000 personas en todo el territorio panameño contemplando solamente el período de tiempo entre 2000 y 2014 y considerando, además, un alto grado de subregistro (2).

La leishmaniasis cutánea es un problema emergente en la salud pública y en Panamá se limita a la detección y tratamiento de los casos humanos, donde un número significativo de estos casos ocurre en áreas rurales donde el diagnóstico de laboratorio es limitado (21). La leishmaniasis afecta principalmente a países de bajos ingresos en regiones tropicales y subtropicales del mundo para lo cual se necesitan métodos simples y de bajo costo para detectar especies patógenas (22). La enfermedad ocurre como resultado de la interacción compleja, multifactorial, circunstancial y dinámica entre animales que funcionan como reservorios del parásito, el insecto vector y los hospederos humanos (4).

El hallazgo más antiguo de interacción entre el parásito y el flebotomino se remonta a la era Cretácica, pues en Birmania se rescató la evidencia de un ámbar de aproximadamente 100 millones de años, donde se encontró en la probóscide de un flebotomíneo una especie fósil de *Leishmania* llamada *Paleoleishmania proterus* (23). En República Dominicana, se encontró otro registro fósil en ámbar de 10-30 millones de años atrás, en el cual había un ejemplar de la extinta *Lutzomya adiketi* parasitada con la especie *Paleoleishmania neotropicum*, y quizás, los hospederos de esta especie de *Leishmania* fueron mamíferos primitivos (24).

En escritos antiguos de Europa que datan de 2500 años A.C se encontraron descripciones de lesiones compatibles con leishmaniasis. En América, las evidencias más antiguas de la enfermedad datan de hace 2000 años A.C, tiempo que se le adjudica a la momia de una niña de aproximadamente 6 años, encontrada en Perú, con lesiones compatibles con la enfermedad. Durante la colonización de América, los conquistadores detallaron hallazgos de lesiones en la piel en los trabajadores de plantaciones de coca en los Andes Peruanos (25,26).

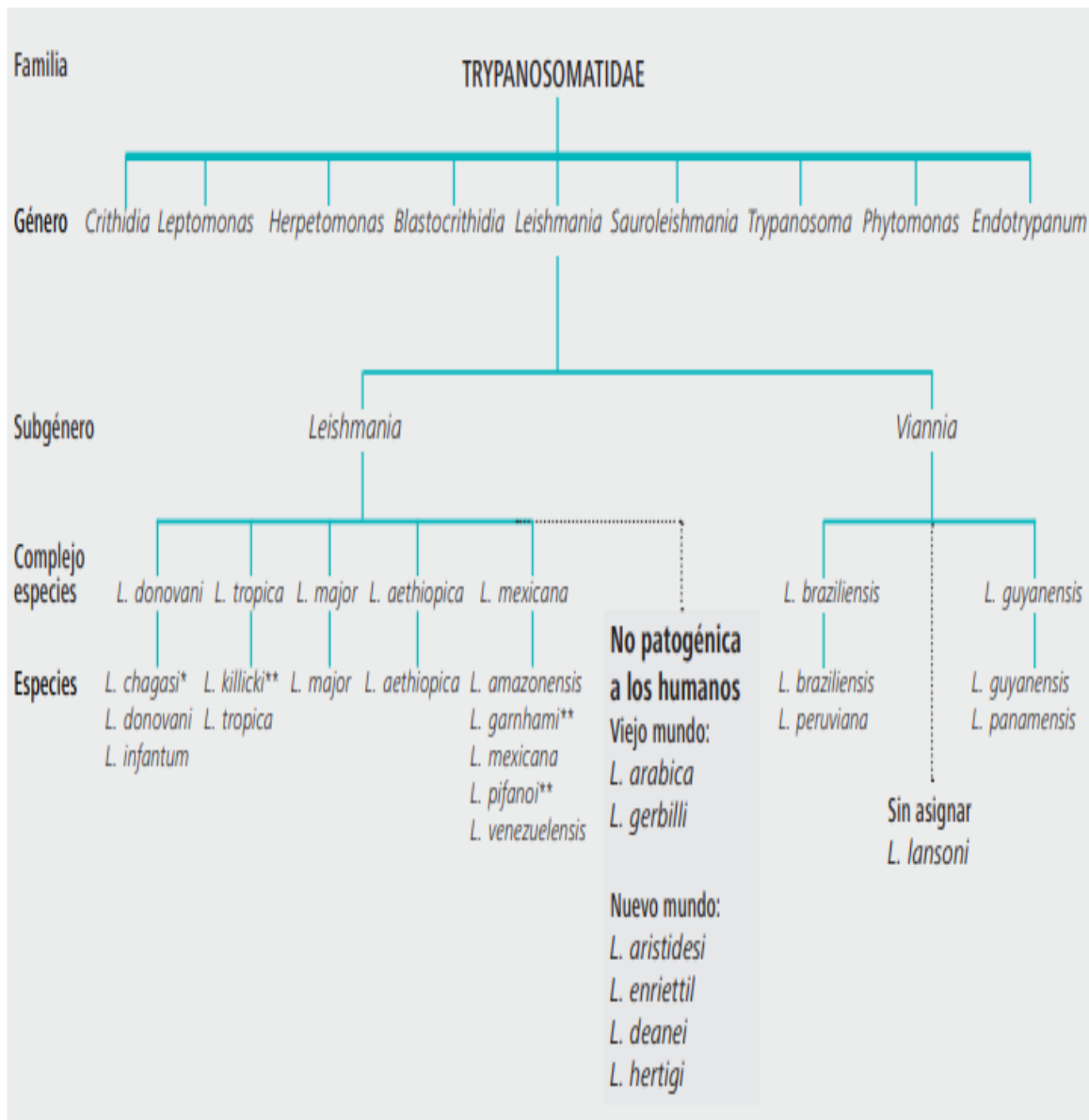
En cuanto a la leishmaniasis visceral, se piensa que tiene un origen muy antiguo pero los primeros reportes se remontan al siglo XIX en India (26). En América, los primeros reportes de leishmaniasis visceral datan de principios del siglo XX, específicamente en 1934, cuando se encontró el parásito *Leishmania sp* en el hígado de algunas personas que se pensaba habían muerto de fiebre amarilla en una localidad rural de Brazil (27).

La leishmaniasis está catalogada como una de las diez enfermedades desatendidas más importantes en el mundo, al igual que la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis (28).

## **1.2. Taxonomía de *Leishmania sp.***

*Leishmania sp.* es un parásito del reino Protozoa o Protista, phylum *Euglenozoa*, clase *Kinetoplastea* o *Cinetoplastea*, orden *Trypanosomatida*, familia *Trypanosomatidae*, subfamilia *Leishmanilinae*, género *Leishmania*, donde este género se subdivide a su vez en los subgéneros *L. Leishmania* y *L. Viannia* (25,29). Inicialmente la creación y descripción del género *Leishmania sp.* fue realizada por Ross en 1903, pero luego se utilizaron criterios tales como la biología del flebótomo, manifestación clínica de la enfermedad, factores epidemiológicos, lugar donde se aisló el parásito por primera vez, etc, para determinar el nombre de subgéneros y especies. La creación del subgénero *Leishmania* y *Viannia* se determinó de acuerdo al lugar de desarrollo del parásito en el intestino del vector, así pues, el subgénero *Leishmania* se desarrolla en el intestino anterior del vector y el subgénero *Viannia* se desarrolla en el intestino posterior del flebótomo vector (27,30).

Las especies del género *Leishmania* que pueden ser patógenas para el hombre se encuentran en dos subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Viannia*) (ver figura 1), siendo este último subgénero con su especie *Leishmania panamensis* la que causa predominantemente leishmaniasis tegumentaria en Mesoamérica y Sudamérica, incluyendo Panamá (31).



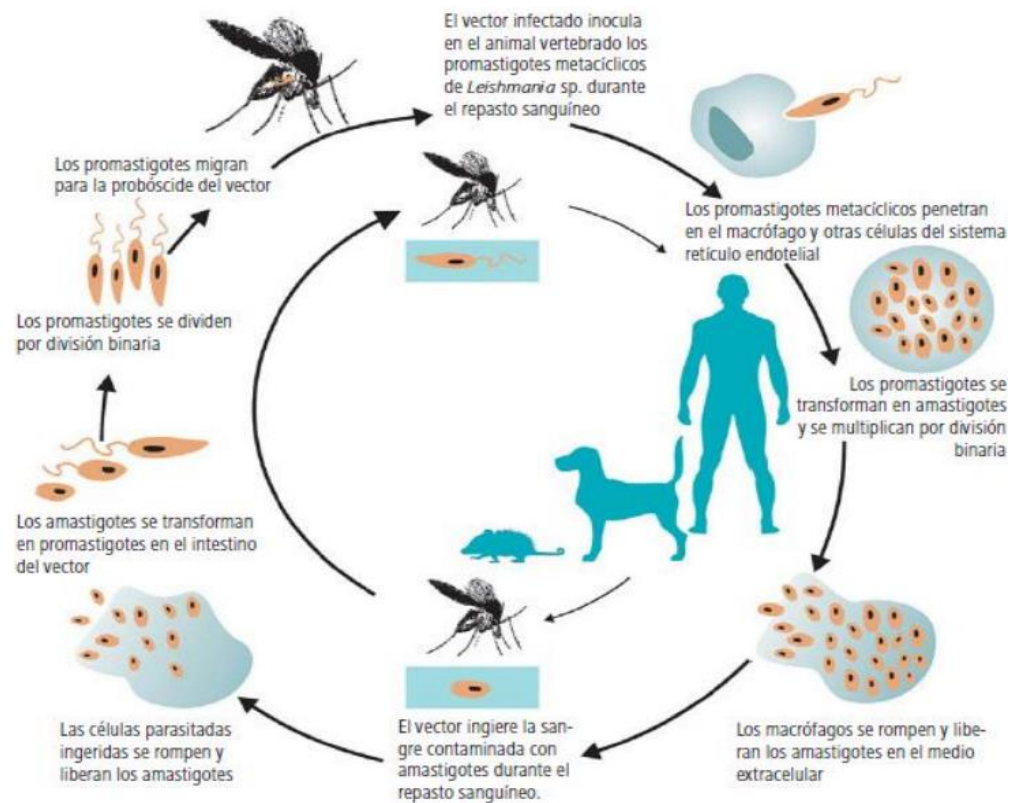
**Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania* sp.**

Fuente: Manual de Procedimientos para la Vigilancia y el Control de la Leishmaniasis en la Región de las Américas. Organización Panamericana de la Salud- Organización Mundial de la Salud, 2019.

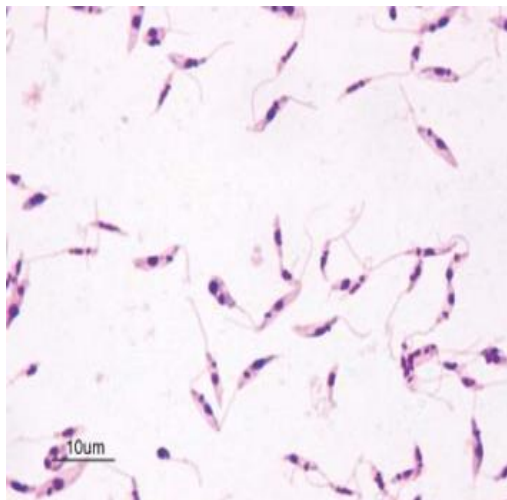
### 1.3. Ciclo de vida del parásito

Los vectores naturales del parásito son las hembras de los flebótomos. Existen unas 70 especies de animales que funcionan como reservorios de las especies de *Leishmania* incluyendo roedores, perros y otros mamíferos y existen unas 20 especies de *Leishmania* que pueden actuar como agentes etiológicos de la enfermedad (32). Existe una interacción con barreras para el desarrollo del parásito dentro del intestino medio del insecto vector y adaptaciones moleculares que le permiten al parásito proseguir su desarrollo. El insecto vector se infecta cuando obtiene la sangre de un mamífero infectado con el parásito. El vector al chupar la sangre del mamífero infectado, le inyecta una proteína vasodilatadora conocida como *maxodilan* la cual reduce el calcio intracelular en el huésped en el sitio de la herida causando dilatación arterial. En el vector, el parásito evoluciona su etapa infecciosa por un período de 7 a 15 días y se transforma a la fase metacíclica flagelada. El parásito se transforma a la fase promastigote metacíclico con un flagelo largo y móvil en el tracto intestinal del vector, mediada por moléculas galectinas y lipofosfoglicina del vector. El parásito se protege de la actividad proteolítica en el intestino del vector por la secreción de fosfolípidos en su superficie celular. El flagelo le confiere al parásito motilidad, lo que le permite colonizar la válvula estomodal del vector flebótomo y de esta manera migrar desde el intestino hacia las piezas bucales (33,34).

La etapa promastigote metacíclica se inyecta al huésped mamífero junto con las secreciones salivales del flebótomo (ver figura 2). Después de la inyección de los promastigotes hay una infiltración de neutrófilos en la piel. Los promastigotes en la matriz extracelular del sitio de la picadura se adhieren allí ayudados por el lipofosfoglicano. Los promastigotes se unen a los glóbulos rojos o plaquetas y quedan engullidos por células dendríticas o macrófagos. *Leishmania* sp. es capaz de evitar la digestión de los macrófagos y diferenciarse en amastigotes para comenzar la fase intracelular de su ciclo de vida. Los amastigotes se dividen dentro de su célula huésped y pueden permanecer en el sitio de inyección dando como resultado la leishmaniasis cutánea o pueden ser llevados a los tejidos reticuloendoteliales dando lugar a leishmaniasis mucocutánea o visceral respectivamente (35).



**Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Leishmania* sp.** Imagen tomada del Manual de Procedimientos Para La Vigilancia y Control de Las Leishmaniasis, OPS/OMS, 2019.



**Figura 3. Forma promastigote del parásito.**



**Figura 4. Forma amastigote del parásito.**

Imágenes tomadas del Manual de Procedimientos Para La Vigilancia y Control de Las Leishmaniasis, OPS/OMS, 2019.

#### 1.4. Morfología de *Leishmania sp*

Una célula del parásito *Leishmania* tiene dos formas principales, la forma amastigote en el huésped mamífero y la forma promastigote en el vector flebótomo. Las células con forma amastigote y promastigote se ven diferentes, pero tienen una disposición básica donde el cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo y existe un flagelo que se extiende desde el cuerpo basal y le confiere motilidad al parásito contribuyendo a una transmisión exitosa del parásito hacia el huésped mamífero. La división de los promastigotes en los flebótomos se realiza principalmente por fisión binaria, primeramente, se produce el flagelo, luego hay una división del cinetoplasto y una posterior separación de dos individuos mediante una fisión longitudinal. En la parte anterior del intestino del flebótomo la forma morfológica más común es el paramastigote, que se diferencia del promastigote por tener el cinetoplasto al lado del núcleo. Existen relaciones específicas entre el vector y el parásito por lo cual algunas especies de flebótomos pueden transmitir una o solo un número limitado de especies de *Leishmanias* (34,36).

La forma promastigote se observa en el intestino del vector como un organismo móvil y delgado que mide de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud y tiene un único flagelo anterior (ver figura 3). La forma amastigote es pequeña (ver figura 4), redonda u ovalada, incoloro y con un citoplasma homogéneo y mide aproximadamente 3-5  $\mu\text{m}$ , carece de flagelo y se observa solamente en los macrófagos de huéspedes vertebrados infectados (34).

## 1.5 Biología del Vector

Los flebótomos son pequeños dípteros hematófagos (Diptera: *Psychodidae*) con importancia en salud pública como vectores de leishmaniasis (ver figura 5). El grupo está compuesto de seis géneros, pero de esos seis géneros pertenecientes a la subfamilia *Phlebotomus*, solo *Lutzomya* y *Phlebotomus* son vectores de leishmaniasis. *Lutzomya* sp. se encuentra restringido al Nuevo Mundo donde existen diversas especies descritas mientras que *Phlebotomus* se encuentra en el Viejo Mundo. En el Nuevo Mundo, *Lutzomya longipalpis* es considerado como el principal vector de la leishmaniasis visceral (37).

El insecto se caracteriza por la venación del ala y la presencia de densos pelos en las alas y el tórax. Tienen una metamorfosis completa pasando por el estadio de huevo, larva, pupa y adulto. Los adultos miden menos de 5 milímetros de longitud, tiene patas largas, alas lanceoladas, tórax giboso y cuerpo revestido de pelos largos y finos (4).

Los adultos de ambos sexos necesitan carbohidratos para obtener energía, pueden ingerir néctar de flores, y otros jugos de plantas. Las hembras requieren sangre para madurar sus huevos entre los ciclos de oviposición. Algunas especies se alimentan de murciélagos y roedores, armadillos, otras pueden alimentarse de reptiles y anfibios y otras son oportunistas y se alimentan de una variedad de mamíferos dependiendo de la disponibilidad. Las especies antropofílicas que se alimentan de sangre humana tienen actividad al anochecer y durante la noche, cuando son atraídos por las luces de las casas. Su rango de vuelo medio es de 57 metros y sus lugares de descanso varían según la disponibilidad del microhábitat, cantidad de humedad en el ambiente y la especie de flebótomo. Pueden encontrarse en grietas de rocas, cuevas, suelo del bosque, envés de las hojas de pequeños arbustos y plantas, tronco de árboles y nidos de mamíferos. Las especies antropofílicas que entran a los hogares pueden reposar en paredes interiores. Las piezas bucales de los flebótomos hembras producen un sonido agudo y dolor cuando perfora la piel y los componentes salivales antigénicos se suman a la irritación y el rascado agresivo desgasta la piel. Los flebótomos del género *Lutzomya* son insectos de picadura nocturna en zonas neotropicales desde zonas de bosques de tierras bajas en la Amazonía hasta sitios sin árboles en las montañas de los Andes. Su notoriedad como vectores de enfermedades es debido a sus hábitos de picaduras a los humanos y la ocurrencia de transmisión de patógenos en especial de *Leishmania* sp. (38).

En Panamá estos insectos son conocidos como “chitras” y las principales especies identificadas como vectores de leishmaniasis son *Lutzomya ylephiletor*, *Lutzomya sanguinaria*, *Lutzomya panamensis*, *Lutzomya trapidoi*, y *Lutzomya gomezi* entre las 74 especies que se encuentran distribuidas en zonas boscosas del territorio panameño (39,40).

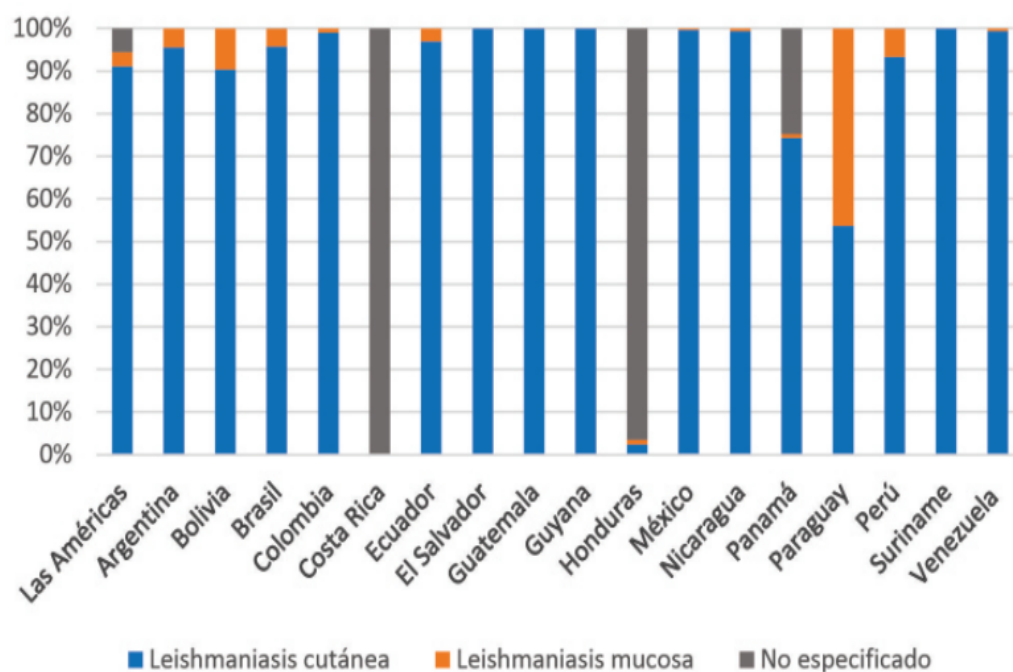


**Figura 5. Flebotomo vector de leishmaniasis.** Foto CDC/ Frank Collins. James Gattany. Imagen disponible en internet.



## 1.6 Epidemiología y Transmisión de la Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que ocurre en diferentes ambientes desde desiertos y estepas semiáridas del Viejo Mundo hasta bosques tropicales lluviosos del Nuevo Mundo. Es una enfermedad endémica en 82 países alrededor del mundo, 10 desarrollados y 72 en vías de desarrollo (41). Por otro lado, la OMS reporta endemicidad de la leishmaniasis en 102 países distribuidos en cinco continentes. En las Américas, la forma de promastigote es transmitida a los mamíferos susceptibles, entre ellos los humanos, a través de la picadura de insectos vectores del género *Lutzomya*. Existen registros de casos humanos de leishmaniasis desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, exceptuando a Chile, y donde Uruguay registró su primer caso humano en diciembre de 2018. Durante el período de 2001 a 2017 se registraron 940.396 casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea con promedio anual de 55,317 casos (4).



**Figura 6. Países endémicos de América mostrando proporción de casos según forma clínica en el año 2020.** Imagen tomada de: Informe Epidemiológico de las Américas N° 10. OPS/OMS 2021

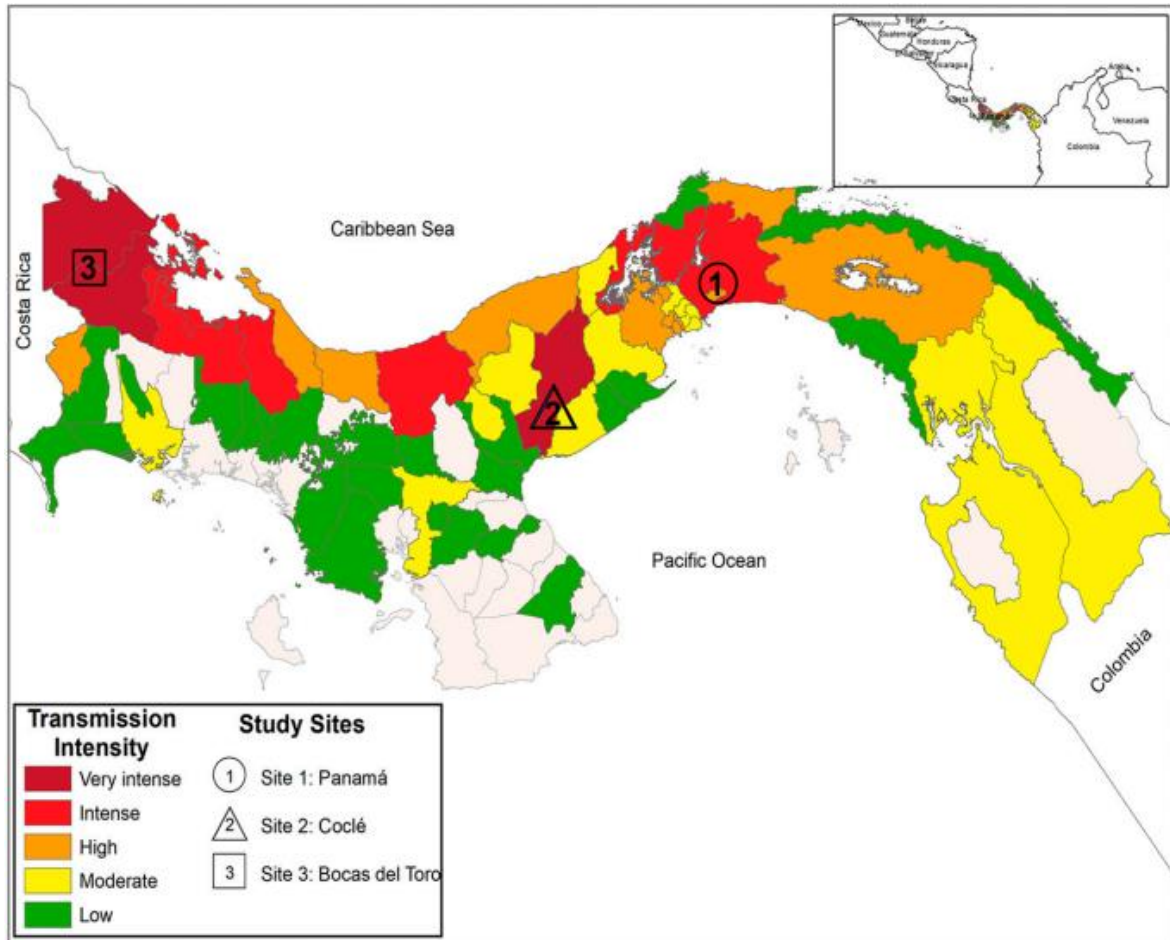
El país que ha registrado el mayor número de casos es Brazil (17,526), seguido por Colombia (7,764) y Perú (6,631) (ver figura 6). Se reporta que la enfermedad también es endémica y de importancia epidemiológica en Nicaragua (4,343), Venezuela (2,326), Bolivia (2,283), Costa Rica (2,224), Honduras (1,854), Panamá (ver figura 7), Ecuador, México, Guatemala, Argentina y Paraguay (4).

Se ha correlacionado significativamente la abundancia de vectores de la enfermedad con la precipitación y la humedad (42). Los factores ambientales, microambientales y los aspectos demográficos, influencia de factores estacionales y climáticos, calentamiento global y migraciones de población son aspectos fundamentales en la epidemiología de la enfermedad (43).

Además de *Leishmania panamensis*, se ha reportado en Panamá la presencia de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania colombiensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* y *L. naiffi*, a la vez que se considera a *Lu. panamensis*, *Lu. lephitelor*, *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, flebotominos del género *Lutzomia* como los vectores predominantes en la transmisión de la leishmaniasis en Panamá (1,44). De ellos, se ha considerado a *Lu. trapidoi* y a *Lu. gomezi* como los transmisores más abundantes y probables de leishmaniasis en Panamá (45,46). Nueve mamíferos silvestres del territorio panameño se consideran reservorios del parásito, entre los cuales el perezoso de dos uñas *Choloepus hoffmanni* se clasifica como uno de los hospederos principales (18,47).

El parásito se desarrolla de la forma amastigote hacia la forma de promastigote dentro del tubo digestivo del flebótomo vector, después que este se alimenta de sangre infectada. El vector a su vez transmite los promastigotes al alimentarse de la sangre de una persona sana. Componentes en la saliva del vector y secreciones del parásito son factores que condicionan o facilitan el éxito y el establecimiento del parásito en el huésped (48). *Leishmania* es un parásito intracelular obligado. Después de ser inoculado en la piel, los parásitos de *Leishmania* se localizan en los macrófagos. Si se multiplican en los macrófagos de la piel provocan leishmaniasis cutánea, si se multiplican en los macrófagos del hígado, causan leishmaniasis visceral dando lugar a los síntomas clínicos (49).

La leishmaniasis visceral es una enfermedad común en países menos desarrollados, con hasta 500,000 casos cada año y desde que apareció el virus VIH, la coinfección con leishmaniasis visceral es también una enfermedad preocupante en el suroeste de Europa, en España, Francia, Italia y Portugal ya que el VIH puede reactivar la enfermedad latente, aumentar los niveles de transmisión de humano a humano y facilitar la transmisión artificial por el uso de agujas y jeringas contaminadas (50).



**Figura 7. Mapa de Panamá mostrando sitios de transmisión de leishmaniasis.**  
Imagen tomada de Miranda *et al.*, 2021 (106).

## 1.7 Características clínicas de la Leishmaniasis

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades que presentan diferentes formas clínicas. Si los microorganismos llegan a las membranas mucosas y causan daño local se presenta como leishmaniasis mucocutánea, si los microorganismos se diseminan al sistema reticuloendotelial se produce la leishmaniasis visceral (51). Dependiendo de la especie del parásito la infección puede presentarse como lesiones cutáneas (leishmaniasis cutánea). Cuando se observan lesiones con nódulos se le conoce como leishmaniasis cutánea difusa (ver figura 8) y cuando se observan muchas lesiones diseminadas en todo el cuerpo y con apariencia de lesiones de acné (ver figura 9), se le conoce como leishmaniasis cutánea diseminada (52).

La leishmaniasis mucocutánea reportada en América implica el 4.0 % de los casos totales de leishmaniasis. Es una forma clínica de leishmaniasis que depende de la especie de *Leishmania*, la genética y los mecanismos de defensa del hospedero. La especie comúnmente implicada es *Leishmania braziliensis*, pero también puede haber casos debidos a *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis*. La sintomatología es obstrucción nasal, prurito, dolor, costras cero-hemáticas, eritema, edemas e infiltración que aumentan el volumen de la punta de la nariz y puede extenderse hacia las mejillas. El proceso puede extenderse al paladar y en casos graves el estado general del enfermo se altera y hay importante pérdida de peso pudiendo llegar a casos fatales donde se observa neumonía por broncoaspiración (4).

La leishmaniasis visceral puede tener síntomas clínicos comunes a otras enfermedades febriles como malaria, fiebre tifoidea, esquistosomiasis y otras infecciones sistémicas. Por lo general se produce una fiebre baja y prolongada, agrandamiento del hígado y del bazo, pérdida de peso y pancitopenia. Puede ocurrir diarrea por parasitación y ulceración del intestino. La función del hígado puede verse alterada y en casos no tratados puede haber caquexia severa, sangrados y hemorragia mucosa que puede provocar la muerte (53).

La leishmaniasis cutánea tiene dos formas en su cuadro clínico: la leishmaniasis difusa y la leishmaniasis diseminada. En la leishmaniasis diseminada hay lesiones múltiples con apariencia de acné por todo el cuerpo con pápulas inflamatorias y lesiones acneiformes en gran cantidad en diferentes partes del cuerpo. En la leishmaniasis difusa

las lesiones son de tipo nodular y en casos graves se asemejan a la lepra lepromatosa en las cuales por efecto directo del parásito o por condiciones inmunológicas hay impedimento para que el hospedero responda ante la infección (54). La enfermedad tiene síndromes clínicos variados y su tratamiento abarca desde tratamiento locales de las lesiones cutáneas hasta tratamientos sistémicos para diversas formas de leishmaniasis los cuales pueden llegar a ser tóxicos (52,55).

La leishmaniasis cutánea, comienza como una pequeña zona de eritema en el lugar de la picadura del vector, la cual evoluciona a pápula y aumenta de tamaño. Después, la lesión puede presentar una forma característica, ulcerada en el centro y presentar bordes sobreelevados bien definidos e hiperpigmentados, que pueden estar secos o con exudado o evolucionar a una forma nodular (ver figura 10). Generalmente las lesiones son indoloras a menos que se presente una infección secundaria, pero pueden aparecer adenopatías regionales. Las lesiones pueden variar de gravedad, tiempo de duración, pueden variar en tamaño, pero rara vez superan los 10 cm de diámetro. La ulceración rara vez penetra en los tejidos subcutáneos, excepto el cartílago del pabellón de la oreja, se afecta frecuentemente la mucosa nasal, pero las lesiones pueden extenderse hacia la laringe y puede afectarse el cartílago y las cuerdas vocales. Las lesiones ulceradas pueden ser desfigurantes (56–58).

Durante la enfermedad las células T o macrófagos son estimuladas para secretar IFN- $\gamma$ , esta sustancia junto con otras citocinas elaboradas por las células T conduce a la activación local de macrófagos para matar amastigotes, aunque estas mismas células inducidas por parásitos también pueden determinar la susceptibilidad a la infección. La patogénesis de la enfermedad depende de interacciones entre macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales, células dendríticas y donde los factores parasitarios y las respuestas inmunoinflamatorias del huésped, median la expresión de la enfermedad lo que puede resultar en infecciones asintomáticas, lesiones localizadas cutáneas, hasta infecciones diseminadas ya sean cutáneas, mucosas o viscerales (56, 59)



**Figura 8. Leishmaniasis cutánea difusa.**  
Imagen tomada de *Hashiguchi et al, 2016*.  
*Tropical Medicine and Health* (2016) 44:2.



**Figura 9. Leishmaniasis cutánea diseminada.**  
Imagen tomada de *Hashiguchi et al, 2016*.  
*Tropical Medicine and Health* (2016) 44:2.



**Figura 10. Lesión única de leishmaniasis.**  
Imagen tomada de *Cantanhêde et al., 2019*

## 1.8 Métodos de diagnóstico y tratamientos

### 1.8.1 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico más comunes han sido hasta ahora los métodos parasitológicos directo e indirecto. En el método directo se observan los amastigotes directamente en un frotis de la lesión teñido con Giemsa o tinción de Panóptico. Esta detección de amastigotes se hace a partir de material extraído de raspado, aspirado de lesiones o ganglios linfáticos. Es un método fácil y económico. En el método indirecto se cultivan los parásitos en medio NNN suplementado con sangre de conejo y luego de 5 días se observan los promastigotes (60).

Otro método de diagnóstico es la prueba de hipersensibilidad de Montenegro, el cual es un método basado en la respuesta inmune innata de la persona, el cual, aunque es un método muy sensible y específico, no permite diferenciar entre una infección previa y actual. En este método, un antígeno obtenido de un cultivo de *Leishmania* se administra por medio de un adyuvante en una sección del antebrazo y luego se espera un período de 48 a 72 horas para observar el desarrollo de la inmunidad celular y establecer los criterios de positividad, de acuerdo a la formación de una induración en el área de la piel donde se administró el antígeno (61).

Las pruebas de anticuerpos fluorescentes, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y pruebas de aglutinación directa también han sido métodos utilizados para el diagnóstico del parásito, pero es un método poco utilizado ya que no se encuentra como método de rutina en los servicios públicos (62,63).

Al tiempo presente se ha implementado el método de diagnóstico molecular donde se han logrado estandarizar diferentes marcadores para la detección, identificación, discriminación, cuantificación y tipificación de las diferentes especies de *Leishmania* (64). Biomarcadores tales como los minicírculos kDNA(DNA del cinetoplasto), los espaciadores intergénicos ITS , el gen 7SL RNA que tienen muchas repeticiones en tándem por genoma, el gen 18s rDNA que tiene entre 50 y 200 copias por genoma lo cual le hace una excelente elección para ensayos de detección y la proteína de choque térmico HSP70

(HEAT SHOCK PROTEIN), entre otros, son muy utilizados para el diagnóstico molecular (65-72).

### 1.8.2 Tratamiento

Para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, los antimoniales pentavalentes son los más utilizados desde 1912, después que en 1904 se reconociera al parásito *Leishmania* como causante de la enfermedad. Los antimoniales pentavalentes se han utilizado por más de 60 años y los medicamentos con ese principio activo, tales como *Pentostan* (desarrollado en Londres) y el *Glucantime* (desarrollado en Francia) se han reconocido como altamente eficaces y han sido el pilar de la terapia por muchos años, aunque también se ha encontrado aislamientos resistentes y muchos efectos secundarios. Para la leishmaniasis visceral de la India y de Kenia se ha demostrado eficacia en dosis de 20 mg/kg de peso por día, administrado por un tiempo desde 28 a 40 días. Para la leishmaniasis cutánea y mucocutánea se utilizan dosis de 20 mg/Kg de peso por día, por un período de tiempo desde 20 a 28 días. Sin embargo, estudios realizados en pacientes peruanos tratados con *Pentostan*, reportan porcentajes de efectos secundarios tales como mialgias, artralgias, dolor de cabeza, elevación de los niveles de la enzima aspartato aminotransferasa hasta tres veces el límite superior de lo normal, elevación de los niveles séricos de amilasas o lipasas (pancreatitis química). Otros efectos secundarios reportados de la terapia con antimoniales pentavalentes son disminución de los elementos que forman la sangre tales como eritrocitos, plaquetas y leucocitos. Se añaden además efectos secundarios tales como neuropatías periféricas reversibles, dolor musculoesquelético y cardiotoxicidad que puede ser causa de muerte súbita (73,74).

Las dificultades para la administración y el incremento en frecuencia y severidad de los efectos secundarios de los antimoniales pentavalentes ha forzado la búsqueda de otros tratamientos, como es el caso de la miltefosina. En los últimos años en el caso de leishmaniasis cutánea producida por *L. guyanensis* y *L. panamensis* se recomienda la miltefosina y en el caso de la ocurrencia conjunta de *L. mexicana* y *L. panamensis* se recomienda el uso alternativo de ketoconazol. Solamente en caso de falla terapéutica de esos medicamentos o en situaciones especiales se recomienda el uso conjunto de isetionato de pentamidina, ketoconazol, miltefosina, anfotericina B liposomal o de la anfotericina B



desoxicolato. La anfotericina B liposomal administrada por vía intravenosa está aprobada para la leishmaniasis visceral, y no para leishmaniasis cutánea o mucosa. La miltefosina oral está aprobada desde 2014 por la FDA para la leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral causada por especies particulares de *Leishmania sp.* Es recomendable el uso de termoterapia y antimoniales intralesionales cuando no esté recomendado el tratamiento sistémico y se requiera hacer tratamiento local de la leishmaniasis cutánea (4).

Alquilfosfolípidos como edilfosina, ilmofosina, perifosina son también alternativas de tratamiento. Sitamaquina es de uso común en Africa pero los efectos sobre los riñones deben ser mejor evaluados. Paromomicina es otro antibiótico con actividad antileishmania y es usado contra las formas cutánea y visceral de la enfermedad. Por otro lado, al menos 25 familias de plantas en sus extractos, componentes y aceites esenciales se han evaluado para uso en tratamiento contra la leishmaniasis. Plantas como *Aloe nyeriensis* (sábila), *Himatanthus sucuuba*, *Anthemis auriculata*, *Annona coriacea*, *Ginkgo biloba*, Solanaceae, entre otras han sido probadas para observar la inhibición que causan sobre las células de *Leishmania sp.* (75).

### 1.9 Marcadores moleculares utilizados para la detección y cuantificación de *Leishmania* sp.

A nivel global existen 21 especies de *Leishmania* con una distribución endémica en algunas áreas bien conocidas, para los cuales se han utilizado biomarcadores derivados del DNA cromosómico y del DNA no cromosómico (cinetoplasto) del parásito y que utilizan diferentes metodologías moleculares para tratar de mejorar los programas de control de infecciones (76). El parásito tiene un genoma que varía entre 29 a 33 Mb de tamaño organizado en un rango de 34 a 36 cromosomas y es un genoma con alto grado de conservación, el cual se mantiene a pesar de las diferencias biológicas entre las diferentes especies (77,78).

Un biomarcador de DNA de origen no cromosómico es el kDNA procedente de las mitocondrias, el cual tiene muchas copias por célula (79,80) y ha sido utilizado en PCR convencional (81). El genoma mitocondrial kDNA de *Leishmania* está organizado en mini círculos de 0.8 a 1.0 kb cada uno y varias docenas de maxi círculos aproximadamente de 23Kb cada uno unidos en red concatenada. Los mini círculos de kDNA (ver figura 11) representan aproximadamente el 95% del DNA del cinetoplasto y codifican pequeños RNA guías necesarios para la edición de RNA de las transcripciones codificadas por maxi círculos. Estos mini círculos están presentes en miles de copias por células lo que los hace altamente sensibles para la detección (82).

Utilizando algunos pares de cebadores específicos dirigidos al mini círculo de copias múltiples del kDNA se ha logrado identificar y cuantificar organismos que pertenecen al género *Leishmania* y también discriminar entre especies observando la curva de disociación del producto amplificado (83). El kDNA ha sido utilizado para detección y cuantificación de *Leishmania* (*Viannia*) spp en biopsias de lesiones lográndose buena sensibilidad y especificidad (84).

Por otro lado, también se ha evaluado un motivo conservado del kDNA mediante PCR en tiempo real basado en SYBR *green* para la identificación de subgéneros de *Leishmania* (85). Otro método basado en qPCR anidada y SYBR *green* como fluoróforo genera productos más cortos que permiten discriminar entre los subgéneros de *Leishmania*

y *Viannia* aplicando un análisis de curva de disociación de alta resolución HRM (86). Mediante *qPCR* dirigida al kDNA se ha logrado diferenciar entre subgéneros *Leishmania* y *Viannia* y distinguir algunas especies para apoyar el diagnóstico rápido y al estudio de distribución de especies (87).

La mayoría de los biomarcadores para detectar *Leishmania* sp. son de origen cromosómico y ya hemos citado autores que han trabajado con estos marcadores, como las regiones altamente conservadas entre especies denominados espaciadores intergénicos ITS1 (67); el gen 7SL RNA que tienen muchas repeticiones en tándem por genoma (68); el gen 18s rDNA que tiene entre 50 y 200 copias por genoma lo cual le hace una excelente elección para ensayos de detección (69) y la proteína de choque térmico HSP70 (HEAT SHOCK PROTEIN) (70). También se han evaluado los genes multicopias de la cisteína proteasa b (cpb) implicados en la interacción hospedero parásito (88). Los biomarcadores HSP70, kDNA, 18s rDNA y el ITS han sido evaluados en conjunto ya sea con PCR convencional o con *qPCR* y se ha considerado el kDNA como el más sensible (89).

El gen 18s rDNA es un biomarcador que tiene múltiples copias y codifica para un rRNA de la subunidad pequeña, región altamente conservada del ADN ribosómico ubicada en el cromosoma 27 y que ha sido utilizada en ensayos para la detección de *Leishmania* (90). El gen 18s rDNA ha sido evaluado por *qPCR* utilizando cepillo citológico (*citology brush*) en la toma de muestra como un método con buena eficacia (98%) y especificidad (84%) para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea en América, comparado con la detección en frotis o aislamiento del parásito que es considerado el estándar de oro (91). Los genes kDNA y 18S rDNA han sido evaluados en conjunto mediante *qPCR*, observándose concordancia entre los dos marcadores para la detección de parásitos en lesiones cutáneas, aunque el kDNA se ha considerado como más eficiente para detección de parásitos en muestra de mucosa que el 18S rDNA (92).

HSP70 es un gen de 1959 pb que parece estar implicado en la sobrevivencia y adaptación de la célula al calor y a los factores de stress (93). Este gen codifica para una proteína de 657 aminoácidos que parece conferirle al parásito tolerancia al antimonio (20). Se ha estudiado también la existencia de un cósmido de expresión codificador de una

proteína rica en leucina que le confiere al parásito resistencia al antimonio en algunas áreas endémicas (94). HSP70 es un gen del cual se ha sugerido que existen en las diferentes especies de *Leishmania* desde 1 a 7 copias organizadas en tándem con secuencias de codificación idénticas que son fácilmente comparable en todas las especies de *Leishmania* porque no hay variación en tamaño y tiene buen poder discriminatorio en ambos subgéneros *L. Viannia* y *L. Leishmania* y su grado de conservación impide amplificación de otros miembros de la misma familia de genes (72, 95, 96).

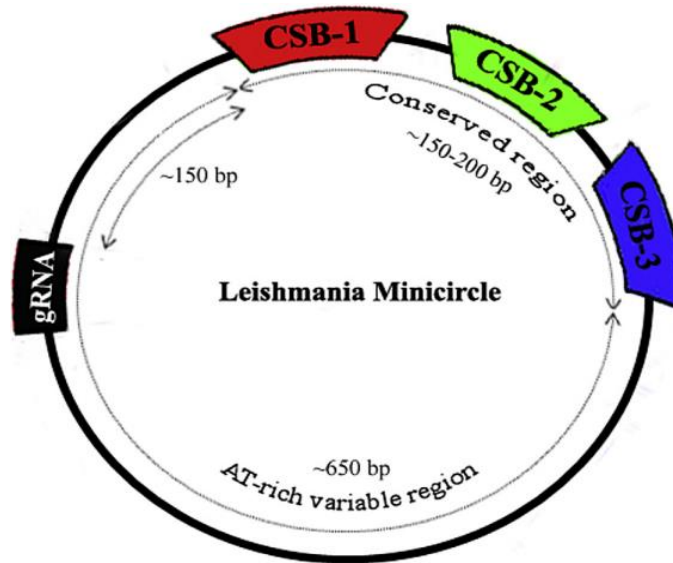
Mediante PCR, el marcador molecular HSP70 ha sido utilizado como gen blanco para detección de géneros y tipificación de especies variando la manera de obtención de las muestras para medir sensibilidad, donde se ha obtenido éxito con las muestras de biopsia(97) a diferencia de otros estudios que reportan que el método de muestreo de las lesiones con cepillo de citología y el raspado con lanceta han proporcionado de manera independiente cada uno, mejor rendimiento en la recuperación del ADN del parásito durante la extracción (98,99).

HSP70 se ha utilizado junto con la técnica de perfiles de fragmentos de restricción (RFLP) como gen blanco para la caracterización de especies de *Leishmania* sp. ya sea del Viejo Mundo o del Nuevo Mundo y ha sido utilizado junto a los resultados de otros genes y proteínas para construir la taxonomía del género (71, 72, 100, 101).

HSP70 ha sido utilizado en Panamá, junto con el perfil de fragmentos de restricción para identificar las especies predominantes en el país, tales como *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis* (44). Sin embargo, últimos estudios reflejan la imposibilidad de este método ampliamente utilizado, para distinguir *L.guyanensis* de *L. linderbergi* en áreas de Brasil donde esta última es endémica, mediante el ensayo PCR-RFLP (102).

Mini exon es un gen presente únicamente en el genoma de los protozoarios. Pueden encontrarse copias en tandem de entre 100 a 200 copias por genoma y está implicado en la edición del mARN nuclear. El gen mini exon consta de un exón altamente conservado de 39 pb, un intrón medianamente conservado de entre 55 a 101 pb y una región espaciadora, no transcrita y muy variable en longitud, la cual hace que este gen sea muy utilizado para genotipificación de especies (103,104).

Desde los primeros ensayos del desarrollo de la técnica de *qPCR* (105), hasta los días presentes, podemos observar que no existe una técnica de *qPCR* validada consenso para la cuantificación de carga parasitaria de parásitos del género *Leishmania* sp. Los marcadores que mayormente se han utilizado son el kDNA (ver figura 11) y el 18S rDNA para cuantificar la carga parasitaria de *Leishmania* y en menor grado otros marcadores como, GP63, G6PD, GPI, CPB, entre otros (82,84, 106).



**Figura 11. Minicírculo de kDNA de *Leishmania* sp. y sus componentes.**

Gen utilizado como biomarcador para detección y cuantificación de *Leishmania* sp.

**Fuente:** Akoundi, 2017 (76).

## 2.0 JUSTIFICACIÓN

En nuestro país como en otros países latinoamericanos en los cuales la leishmaniasis está ampliamente distribuida existe la necesidad del desarrollo de métodos moleculares capaces de detectar de una manera sensible y específica cualquier especie circulante y sus variantes además de determinar la carga parasitaria a nivel de muestras clínicas de modo que se evite utilizar métodos que requieran la amplificación del parásito en cultivo que tiende a favorecer a la población del parásito más apta para la proliferación en este tipo de medios, evitando la detección de otras poblaciones con características biológicas inherentes que las hacen relevante desde el punto de vista de salud pública. Además, el desarrollo de técnicas que detecten y determinen carga parasitaria al mismo tiempo es de suma importancia para el desarrollo de estudios futuros que busquen monitorear la respuesta terapéutica a las diferentes alternativas existentes contra la enfermedad de leishmaniasis. Es importante recalcar que no existe una técnica consenso para la detección y cuantificación de carga parasitaria de *Leishmania* actualmente y la existencia de variación geográfica en composición de especies y variantes locales de *Leishmania* ameritan iniciativas para el desenvolvimiento y validación local de técnicas que funcionen para esta finalidad. Del mismo modo, es necesario el desarrollo de técnicas moleculares a nivel local que discriminen las especies circulantes en los diferentes escenarios epidemiológicos del país, debido a que la implementación de técnicas previamente publicadas en nuestro país y en otros países de la región han fallado en la discriminación de especies del subgénero *Viannia* las cuales son los agentes causativos de la leishmaniasis tegumentaria en nuestro país.

En respuesta a esta necesidad creemos que el desarrollo y utilización de una PCR anidada utilizando cebadores internos para el gen HSP70, especialmente diseñados en el ICGES, y la implementación de un método de PCR en tiempo real mediante la evaluación del marcador kDNA y el control endógeno RNase P, permitió la detección de parásitos de *Leishmania* sp. con su respectiva carga parasitaria en muestras clínicas de pacientes de leishmaniasis cutánea en Panamá, por lo cual hemos fortalecido el diagnóstico de leishmaniasis en nuestro país y la capacidad de desarrollar estudios futuros para monitorear

la respuesta a la terapia contra *Leishmania* y responder preguntas sobre la historia natural de la infección humana con parásitos de *Leishmania* sp.

Nuestro estudio apoya un futuro monitoreo de respuesta al tratamiento que ayudaría al manejo del paciente y también a evaluar el desarrollo del parásito correlacionando la carga con la respuesta inmunológica en modelos animales.

### **3.0 OBJETIVOS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Objetivo General:**

Desarrollar un protocolo de PCR anidada para la discriminación de especies de *Leishmania* sp. e implementar una *qPCR* para detectar y cuantificar carga parasitaria directo de muestras clínicas.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Identificar las especies de *Leishmania* sp. en lesiones cutáneas utilizando un PCR anidada para el biomarcador HSP70.
- Cuantificar carga parasitaria de *Leishmania* sp. mediante *qPCR* basado en el kDNA del parásito.
- Determinar la relación entre la carga parasitaria de *Leishmania* sp. y el tamaño de la lesión.

### 3.3 Pregunta de Investigación e Hipótesis

#### **Pregunta de investigación:**

¿Existe diferencia significativa en el promedio del tamaño de la lesión en la piel y el promedio de la carga parasitaria en esa misma lesión en la piel de las personas afectadas por leishmaniasis?

#### **Hipótesis:**

**Ho:** No existe diferencia significativa entre el promedio del tamaño de la lesión en la piel y el promedio de la carga parasitaria en esa misma lesión en las personas afectadas por leishmaniasis.

$$\mathbf{H_o = M_1 = M_2}$$

**Ha:** Existe diferencia significativa entre el promedio del tamaño de la lesión en la piel y el promedio de la carga parasitaria en esa misma lesión en las personas afectadas por leishmaniasis.

$$\mathbf{H_a = M_1 \neq M_2}$$



## **4.0 METODOLOGÍA**

#### 4.1 Extracción de ADN de las muestras de lesiones cutáneas.

El ADN se extrajo a partir de las muestras tomadas de lesiones cutáneas utilizando un cepillo citológico en los pacientes que acudieron al Instituto Conmemorativo Gorgas para control de las lesiones, previo consentimiento del paciente para la utilización de su muestra. El ADN fue extraído utilizando el kit comercial *High Pure PCR Preparation Kit* (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. (<https://www.sigmaaldrich.cn/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/223/567/11796828001.pdf>)

#### 4.2 PCR anidada o *nested*, PCR externa y PCR interna.

El ADN extraído de las muestras de lesiones cutáneas fue sometido a una PCR externa utilizando cebadores que amplificaron un segmento de 1964 pb que codifica para la proteína HSP70 o proteína de choque térmico. Los cebadores HSP70 utilizados por García y colaboradores en el año 2004 (71) nos permitieron amplificar ese segmento de 1964 pb correspondiente al gen HSP70. Para esto mezclamos 5.0 µL de buffer 5x *DNA buffer Phusium*, 0.5 µl de DNTP's, 0.25 de DNA polimerasa *Fusium Hight Fidelity* (ThermoScientific, # catálogo F-530XL), 1.75 µl de cebador directo, 1.75 µl de cebador reverso y 10.75 de agua destilada libre de DNAsas y RNAasas y 5µl de ADN genómico para hacer un volumen de 25 µl en cada tubo de PCR para cada una de las muestras. Todos los tubos de PCR conteniendo 25µl de mezcla de reacción, se sometieron al termociclador *Bio Rad T100* bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación de los cebadores a 55°C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 2 minutos, más una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Los amplicones procedentes de esta PCR externa de las muestras en estudio, se utilizaron para una posterior PCR anidada.

La PCR anidada utilizando cebadores diseñados en el Instituto Conmemorativo Gorgas, *Seq Leish Fw* (5'- GATGGTGCTGCTGAAGATGA-3') y *Seq Leish Rv* (5'- GGTCATGATCGGGTTTGCATA-3') nos permitió amplificar un segmento interno de 1364 pb del gen que codifica para la proteína HSP70. Preparamos una mezcla 10 µl de 5X *DNA Buffer Phussium*, 1.0 µl de DNTP's, 0.5 de DNA Polimerasa *Phusion High Fidelity* (ThermoScientific, # catálogo F-530XL), 1.0 µl de cebador *Seq-Leish Fw*, 1.0 µl

cebadores *Seq- Leish Rv* y 34.5 µl de agua destilada libre de DNAasas y de RNAasas y 2 µl del amplicón procedente de la PCR externa para hacer un volumen final por tubo de 50 µl por cada tubo de PCR. Esta PCR anidada se realizó en un termociclador *Bio Rad T100* aplicando una desnaturalización inicial a 96 °C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos de hibridación de los cebadores a 62 °C por 0.30 segundos, extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

#### 4.3 Límite de detección de los cebadores internos en la técnica de PCR anidada.

Se realizaron cultivos de parásitos de *Leishmania* de diferentes cepas de referencias en medio NNN suplementado con sangre de conejo para realizar posterior extracción de ADN, para medir la sensibilidad de los cebadores internos. Para realizar la extracción de ADN del cultivo celular se utilizó el kit de extracción Wizard *HMW* de *Promega*, siguiendo las instrucciones del fabricante (<https://worldwide.promega.com/es-es/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/high-molecular-weight-dna-extraction-kit/?catNum=A2920#protocols>).

Del ADN extraído del cultivo celular de las diferentes cepas de referencias, medimos la concentración en ng/µl utilizando el fluorímetro *Qubit 4* (Invitrogen, referencia Q33226) según instrucciones del fabricante. A partir de la concentración de cada muestra original preparamos diluciones a una concentración de 10 ng/µl. De la solución a 10ng / µl procedimos a preparar diluciones seriadas desde 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, y 1 fg. Todas las diluciones de las diferentes cepas cultivadas, desde los 100 pg hasta 1 fg fueron sometidas a una PCR utilizando los cebadores previamente diseñados en el Instituto Conmemorativo Gorgas para amplificar un segmento interno del gen HSP70 y realizar así una estandarización para las diferentes cepas de referencia.

La mezcla con los reactivos para probar la sensibilidad de los cebadores diseñados en el ICGES contenía 0.5 µl de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (ThermoScientific Catálogo # F-530XL), 10 µl de *5X DNA Buffer Phusion*, 1.0 µl de dNTP's, 1.0 µl de *Seq Leish Fw* (5-GATGGTGCTGCTGAAGATGA-3), 1.0 µl de *Seq Leish Rv* (5-GGTCATGATCGGGTTGCATA-3); 34.5 µl de agua libre de DNAsa y RNAsa y 2 µl de la dilución seriada del cultivo celular para obtener un volumen final de 50 µl en la reacción.

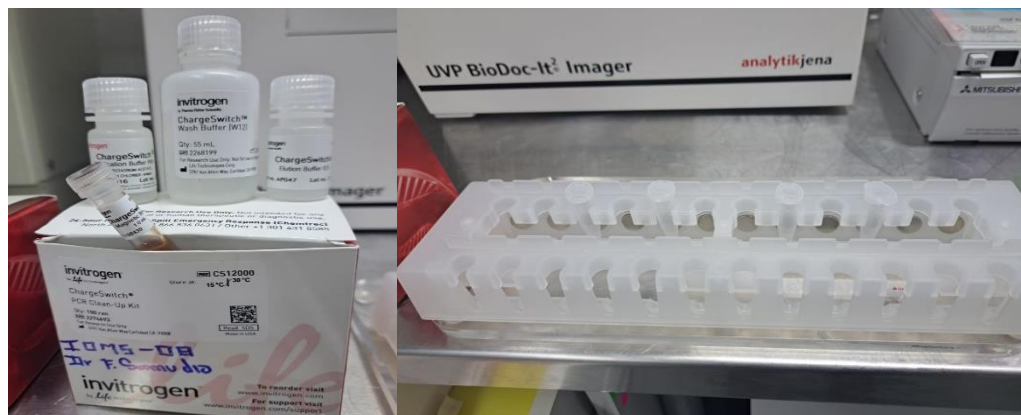
Todos los tubos con las diferentes diluciones seriadas de *Leishmania* sp. fueron sometidas a una PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96 °C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos a 95 °C por 0.30 segundos, hibridación a 62 °C por 0.30 segundos, una extensión a 72 °C por 1 minuto, posteriormente una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Se utilizó un termociclador *Bio Rad T100*.

#### **4.4 Electroforesis en gel de agarosa**

La amplificación del segmento interno del gen HSP70, se verificó por una electroforesis en gel de agarosa para observar las bandas de 1364 pb del segmento interno del gen HSP70. Para preparar el gel de agarosa utilizamos 1.2 gr. de agarosa, 60 ml de agua destilada, 5.0 ml de *buffer* TBE, y 35 ml de *Oil Red*. Para realizar la corrida del gel se utilizó 5 µl del amplicón mezclado con 2µl de *buffer* de carga. Para comparar los amplicones utilizamos un marcador de peso molecular de 1 kb. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis *Bio Rad* por un tiempo de 1 hora, a 85 Voltios y 500 miliAmperios.

#### **4.5 Purificación de Amplicones**

Para purificar los amplicones obtenidos de la PCR anidada, utilizamos el kit *ChargeSwitch PCR Clean-UP* de *Invitrogen* (ver figura 12), siguiendo las recomendaciones del fabricante (<https://www.fishersci.fi/shop/products/invitrogen-chargeswitch-pcr-clean-up-kit-2/p-4926415>). Los amplicones purificados se almacenaron a -20°C hasta su utilización para medir la concentración de ADN antes de la secuenciación.



**Figura 12. Kit con perlas magnéticas para purificación del ADN de amplicones.** Las perlas magnéticas atrapan los ácidos nucleicos eliminando material no deseado, luego de lo cual se eluye el ADN de las perlas en un tampón bajo en sal.

#### 4.6 Reacción de Secuenciación, planeación y purificación del plato de secuenciación

Para la PCR de secuenciación separamos las muestras de acuerdo a la concentración de ADN de los amplicones. Para las muestras con más de 20 ng/μl de ADN utilizamos 1 μl de ADN en la reacción de secuenciación. Para las muestras con menos de 20 ng/μl de ADN utilizamos 2 μl de ese ADN para un total de 10 μl en la reacción de secuenciación. Se preparó mezclas por separado para cada cebador. Así, para la mezcla que llevaría el ADN con más de 20 ng/μl agregamos 2 μl de *Big Dye 2.5X*, 1 μl de *Byg Dye Terminator 5X Sequencing Buffer* (# de catálogo 4337449), 1 μl de cebador, 5 μl de agua libre de nucleasa y 1 μl del amplicón para hacer un volumen final de 10 μl.

El plato de secuenciación contenía una mezcla de un control positivo con un plásmido, esta mezcla la colocamos en el pocillo final del extremo derecho del plato de secuenciación. La mezcla contenía 2.0 μl de *Big Dye Rx 2.5X*, 1.0 μl del plásmido PGem Control 32f(†), 2.0 μl de cebador directo *M13(-21)*, 1.0 μl de *Big Dye buffer terminator secuencing 5x* y 4.0 μl de agua libre de nucleasa haciendo un volumen final de 10 μl en el pocillo.

Utilizamos para la reacción de secuenciación todos los reactivos del kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Applied Biosystems*, siguiendo las instrucciones del fabricante (<https://www.fishersci.com/shop/products/bigdye-terminator-v3-1-cycle-sequencing-kit-6/4337455>). Para realizar la reacción de secuenciación se usaron las

siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 segundos, hibridación de los cebadores a 56°C por 5 segundos y una extensión a 60°C por 4 minutos. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador *Mini Amp* (Applied BioSystem, número de catálogo A37834) con protocolo previamente establecido para la secuenciación del segmento interno de 1364 pb del gen HSP70.

Para realizar la purificación del plato de secuenciación utilizamos el kit *Big Dye X Terminator Purification kit* (Applied Biosystems, # catálogo 4376487) siguiendo las instrucciones del fabricante (<https://www.fishersci.es/shop/products/bigdye-xterminator-purification-kit-4/15899816>). Luego de la purificación, el plato de secuenciación fue enviado a la Unidad de Genómica del Instituto Conmemorativo Gorgas donde procedieron a realizar la electroforesis capilar que nos permitió separar los productos de la secuenciación y obtener las secuencias en los dos sentidos (directo y reverso) para cada una de las especies de *Leishmania sp* en las muestras de las personas que participaron voluntariamente en este estudio. Las secuencias obtenidas mediante esta metodología fueron posteriormente editadas mediante el programa informático UGENE, sometidas a un BLAST en el portal de internet NCBI y a un análisis Bayesiano, mediante el programa informático Mr Bayes 3.2.7 lo que permitió separar los clados y discriminar las especies de *Leishmania sp*. en cada una de las muestras de lesiones cutáneas.

#### **4.7 Determinación de Carga Parasitaria e implementación de la metodología de PCR en tiempo Real (qPCR) para uso del blanco molecular kDNA**

La carga parasitaria fue estimada por cuantificación absoluta mediante un ensayo en tiempo real utilizando sondas *Taqman* en una qPCR duplex junto con el kit *TaqMan RNAsaP Control Reagents kit (VIC/TAMRA, Applied Biosystems)* el cual es utilizado para la cuantificación de ADN humano, control interno de amplificación y subsecuente normalización de cada muestra. La carga parasitaria es expresada como equivalentes de parásitos/μg de DNA humano. Se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos utilizados por López y colaboradores en el año 1993 (107) y las sondas específicas LzTq diseñadas en el Instituto Oswaldo Cruz de Brazil, para los genes kDNA. Utilizamos en paralelo un control de calidad exógeno para la extracción del ADN y del ensayo de qPCR. El control

exógeno sintético de ADN se adicionó a cada muestra antes de la extracción y la curva estándar se preparó mediante la dilución de DNA de *Leishmania* sp. de acuerdo a resultados de la estandarización y validación analítica del método.

Nuestro estudio observacional de tipo experimental evaluó la metodología de PCR en tiempo real para cuantificar el número de parásitos de *Leishmania* sp. en muestras de lesiones cutáneas de leishmaniasis en los individuos que participaron voluntariamente en este estudio.

Las cepas de referencia utilizadas para normalizar la curva estándar en este estudio pertenecen al banco de parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Cepas de referencia utilizadas en este estudio.**

Cepas pertenecientes al Instituto Conmemorativo Gorgas (ICGES)

| ESPECIE                        | CÓDIGO             |
|--------------------------------|--------------------|
| <i>Leishmania panamensis</i>   | CP 008             |
| <i>Leishmania braziliensis</i> | MHOM/BR/1975/M2903 |
| <i>Leishmania guyanensis</i>   | MHOM/BR/1975/M4147 |

Las cepas de referencia descritas anteriormente fueron cultivadas en medio BHI (*Brain heart infusum*) suplementado con suero fetal bobino (20%) e incubadas a 25°C. Se hizo un cultivo masivo de promastigotes en varios frascos de cultivo. Se monitoreo el crecimiento exponencial de los parásitos utilizando la cámara de *Neubauer* buscando parásitos viables en forma de promastigotes y realizando el recuento de parásitos desde el primer día de cultivo hasta el día octavo.

Para realizar el recuento de parásitos cada día se tomaron 10 µl del cultivo de parásitos y se realizó una dilución con factor de 1/10 con agua libre de DNAsas y RNAsas. De esta dilución se tomó una muestra de 10 µl y se colocó en la cámara de *Neubauer* para realizar el conteo. Con el lente objetivo de 40X se contaron las formas promastigotes en la Cámara de *Neubauer* y se determinó el número de parásitos teniendo como referencia 1 millón de

parásitos por mililitro según protocolos establecidos (<https://mural.uv.es/basgaros/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>). La fórmula utilizada para el conteo de parásitos en el cultivo original de cada día es la siguiente:

$$\text{Concentración de células} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Número de cuadrantes}} \times 10000$$

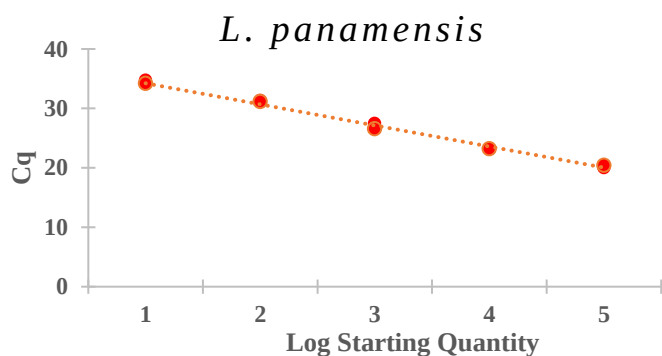
El cultivo que presentó un recuento de un millón de parásitos fue entonces utilizado para preparar la curva estándar. Para extraer el ADN del cultivo de parásitos se utilizó el *kit Wizard HMW DNA Extraction* (Promega, # de catálogo A2920) siguiendo las instrucciones del fabricante (<https://worldwide.promega.com/es-es/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/high-molecular-weight-dna-extraction-kit/?catNum=A2920>). De acuerdo a dichas instrucciones las células se lavan y se resuspenden en PBS (pH 2). Posteriormente se les agrega Proteínasa K para digerir las proteínas y facilitar la separación del DNA genómico. La integridad del DNA se evalúa mediante gel de agarosa 0.8% y se cuantifica mediante el equipo *Fluorímetro Qubit™ 4* (Invitrogen, # catálogo Q33226).

Nuestro ensayo es dirigido al blanco kDNA, así que para la amplificación del gen kDNA utilizamos el par de cebadores específicos utilizados por López y colaboradores en el año 1993 (107), y una sonda específica para una región conservada del cinetoplasto diseñada en el Instituto Oswaldo Cruz de Brazil, denominada *LzTq*. La curva estándar se preparó mediante la dilución de DNA de *Leishmania* de acuerdo con resultados de la estandarización y validación analítica del método.

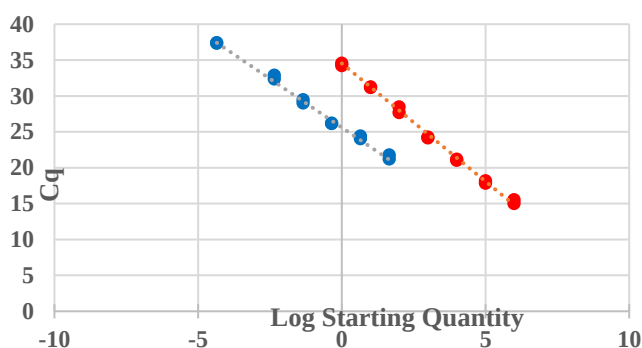


#### 4.8 Generación de la curva estándar.

Utilizamos DNA genómico de *Leishmania panamensis* CP008 obtenido en su fase exponencial de crecimiento para la estandarización de las curvas y el posterior ensayo de kDNA (ver figura 13). Del ADN eludido del cultivo celular de la cepa CP008, que presentó recuento de 1 millón de parásitos ( $1.0 \times 10^6$ ) realizamos diluciones seriadas de base 10 con una extensión dinámica que oscilaba entre  $10^5$  y  $10^{-1}$  parásitos equivalentes/reacción para hacer los ensayos q PCR duplex. Además de la dilución seriada del ADN del cultivo del parásito, se realizó una dilución seriada desde  $4.5 \times 10^1$  ng/  $\mu$ l hasta  $4.5 \times 10^{-5}$  ng/  $\mu$ l del gen RNAsaP (concentración 10ng/ $\mu$ l). De esta manera logramos obtener muestras en la cual conocemos la cantidad de ADN del parásito y la cantidad de ADN humano por reacción (ver figura 14).



**Figura 13. Curva estándar de *Leishmania panamensis* CP008.** El valor medio CT se traza con base en los duplicados probados de ADN diluída desde  $1.0 \times 10^5$  hasta  $1.0 \times 10^{-1}$  por reacción. Cada punto es el Ct de una muestra con la gráfica de valores de Ct y el parásito equivalente ajustando una función lineal.



**Figura 14. Curva estándar de *Leishmania panamensis* (rojo) y de ADN humano (azul).** El valor medio CT se traza con base en los duplicados probados de ADN diluída desde  $1.0 \times 10^5$  hasta  $1.0 \times 10^{-1}$  por reacción. Cada punto es el Ct de una muestra con la gráfica de valores de Ct y el parásito equivalente ajustando una función lineal.

#### 4.9 Preparación de la mezcla de reacción para realizar la PCR Tiempo Real (qPCR).

Se incluyó en el mismo plato de reacción qPCR una mezcla de cada una de las concentraciones de ADN del cultivo celular previamente estandarizado (figura 13) con concentraciones desde 1,000,000 parásitos hasta 0.1 parásito por reacción, en duplicado igual que todas las muestras a analizar. También se incluyó una curva estándar con concentraciones de ADN humano (RNAasa P) desde  $4.5 \times 10^1$  ng/μl hasta  $4.5 \times 10^{-5}$  ng/μl (figura 14). Para cada corrida se hizo una reacción con control negativo con agua grado molecular. Cada muestra de ADN se evaluó por duplicado y las muestras con un Ct menor de 40 se consideraron como amplificación negativa. La preparación de la mezcla para qPCR consistió de 5ul de DNA de cada muestra en estudio y 1x de la mezcla de PCR. Se utilizaron los reactivos del kit *TaqMan RNAsaP Control Reagents kit (VIC/TAMRA, Applied Biosystems)* siguiendo instrucciones del fabricante ( <https://laboshop.ae/product/applied-biosystems-taqman-rnase-p-control-reagents-kit788> ) El volumen final de la reacción de qPCR fue de 15 μl incluyendo los cebadores específicos (114) para el biomarcador kDNA y la sonda *Taqman LzTq* utilizados en la reacción qPCR. Utilizamos 7.5 μl de *2x iTaq Universal Probes One Step* (nro de catálogo 10031816, BIORAD), 0.22 μl de cebador directo, 0.45 μl de cebador reverso, 0.30 μl de la sonda *LzTq* , 1 μl de *20x Rnase P Prim Probe*, 5 μl de ADN del parásito de cada una de las diluciones seriadas mezcladas con ADN humano y agua libre de nucleasas para completar la mezcla.

La reacción qPCR se corrió en un termociclador *CFX96 Real Time System (Bio Rad)* y las condiciones para el termociclador fueron las siguientes: temperatura inicial de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 39 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación y extensión a 60 °C por 1 minuto y la captura de la fluorescencia se hizo al final de cada fase de extensión.

La carga es determinada por la interpolación en la curva estándar y los datos de carga parasitaria de cada individuo que participó en este estudio y obtenidos de la qPCR, son normalizados para expresarlos en parásitos equivalentes. Para normalizar la carga de parásitos equivalentes para células humanas cuantificamos en paralelo el gen RNaseP humano.

El número de copias de ADN de *Leishmania* en cada muestra se calculó así:

$$\left[ \text{DNA equivalentes parásitos (por Reacción)} / \text{Cantidad de masa de DNA humano (por Reacción)} \right] \times 10^3$$

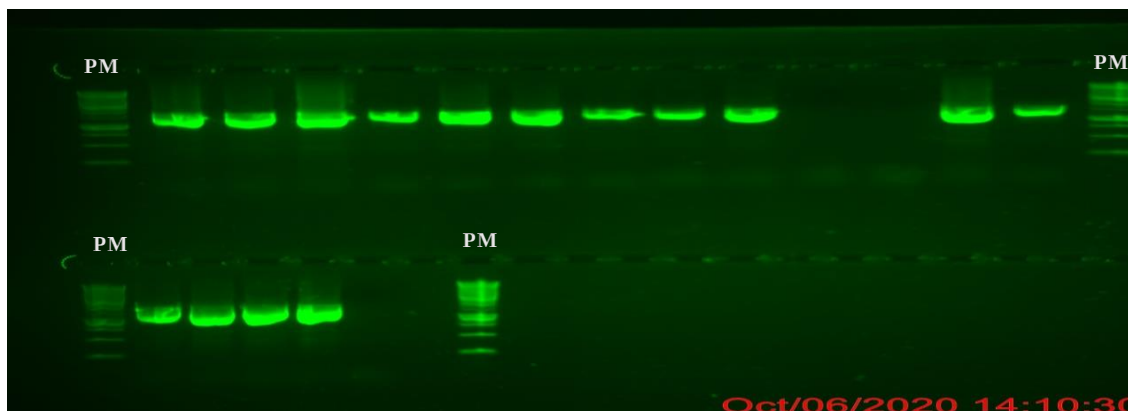
La carga parasitaria fue expresada como número de parásitos equivalentes por  $\mu\text{g}$  de DNA humano (Cuadro 5).

Se utilizó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* para determinar la distribución de las variables estudiadas tales como carga parasitaria, tamaño de la lesión, edad y tiempo de evolución de la lesión. Se utilizó el test de *Mann y Whitney* para realizar la prueba de hipótesis, mediante el programa estadístico *BioEstat* Versión 5.3. Para generar las gráficas de los datos de carga parasitaria se utilizó el programa *Jump Pro v17* (*JMP*® Pro-17.0.0).

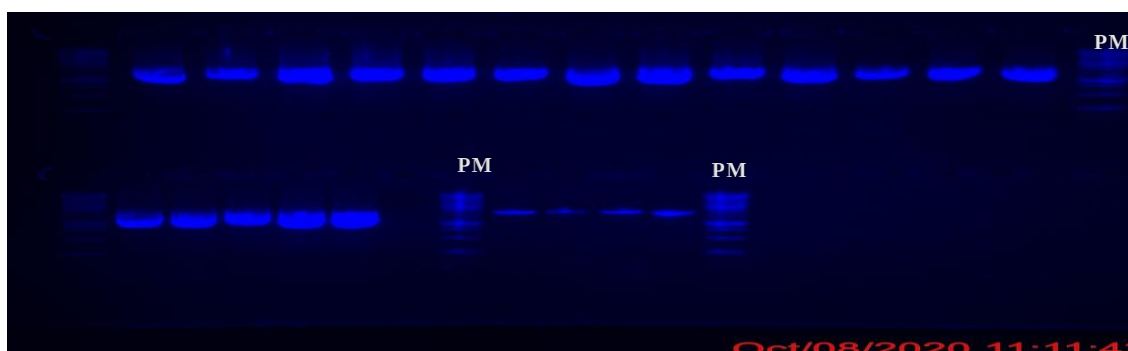
## **5.0 RESULTADOS**

### 5.1 Descripción de hallazgos de PCR anidada y secuenciación

Las muestras tomadas con cepillo citológico fueron sometidas inmediatamente al proceso de extracción de ADN, el cual fue guardado a -20°C. Posteriormente procedimos a realizar la PCR externa, la PCR anidada y la respectiva electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia del amplicón específico de 1364 pb (figuras 15 y 16).



**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa para el gen HSP70.** Visualización de amplicones de la PCR anidada del segmento de 1364 pb del gen HSP70, aislado de muestras de lesiones de leishmaniasis cutánea en la piel de 15 individuos que participaron voluntariamente en este estudio.



**Figura16. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR anidada del gen HSP70.** Visualización del segmento de 1364 pb del gen HSP70 aislado de muestras de lesiones de leishmaniasis cutánea en la piel de 18 pacientes que participaron voluntariamente en este estudio. Las últimas 4 bandas visibles entre bandas de marcador de peso molecular son amplicones purificados de la PCR interna del segmento de 1364 pb del gen HSP70, aislado de muestras de lesiones de leishmaniasis cutánea en la piel de 4 individuos que participaron voluntariamente en este estudio.

Los amplicones se purificaron utilizando el kit de perlas magnéticas (*Invitrogen*) descrito en nuestra metodología y luego de la purificación se guardaron a -20°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (figura 17) y se midió la concentración de ADN utilizando un fluorómetro *Qubit* (*Invitrogen*) (Cuadro 2). Los amplicones que presentaron una concentración de más de 10ng/μl se utilizaron para correr la reacción de secuenciación descrita en nuestra metodología. Posteriormente el plato de secuenciación fue enviado a la Unidad de Genómica del Instituto Conmemorativo Gorgas para la realización de la electroforesis capilar y determinar las secuencias en directo y en reverso de ADN del parásito en la herida de leishmaniasis de cada persona que participó en este estudio.



**Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones purificados.** Visualización del segmento de 1364 pb del gen HSP70 en los amplicones de la PCR interna de muestras obtenidas de las lesiones de la piel de 9 individuos que participaron voluntariamente en este estudio.

Las secuencias en forma de electroferogramas nos llegaron posteriormente por correo electrónico en tres tipos de formatos, ABI, SEQ y File explorer, para cada secuencia en ambos sentidos, las cuales fueron entonces editadas para proceder con los análisis bioinformáticos.

## Cuadro 2. Concentración de ADN de los amplicones purificados.

La concentración de ADN se obtuvo con el equipo fluorómetro Qubit 4 (*Invitrogen*).

| Muestra      | n1    | n2    | n3    | n4    | n5    | Promedio | Muestra      | n1    | n2    | n3    | n4    | n5    | Promedio |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| Amplicón     | ng/μl | ng/μl | ng/μl | ng/μl | ng/μl | ng/μl    | Amplicón     | ng/μl | ng/μl | ng/μl | ng/μl | ng/μl | ng/μl    |
| <b>cp 01</b> | 50    | 48.9  | 48.1  | 49.1  | 49.3  | 49.08    | <b>cp 34</b> | 51    | 49.4  | 49.3  | 51    | 49.1  | 49.96    |
| <b>cp 02</b> | 36.9  | 36.8  | 36.8  | 36.6  | 36.6  | 36.74    | <b>cp 35</b> | 22.4  | 22.1  | 21.2  | 21.3  | 21.8  | 21.76    |
| <b>cp 03</b> | 11.7  | 11.6  | 11.8  | 11.8  | 11.7  | 11.72    | <b>cp 36</b> | 39.4  | 38.4  | 38.2  | 37.7  | 38.2  | 38.38    |
| <b>cp 04</b> | 45.5  | 46.2  | 44.5  | 44.3  | 44.6  | 45.02    | <b>cp 37</b> | 31.7  | 31.5  | 31.2  | 30.7  | 30.9  | 31.2     |
| <b>cp 05</b> | 51    | 50    | 48.9  | 48.4  | 48.4  | 49.34    | <b>cp 38</b> | 34.3  | 34    | 33.2  | 32.9  | 33.3  | 33.54    |
| <b>cp 06</b> | 58    | 57    | 57    | 56    | 55    | 56.6     | <b>cp 39</b> | 29.4  | 28.7  | 28.5  | 28.4  | 28.4  | 28.68    |
| <b>cp 07</b> | 47.6  | 47.4  | 47.2  | 45.9  | 45.5  | 46.72    | <b>cp 40</b> | 32.1  | 32.1  | 32    | 32    | 32.1  | 32.06    |
| <b>cp 08</b> | 43    | 44    | 44    | 44.4  | 43.8  | 43.84    | <b>cp 41</b> | 45.1  | 45.3  | 45.4  | 45.1  | 45.3  | 45.24    |
| <b>cp 09</b> | 24.6  | 24.3  | 24.8  | 24.7  | 24.6  | 24.6     | <b>cp 42</b> | 36.1  | 36.2  | 36.1  | 35.9  | 36    | 36.06    |
| <b>cp 10</b> | 36    | 35.5  | 34.3  | 34.6  | 34    | 34.88    | <b>cp 43</b> | 40.2  | 40.1  | 40.3  | 40.1  | 40.2  | 40.18    |
| <b>cp 11</b> | 37.7  | 34.7  | 34.1  | 34    | 35    | 35.1     | <b>cp 44</b> | 39.1  | 39.2  | 39.2  | 39.1  | 39.1  | 39.14    |
| <b>cp 12</b> | 40.3  | 40.5  | 41.3  | 40.8  | 40.9  | 40.76    | <b>cp 45</b> | 52.3  | 52.5  | 52.4  | 52.5  | 52.4  | 52.42    |
| <b>cp 13</b> | 37.7  | 34.1  | 34.7  | 34    | 35    | 35.1     | <b>cp 46</b> | 47.4  | 47.6  | 47.5  | 47.5  | 47.6  | 47.52    |
| <b>cp 14</b> | 47    | 46.2  | 46    | 45.8  | 46.1  | 46.22    | <b>cp 47</b> | 45.6  | 45.5  | 45.5  | 45.6  | 45.4  | 45.52    |
| <b>cp 15</b> | 43.7  | 42.4  | 41.9  | 42    | 42.5  | 42.5     | <b>cp 48</b> | 48.3  | 48.5  | 48.1  | 48.3  | 48    | 48.24    |
| <b>cp 16</b> | 51    | 50    | 49.6  | 49.4  | 49.9  | 49.98    | <b>cp 49</b> | 52.9  | 53.1  | 53.6  | 53.3  | 53.2  | 53.22    |
| <b>cp 17</b> | 56    | 56    | 55    | 55    | 55.4  | 55.48    | <b>cp 50</b> | 50.9  | 51.2  | 50.3  | 50.9  | 50.9  | 50.84    |
| <b>cp 18</b> | 18.4  | 18.1  | 17.7  | 17.9  | 18    | 18.02    | <b>cp 51</b> | 53    | 53    | 52    | 53    | 52    | 52.6     |

|              |      |      |      |      |      |       |              |      |      |      |      |      |       |
|--------------|------|------|------|------|------|-------|--------------|------|------|------|------|------|-------|
| <b>cp 19</b> | 54   | 54   | 54   | 54   | 52.8 | 53.76 | <b>cp 52</b> | 58.2 | 58.2 | 58.3 | 58.1 | 58.5 | 58.26 |
| <b>cp 20</b> | 33.6 | 54   | 32.9 | 33.2 | 33.1 | 37.36 | <b>cp 53</b> | 43.7 | 42.9 | 44.4 | 42.2 | 44   | 43.44 |
| <b>cp 21</b> | 30.3 | 32.8 | 29.9 | 29.4 | 29.8 | 30.44 | <b>cp 54</b> | 47.9 | 47.6 | 47.7 | 47.8 | 47.7 | 47.74 |
| <b>cp 22</b> | 31   | 30   | 31.2 | 31.1 | 30.7 | 30.8  | <b>cp 55</b> | 49.3 | 49.4 | 49   | 49.4 | 49   | 49.22 |
| <b>cp 23</b> | 24.8 | 25.4 | 24.8 | 24.4 | 24.8 | 24.84 | <b>cp 56</b> | 43.9 | 43.7 | 43.8 | 43.8 | 43.8 | 43.8  |
| <b>cp 24</b> | 31.8 | 31.5 | 31.9 | 31   | 31.6 | 31.56 | <b>cp 57</b> | 51   | 49.5 | 50   | 50   | 50   | 50.1  |
| <b>cp 25</b> | 8.95 | 8.58 | 8.65 | 8.66 | 8.7  | 8.708 | <b>cp 58</b> | 42.9 | 42.9 | 42.8 | 42.4 | 42.9 | 42.78 |
| <b>cp 26</b> | 44.6 | 44.1 | 40.8 | 41.2 | 42.3 | 42.6  | <b>cp 59</b> | 43.9 | 43.8 | 43.7 | 43   | 43.1 | 43.5  |
| <b>cp 27</b> | 14.1 | 13.7 | 13.8 | 13.6 | 13.8 | 13.8  | <b>cp 60</b> | 53   | 51   | 52   | 50   | 51   | 51.4  |
| <b>cp 28</b> | 53   | 53   | 52   | 53   | 52   | 52.6  | <b>cp 61</b> | 42.3 | 42.5 | 42.4 | 42.5 | 42.4 | 42.42 |
| <b>cp 29</b> | 31.6 | 31.3 | 31.2 | 30.6 | 30.6 | 31.06 | <b>cp 62</b> | 44.6 | 44.8 | 44.6 | 44.8 | 44.7 | 44.7  |
| <b>cp 30</b> | 35.5 | 34.5 | 34.8 | 34.7 | 35.4 | 34.98 | <b>cp 63</b> | 34.1 | 34.2 | 34.1 | 34.2 | 34.1 | 34.14 |
| <b>cp 31</b> | 41.6 | 42.3 | 41.5 | 41.1 | 40.5 | 41.4  | <b>cp 64</b> | 59.1 | 59   | 59   | 59   | 59   | 59.02 |
| <b>cp 32</b> | 43.3 | 42.9 | 41.9 | 42.2 | 41.3 | 42.32 | <b>cp 65</b> | 41.3 | 41.5 | 41.2 | 41.5 | 41.3 | 41.36 |
| <b>cp 33</b> | 52   | 50   | 50   | 51   | 51   | 50.8  |              |      |      |      |      |      |       |



## 5.2 Inferencia Bayesiana

La amplificación del segmento interno del gen HSP70 se realizó en la PCR anidada para las 57 muestras de los individuos que participaron en este estudio. Las secuencias obtenidas mediante las metodologías descritas, que posteriormente recibimos en forma de electroferogramas nos permitieron asignar las secuencias a una especie de *Leishmania* específica mediante métodos filogenéticos. Cada uno de los electroferogramas de las 57 secuencias obtenidas en este estudio fueron editadas mediante el programa bioinformático UGENE para obtener una secuencia consenso de cada individuo, utilizando como secuencia de referencia la secuencia XM\_010702330.1 que pertenece a *Leishmania panamensis* del banco de datos NCBI en su portal de internet.

Utilizando 36 secuencias de referencia extraídas del GenBank (NCBI), las cuales engloban a 22 especies de *Leishmania* del Viejo y del Nuevo Mundo (cuadro 3), además de las 57 secuencias obtenidas en este estudio, montamos un alineamiento final de 93 secuencias incluyendo la secuencia consenso XM\_010702330.

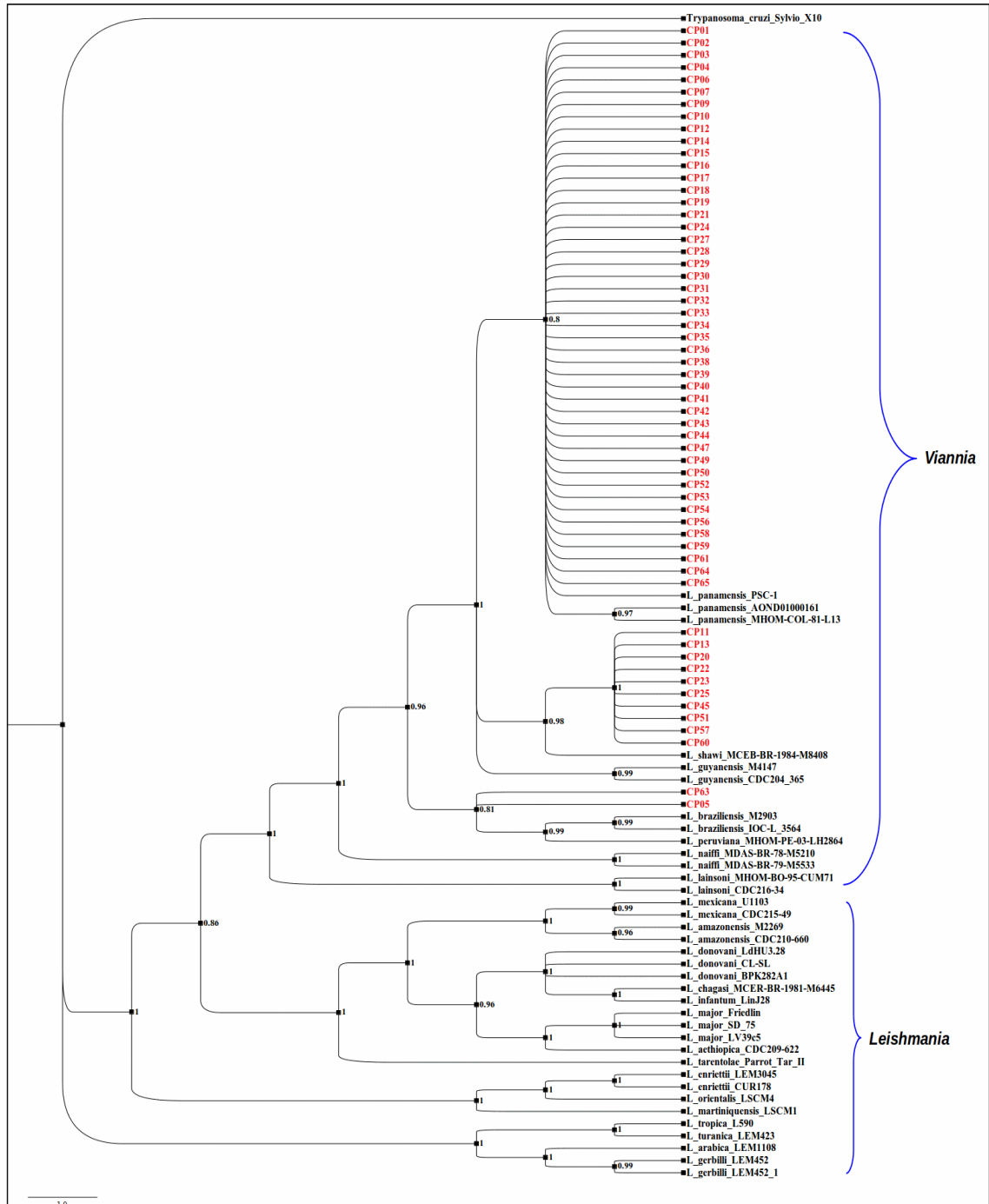
Las secuencias consenso adquiridas de cada uno de los individuos que participan voluntariamente en este estudio fueron sometidas a un alineamiento local (BLAST) en el portal de internet NCBI para determinar el porcentaje de similitud de cada una de las secuencias obtenidas con las secuencias establecidas en la base de datos de NCBI (ver Cuadro 4). Mediante el BLAST observamos que la mayoría de las secuencias tenían una coincidencia de 100% para *L. panamensis*, pero también observamos que al menos 10 secuencias eran secuencias variantes que parecían tener similitud con *L. guyanensis* y *L. panamensis*.

Posteriormente las 57 secuencias en estudio más las 36 secuencias de referencia son sometidas al método filogenético de Inferencia Bayesiana (IB) mediante el programa informático Mr Bayes 3.2.7. El IB realiza una simulación empleando el algoritmo conocido como Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para inferir la relación evolutiva entre las secuencias y acomodar la incertidumbre sobre el árbol filogenético y los parámetros del modelo (108). El análisis filogenético aplicado, separó los clados de *Viannia* y de *Leishmania* e identificamos inicialmente tres especies de *Leishmania*: *Leishmania panamensis* (83%), *Leishmania shawi, putativa* (16%) y *Leishmania braziliensis* (1%) (figura 18).

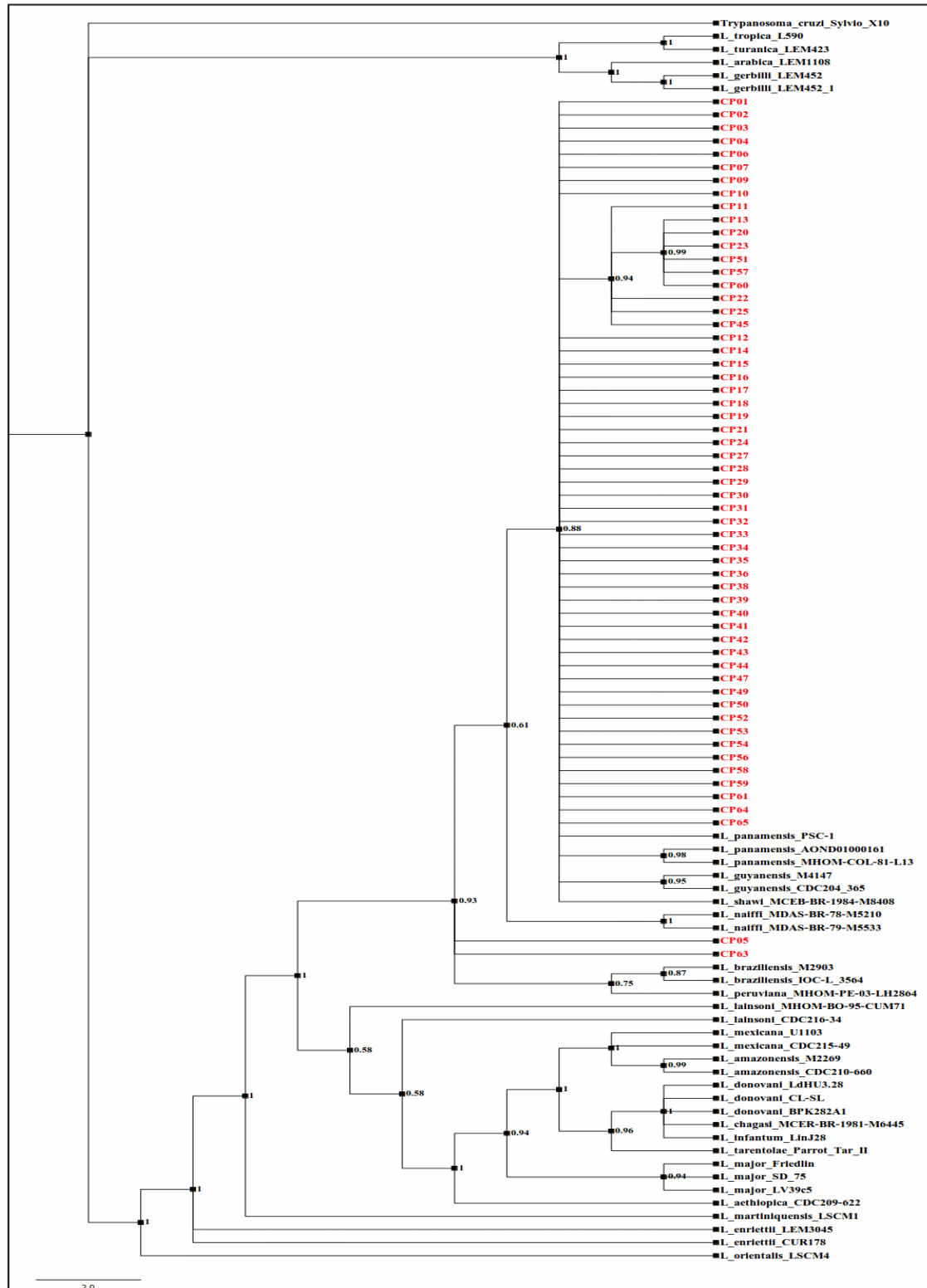
### Cuadro 3. Secuencias de referencia utilizadas para alineamiento.

Secuencias pertenecientes a *GenBank* utilizadas para el alineamiento en este estudio.

| Código GenBank     | Especie                | Código GenBank     | Especie                  |
|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| PSC_1              | <i>L. panamensis</i>   | CL_SL              | <i>L. donovani</i>       |
| AONDO1000161       | <i>L. panamensis</i>   | BPK282A1           | <i>L. donovani</i>       |
| MHOM_COL_81-L13    | <i>L. panamensis</i>   | MCER_BR_1981_M6445 | <i>L. chagasi</i>        |
| M4147              | <i>L. guyanensis</i>   | LinJ28             | <i>L. infantum</i>       |
| CDC204_365         | <i>L. guyanensis</i>   | Friedlin           | <i>L. major</i>          |
| MCEB_BR_1984_M8408 | <i>L. shawi</i>        | SD75               | <i>L. major</i>          |
| M2908              | <i>L. braziliensis</i> | LV39c5             | <i>L. major</i>          |
| IOC_L_3564         | <i>L. braziliensis</i> | LEM3045            | <i>L. enriettii</i>      |
| MHOM_PE_03_LH2864  | <i>L. peruviana</i>    | CUR178             | <i>L. enriettii</i>      |
| MDAS_BR_78_M5210   | <i>L. naiffi</i>       | LSCM1              | <i>L. martiniquensis</i> |
| MDAS_BR_79_M5533   | <i>L. naiffi</i>       | Parrot_Tar_II      | <i>L. tarentolae</i>     |
| CDC216_34          | <i>L. lainsoni</i>     | L590               | <i>L. tropica</i>        |
| MHOM_BO_95_CUM71   | <i>L. lainsoni</i>     | CDC209_622         | <i>L. aethiopica</i>     |
| U1103              | <i>L. mexicana</i>     | LEM1108            | <i>L. arabica</i>        |
| CDC215_49          | <i>L. mexicana</i>     | LEM452             | <i>L. gerbilli</i>       |
| M2269              | <i>L. amazonensis</i>  | LEM452_1           | <i>L. gerbilli</i>       |
| CDC210_660         | <i>L. amazonensis</i>  | LEM423             | <i>L. turanica</i>       |
| LdHV3.28           | <i>L. donovani</i>     | LSCM4              | <i>L. orientalis</i>     |



**Figura 18. Árbol filogenético bayesiano basado en un segmento interno del gen HSP70.** Este árbol de consenso bayesiano fue creado con el programa Mr. Bayes 3.2.7 después de 8 000, 000 ciclos de la cadena de *Markov Monte Carlo*. Los valores de credibilidad del clado se muestran como valores en cada nodo del clado. Los códigos de las secuencias de referencia aparecen en color negro y los códigos de las secuencias en estudio aparecen en color rojo.



**Figura 19.** Árbol filogenético Bayesiano basado en las secuencias de proteínas codificadas por el segmento del gen HSP70 en estudio. (Programa Mr. Bayes). En el análisis de las secuencias de proteínas codificadas por HSP70, las 10 secuencias variantes relacionadas evolutivamente con *L. shawi*, ahora son clasificadas como variantes de *L. panamenis*.

**Cuadro 4. Identificación de especies de *Leishmania* sp. en las heridas cutáneas.**  
Especies de *Leishmania* identificada en las heridas cutáneas de las personas que participaron voluntariamente en este estudio, obtenidas mediante el método de Inferencia Bayesiana.

| Individuo | % Concordancia<br>BLAST-NCBI                          | Especie determinada<br>por Inferencia<br>Bayesiana | Lugar<br>de procedencia | Código asignado<br>por GenBank                              |
|-----------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| CP01      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Chilibre, Panamá        | <a href="#">BankIt2781325 CP01</a> <a href="#">PP068057</a> |
| CP02      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Portobello, Colón       | <a href="#">BankIt2781325 CP02</a> <a href="#">PP068058</a> |
| CP03      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Portobello, Colón       | <a href="#">BankIt2781325 CP03</a> <a href="#">PP068059</a> |
| CP04      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Ernesto Córdoba,<br>Pma | <a href="#">BankIt2781325 CP04</a> <a href="#">PP068060</a> |
| CP05      | No determinado por<br>BLAST                           | <i>L. braziliensis</i>                             | Buena Vista, Colón      | <a href="#">BankIt2781325 CP05</a> <a href="#">PP068061</a> |
| CP06      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Guadalupe, Chorrera     | <a href="#">BankIt2781325 CP06</a> <a href="#">PP068062</a> |
| CP07      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Las Cumbres, Panamá     | <a href="#">BankIt2781325 CP07</a> <a href="#">PP068063</a> |
| CP09      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | El Cacao, Pmá Oeste     | <a href="#">BankIt2781325 CP09</a> <a href="#">PP068064</a> |
| CP10      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Pedregal, ,Pmá          | <a href="#">BankIt2781325 CP10</a> <a href="#">PP068065</a> |
| CP11      | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *                                  | 24 de Dic, Pmá          | <a href="#">BankIt2781325 CP11</a> <a href="#">PP068066</a> |
| CP12      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Barú, Chiriqui          | <a href="#">BankIt2781325 CP12</a> <a href="#">PP068067</a> |
| CP13      | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *                                  | 24 de Dic, Panamá       | <a href="#">BankIt2781325 CP13</a> <a href="#">PP068068</a> |
| CP14      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Atalaya, Veraguas       | <a href="#">BankIt2781325 CP14</a> <a href="#">PP068069</a> |
| CP15      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Burunga, Pmá Oeste      | <a href="#">BankIt2781325 CP15</a> <a href="#">PP068070</a> |
| CP16      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | 24 de Dic, Pmá          | <a href="#">BankIt2781325 CP16</a> <a href="#">PP068071</a> |
| CP17      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Nuevo Emperador         | <a href="#">BankIt2781325 CP17</a> <a href="#">PP068072</a> |
| CP18      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Demóstenes<br>Arosemena | <a href="#">BankIt2781325 CP18</a> <a href="#">PP068073</a> |
| CP19      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Cali, Colombia          | <a href="#">BankIt2781325 CP19</a> <a href="#">PP068074</a> |
| CP20      | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *                                  | Las Cumbres             | <a href="#">BankIt2781325 CP20</a> <a href="#">PP068075</a> |
| CP21      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Las Cumbres             | <a href="#">BankIt2781325 CP21</a> <a href="#">PP068076</a> |
| CP22      | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *                                  | Chilibre                | <a href="#">BankIt2781325 CP22</a> <a href="#">PP068077</a> |
| CP23      | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *                                  | Chilibre                | <a href="#">BankIt2781325 CP23</a> <a href="#">PP068078</a> |
| CP24      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Buena Vista, Colón      | <a href="#">BankIt2781325 CP24</a> <a href="#">PP068079</a> |
| CP25      | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *                                  | Santa Clara             | <a href="#">BankIt2781325 CP25</a> <a href="#">PP068080</a> |
| CP27      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Tocumen                 | <a href="#">BankIt2781325 CP27</a> <a href="#">PP068081</a> |
| CP28      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Chilibre                | <a href="#">BankIt2781325 CP28</a> <a href="#">PP068082</a> |
| CP29      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Santa Clara             | <a href="#">BankIt2781325 CP29</a> <a href="#">PP068083</a> |
| CP30      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Pedregal, Panamá        | <a href="#">BankIt2781325 CP30</a> <a href="#">PP068084</a> |
| CP31      | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>                               | Barrio Colón            | <a href="#">BankIt2781325 CP31</a> <a href="#">PP068085</a> |

|      |                                                       |                        |                                 |                                    |                          |
|------|-------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| CP33 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | 24 de Diciembre                 | <a href="#">BankIt2781325 CP33</a> | <a href="#">PP068087</a> |
| CP34 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Chilibre                        | <a href="#">BankIt2781325 CP34</a> | <a href="#">PP068088</a> |
| CP35 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Suadab, Comarcas                | <a href="#">BankIt2781325 CP35</a> | <a href="#">PP068089</a> |
| CP36 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | 24 de diciembre                 | <a href="#">BankIt2781325 CP36</a> | <a href="#">PP068090</a> |
| CP38 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Escobal, Colón                  | <a href="#">BankIt2781325 CP38</a> | <a href="#">PP068091</a> |
| CP39 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Veracruz, Panamá                | <a href="#">BankIt2781325 CP39</a> | <a href="#">PP068092</a> |
| CP40 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Chilibre                        | <a href="#">BankIt2781325 CP40</a> | <a href="#">PP068093</a> |
| CP41 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Sabanitas, Colón                | <a href="#">BankIt2781325 CP41</a> | <a href="#">PP068094</a> |
| CP42 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | San Martín, La Mesa             | <a href="#">BankIt2781325 CP42</a> | <a href="#">PP068095</a> |
| CP43 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Guadalupe, Chorrera             | <a href="#">BankIt2781325 CP43</a> | <a href="#">PP068096</a> |
| CP44 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Santa Clara, Arraiján           | <a href="#">BankIt2781325 CP44</a> | <a href="#">PP068097</a> |
| CP45 | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *      | 24 de Diciembre                 | <a href="#">BankIt2781325 CP45</a> | <a href="#">PP068098</a> |
| CP47 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Chorrera                        | <a href="#">BankIt2781325 CP47</a> | <a href="#">PP068099</a> |
| CP49 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Los Llanitos de San Carlos      | <a href="#">BankIt2781325 CP49</a> | <a href="#">PP068100</a> |
| CP50 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Las Margaritas Chepo            | <a href="#">BankIt2781325 CP50</a> | <a href="#">PP068101</a> |
| CP51 | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *      | Chilibre                        | <a href="#">BankIt2781325 CP51</a> | <a href="#">PP068102</a> |
| CP52 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Belisario Porras, San Miguelito | <a href="#">BankIt2781325 CP52</a> | <a href="#">PP068103</a> |
| CP53 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Las Cumbres                     | <a href="#">BankIt2781325 CP53</a> | <a href="#">PP068104</a> |
| CP54 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Santa Clara, Arraiján           | <a href="#">BankIt2781325 CP54</a> | <a href="#">PP068105</a> |
| CP56 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | El Chumical de Arraiján         | <a href="#">BankIt2781325 CP56</a> | <a href="#">PP068106</a> |
| CP57 | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *      | Pedregal, Panamá                | <a href="#">BankIt2781325 CP57</a> | <a href="#">PP068107</a> |
| CP58 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Caimitillo                      | <a href="#">BankIt2781325 CP58</a> | <a href="#">PP068108</a> |
| CP59 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Santa Clara, Arraiján           | <a href="#">BankIt2781325 CP59</a> | <a href="#">PP068109</a> |
| CP60 | 99.56% <i>L. panamensis</i><br>y <i>L. guyanensis</i> | <i>L. shawi</i> *      | Buena Vista, Colón              | <a href="#">BankIt2781325 CP60</a> | <a href="#">PP068110</a> |
| CP61 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Las Cumbres, Villa Grecia       | <a href="#">BankIt2781325 CP61</a> | <a href="#">PP068111</a> |
| CP63 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Villa Rosario, Capira           | <a href="#">BankIt2781325 CP63</a> | <a href="#">PP068114</a> |
| CP64 | 100 % <i>L. panamensis</i>                            | <i>L. panamensis</i>   | Santa Fe, Darién                | <a href="#">BankIt2781325 CP64</a> | <a href="#">PP068112</a> |
| CP65 | No determinado por BLAST                              | <i>L. braziliensis</i> | Cerro Azul                      | <a href="#">BankIt2781325 CP65</a> | <a href="#">PP068113</a> |

\*Especie relacionada evolutivamente con *L. shawi*. Para resolver el estatus de esta especie dentro del complejo guyanensis es necesario el aislamiento y posterior uso de un conjunto de otros marcadores moleculares o incluso el uso de genomas completos, características biológicas y epidemiológicas que ayuden a aplicar el concepto filogenético de especie para identificar definitivamente esta especie de *Leishmania*.

### **5.3 Hallazgos, detección de polimorfismos y mutaciones no sinónimas que producen cambios en los aminoácidos resultantes en la secuencia en estudio.**

La longitud del gen HSP70 es de 1965 pb y la longitud del segmento interno secuenciado es de 1364 pb. Con respecto a la frecuencia de las bases, la frecuencia de la base A osciló entre 0.205 a 0.220, la frecuencia de la base T osciló entre 0.08 a 0.150, la frecuencia de la base G osciló entre 0.350 a 0.365 y la frecuencia de la base C oscila entre 0.320 a 0.346. El segmento interno secuenciado del gen HSP70 es rico en guanina y citocina.

Realizamos un alineamiento de 36 cepas de referencias de *Leishmania* (cuadro 3) obtenidas de *Genbank* (NCBI) además de la secuencia consenso y las 57 secuencias en estudio. Observamos 52.2 % de sitios invariables y 47.8 % de sitios variables. Nuestra secuencia interna en estudio abarcó desde la posición 430 del gen HSP70 hasta la posición 1751 de dicho gen. Observamos un total de 738 sitios polimórficos y 76 singletons en esta secuencia, que nos ayudaron a separar a los miembros del complejo *Viannia* y del complejo *Leishmania*. De los 738 polimorfismos, 429 son transversiones y 309 son transiciones a lo largo del alineamiento (ver cuadro de polimorfismos en Anexos).

El análisis de la secuencia de nucleótidos y posteriormente la secuencia de aminoácidos, nos permite detectar mutaciones que afectan la secuencia proteica resultante. El gen HSP70 tiene un marco de lectura completo de 1965 pb y la secuencia interna en nuestro estudio después de la edición abarcó 1321 pb. Partiendo del codón de inicio GTG en la posición 432 del alineamiento de nucleótidos y buscando en la posición 154 en la traducción de aminoácidos observamos la primera mutación no sinónima que produce un cambio de aminoácido que distingue a *L. arabica* y *L. gerbilli* dentro del Complejo *Leishmania*. Por otro lado, en las posiciones 166, 255, 262 y 292 de la secuencia proteica encontramos cambios de aminoácidos que distinguen a *L. mexicana* y *L. amazonensis* dentro del Complejo *Leishmania*. Así mismo encontramos además 221 mutaciones no sinónimas que producen cambios de aminoácidos en la secuencia proteica resultante dentro del Complejo *Leishmania*, lo que permiten distinguir distintas especies dentro de este complejo (ver Cuadro de Aminoácidos en Anexos).

Dentro del Complejo *Viannia* detectamos 22 mutaciones no sinónimas en las diferentes posiciones de alineamiento de los aminoácidos resultantes. Así, en la posición 244 de aminoácidos resultantes detectamos la primera mutación no sinónima donde se produce un cambio del aminoácido serina por una treonina debido a una transversión (GxC) en la posición 731 de nucleótidos en la secuencia codificante, que distinguen a *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi* y *L. lansoni* dentro de ese complejo. A sí mismo en la posición 298 y 544 de aminoácidos se encuentra una mutación no sinónima que distingue a *L. lansoni* del resto de las especies del subgénero *Viannia*; en las posiciones 526, 530, 531, 534, 537 encontramos respectivamente los aminoácidos serina, glutamina, alanina, metionina y ácido glutámico que distinguen a todos los miembros del complejo *Viannia*. En la posición 544 de aminoácidos resultantes una mutación no sinónima que distingue a *L. lansoni*, y en las posiciones 556 y 557, se encuentran mutaciones no sinónimas que distinguen a *L. braziliensis*, a *L. peruviana* y a *L. naiffi* dentro del complejo *Viannia*. También observamos cambios de aminoácidos en las posiciones 567 y 568 que afectan a todo el complejo. Además, en las posiciones 572, 573, 575 y 580 de aminoácidos resultantes observamos que hay mutaciones no sinónimas que discriminan a *L. shawi*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y a *L. naiffi* dentro del Complejo *Viannia*. En la posición 572 de aminoácidos una mutación no sinónima distingue a *L. shawi* de *L. panamensis* de *L. guyanensis* y de *L. braziliensis* respectivamente. En la posición 573 y 580 de aminoácidos resultantes observamos que hay mutaciones no sinónimas que discriminan a *L. guyanensis* y a *L. shawi* de *L. panamensis* y de *L. braziliensis* dentro del Complejo *Viannia*.

Observamos en las secuencias en estudio varias mutaciones de un solo nucleótido que se pueden utilizar para distinguir especies dentro del género ya que producen cambio de aminoácidos en la secuencia proteica resultante.

En un análisis de las 10 secuencias de nuestro estudio que parecen estar relacionadas evolutivamente con *L. shawi* observamos que tienen una mutación sinónima en la posición 1173 de la región codificante que no produce cambios en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, en la posición 1576 de la región codificante se produce una mutación no sinónima (cambio de G X T) que si produce un cambio del aminoácido alanina por una serina en la secuencia proteica resultante. Así mismo en las posiciones 1600, 1679



y 1737 de la región codificante se presentan mutaciones no sinónimas que producen cambios de metionina a valina, de asparagina a serina y de ácido aspártico a ácido glutámico respectivamente en la secuencia proteica resultante que parece estar relacionada evolutivamente con *L. shawi*. Al realizar el análisis de las secuencias de aminoácidos codificadas por el segmento de ADN secuenciado encontramos que estas 10 secuencias variantes que anteriormente hemos relacionado evolutivamente con *L. shawi*, son ahora clasificadas como variantes de *L. panamensis* (figura 19), pero otros estudios deben ser realizados para ubicar esta variante dentro del subgénero *Viannia*, pues aunque hay similitud en la expresión con cepas de referencia de *L. panamensis*, sabemos que hay información a nivel nucleotídico que amerita realizar nuevos estudios.

En cuanto a las secuencias identificadas como *L. braziliensis* en este estudio, observamos dos mutaciones sinónimas, una en la posición 504 y la otra en la posición 1632 de la región codificante que no producen cambios de aminoácidos. A diferencia, en las posiciones 1666 y 1669 de la región codificante del genoma de *L. braziliensis* se producen cambios de nucleótidos que resultan en un cambio del aminoácido isoleucina por valina y de alanina por serina respectivamente, que permiten diferenciar esta especie dentro del Complejo *Viannia*. Las cepas ubicadas como *L. braziliensis* en este estudio, nos queda claro que hay diferencias a nivel de aminoácidos que la ubican cercana al complejo, pero tienen diferencias particulares de ella misma.

Por otro lado, encontramos una gran distancia genética que va desde 0.86 a 1.0 entre las secuencias del gen HSP70 del Complejo *Viannia* como son *L. shawi*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi* y *L. lainsoni* contra las secuencias *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tarentolae*, *L. enrietti*, *L. orientalis* y *L. martiniquensis*, que pertenecen al Complejo *Leishmania*. Esto demuestra que el segmento interno secuenciado de 1321 pb, seleccionado del gen HSP70 para realizar este estudio, puede discriminar especies entre los Complejos de *Leishmania* del Nuevo Mundo.

**Cuadro 5. Determinación de la carga parasitaria de *Leishmania* sp. en las heridas cutáneas por qPCR**

| <b>Individuo</b> | <b>Especie determinada por Inferencia Bayesiana</b>  | <b>Lesión en mm<sup>2</sup> piel</b> | <b>Nro Equivalente parásitos /µg DNA</b> |
|------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| CP01             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 30                                   | 1.397545000E+09                          |
| CP02             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 30                                   | 5.160000000E+05                          |
| CP03             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 130                                  | 2.518530000E+08                          |
| CP04             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 180                                  | 3.000000000E+03                          |
| CP05             | <i>Leishmania braziliensis</i>                       | 160                                  | 4.100000000E+04                          |
| CP06             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 143                                  | 5.928744180E+11                          |
| CP07             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 55                                   | 2.796406300E+10                          |
| CP08             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 42                                   | 6.132885074E+12                          |
| CP09             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 176                                  | 1.816733860E+14                          |
| CP10             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 450                                  | 1.066000000E+06                          |
| CP11             | Especie relacionada evolutivamente a <i>L. shawi</i> | 270                                  | 5.297980513E+17                          |
| CP12             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 84                                   | 8.814668797E+12                          |
| CP13             | Especie relacionada evolutivamente a <i>L. shawi</i> | 180                                  | 1.000000000E-02                          |
| CP14             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 714                                  | 3.861122663E+15                          |
| CP15             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 36                                   | 1.000000000E-02                          |
| CP16             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 575                                  | 8.634670455E+23                          |
| CP17             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 238                                  | 3.979194849E+12                          |
| CP18             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 154                                  | 1.952451000E+09                          |
| CP19             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 66                                   | 2.596942517E+13                          |
| CP20             | Especie relacionada evolutivamente a <i>L. shawi</i> | 1200                                 | 1.040000000E+05                          |
| CP21             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 207                                  | 3.282830000E+08                          |
| CP22             | Especie relacionada evolutivamente a <i>L. shawi</i> | 120                                  | 2.072311646E+14                          |
| CP23             | Especie relacionada evolutivamente a <i>L. shawi</i> | 63                                   | 1.000000000E-02                          |
| CP24             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 77                                   | 5.838086000E+09                          |
| CP25             | Especie relacionada evolutivamente a <i>L. shawi</i> | 77                                   | 1.000000000E-02                          |
| CP26             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 18                                   | 1.009000000E+06                          |
| CP27             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 225                                  | 5.036670000E+08                          |
| CP28             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 40                                   | 2.872891667E+13                          |
| CP29             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 4.8                                  | 7.823065000E+09                          |
| CP30             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 4.5                                  | 1.000000000E-02                          |
| CP31             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 4.32                                 | 8.486000000E+06                          |
| CP32             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 0.4                                  | 1.970898936E+13                          |
| CP33             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 53.3                                 | 5.060000000E+05                          |
| CP34             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 150                                  | 6.000000000E+04                          |
| CP35             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 28.8                                 | 1.000000000E-02                          |
| CP36             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 165                                  | 1.000000000E+03                          |
| CP37             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 1744.08                              | 1.029000000E+06                          |
| CP38             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 124                                  | 1.180000000E+05                          |
| CP39             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 132.5                                | 3.013300000E+07                          |
| CP40             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 35.04                                | 4.300000000E+04                          |
| CP41             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 37.8                                 | 3.275197500E+10                          |
| CP42             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 121                                  | 4.000000000E+03                          |
| CP43             | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 43.77                                | 2.042498540E+12                          |

|      |                                                      |        |                 |
|------|------------------------------------------------------|--------|-----------------|
|      |                                                      |        |                 |
| CP44 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 326.83 | 1.177700000E+07 |
|      |                                                      |        |                 |
| CP45 | <i>Especie relacionada evolutivamente a L. shawi</i> | 403.68 | 1.013800000E+07 |
| CP46 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 80.75  | 7.000000000E+04 |
| CP47 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 67.15  | 4.270000000E+05 |
| CP48 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 400    | 1.113633160E+11 |
| CP49 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 12     | 1.000000000E-02 |
| CP50 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 1722   | 2.870200000E+07 |
| CP51 | <i>Especie relacionada evolutivamente a L. shawi</i> | 50     | 1.000000000E+03 |
| CP52 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 85.56  | 3.165900000E+07 |
| CP53 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 130    | 2.434140000E+08 |
| CP54 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 120    | 5.767000000E+06 |
| CP55 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 52.78  | 4.104000000E+06 |
| CP56 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 173.81 | 4.016020000E+08 |
| CP57 | <i>Especie relacionada evolutivamente a L. shawi</i> | 8.75   | 1.782035750E+11 |
| CP58 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 100    | 3.298000000E+06 |
| CP59 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 540    | 1.915075000E+09 |
| CP60 | <i>Especie relacionada evolutivamente a L. shawi</i> | 490    | 1.681880000E+08 |
| CP61 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 17.68  | 1.142840477E+19 |
| CP62 | <i>Leishmania panamensis</i>                         | 180    | 2.827720597E+12 |

#### 5.4 Determinación de la distribución de las variables por la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*

##### *Smirnov*

Para evaluar la distribución de las variables a considerar en este estudio procedemos a realizar una prueba de *Kolmogorov-Smirnov* utilizando el programa informático *BioEstat* Versión 5.3 para determinar si cada una de esas variables sigue una distribución normal o no.

##### **Variable evaluada: tamaño de la lesión /Test *Kolmogorov-Smirnov***

###### **Programa BioEstat 5.3**

|                                   | - tamaño de lesión- |
|-----------------------------------|---------------------|
| Tamaño de la muestra =            | 62                  |
| Desvío máximo =                   | 0.2988              |
| Valor crítico unilateral (0.05) = | 0.1549              |
| Valor crítico unilateral (0.01) = | 0.193               |
| p(valor) unilateral               | < 0.01              |
| Valor crítico bilateral (0.05) =  | 0.1727              |
| Valor crítico bilateral (0.01) =  | 0.207               |

Resultado: P value=  $P < 0.01$ . Los datos del tamaño de la lesión en la piel, no siguen una distribución normal o no son paramétricos.

##### **Variable evaluada: carga parasitaria/ Test *Kolmogorov-Smirnov***

###### **Programa BioEstat 5.3**

|                                   | - carga parasitaria - |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Tamaño de la muestra =            | 62                    |
| Desvío máximo =                   | 0.5344                |
| Valor crítico unilateral (0.05) = | 0.1549                |
| Valor crítico unilateral (0.01) = | 0.193                 |
| p(valor) unilateral               | < 0.01                |
| Valor crítico bilateral (0.05) =  | 0.1727                |
| Valor crítico bilateral (0.01) =  | 0.207                 |
| p(valor) bilateral                | < 0.01                |

Resultado: P value=  $P < 0.01$ . Los datos de la carga parasitaria, no siguen una distribución normal o no son paramétricos.

**Variable evaluada: edad / Test Kolmogorov-Smirnov**

**BioEstat 5.3**

|                                   | - edad - |
|-----------------------------------|----------|
| Tamaño de la muestra =            | 62       |
| Desvío máximo =                   | 0.0702   |
| Valor crítico unilateral (0.05) = | 0.1549   |
| Valor crítico unilateral (0.01) = | 0.193    |
| p(valor) unilateral               | ns       |
| Valor crítico bilateral (0.05) =  | 0.1727   |
| Valor crítico bilateral (0.01) =  | 0.207    |
| p(valor) bilateral                | ns       |
|                                   |          |

Resultado: P value = no es significativo. Los datos de la edad de los individuos, siguen una distribución normal, son paramétricos.

**Variable evaluada: Tiempo de evolución de la herida (en días)**

**Test Kolmogorov-Smirnov**

**BioEstat 5.3**

|                                   | Kolmogorov-Smirnov |
|-----------------------------------|--------------------|
| Tamaño de la muestra =            | 62                 |
| Desvío máximo =                   | 0.2834             |
| Valor crítico unilateral (0.05) = | 0.1549             |
| Valor crítico unilateral (0.01) = | 0.193              |
| p(valor) unilateral               | < 0.01             |
| Valor crítico bilateral (0.05) =  | 0.1727             |
| Valor crítico bilateral (0.01) =  | 0.207              |
| p(valor) bilateral                | < 0.01             |

Resultado: P value=  $P < 0.01$ . Los datos de tiempo de evolución de la herida, no siguen una distribución normal o no son paramétricos.

Al determinar que las variables no siguen una distribución normal procedemos entonces a realizar un *test U de Mann y Whitney* mediante el programa informático *BioEstat 5.3* para hacer comparación entre las variables.

### 5.5 Pruebas de Hipótesis por la prueba *U* de Mann y Whitney.

#### Prueba de hipótesis para comparar el tamaño de la lesión en dos poblaciones con cargas parasitaria mayor de 10,000 y menor de 10,000

Tamaño de lesión en individuos con carga parasitaria > de 10,000 Nro. eq par/  $\mu$ g DNA humano

vs

Tamaño de lesión en individuos con carga parasitaria < de 10,000 Nro. eq par/  $\mu$ g DNA humano

#### Test *U* de Mann Whitney

##### BioEstat 5.3

| Resultado              | Lesión en carga >10 000 | Lesión en carga <10 000 |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Tamaño de la muestra   | 51                      | 11                      |
| Suma de rangos (Ri)    | 1689.5                  | 263.5                   |
| Mediana =              | 124                     | 63                      |
|                        |                         |                         |
| U =                    | 197.5                   |                         |
| Z(U) =                 | 1.5294                  |                         |
| p-valor (unilateral) = | 0.0631                  |                         |

Resultado: P valor= 0.06.

No hay diferencia significativa en el tamaño de la lesión debido a la carga parasitaria.

Por tal motivo debemos aceptar la hipótesis nula  $H_0 = M_1 = M_2$ , y asumimos que el tamaño de la lesión en la piel de las personas afectadas con leishmaniasis es independiente de la carga parasitaria.

**Prueba de hipótesis para comparar la carga parasitaria en ambos sexos.**

Carga parasitaria en masculinos

vs

Carga parasitaria en femeninas

***Test U de Mann Whitney***

**BioEstat 5.3**

| <b>Resultado</b>             | <b>Carga parasitaria en Masculinos</b> | <b>Carga parasitaria en Femeninas</b> |
|------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| Tamaño de la muestra         | 36                                     | 15                                    |
| Suma de rangos(Ri)           | 978                                    | 348                                   |
| Mediana =                    | 899573500                              | 328283000                             |
|                              |                                        |                                       |
| U =                          | 228                                    |                                       |
| Z(U) =                       | 0.8682                                 |                                       |
| p-valor (unilateral) =       | 0.1926                                 |                                       |
| <b>p-valor (bilateral) =</b> | <b>0.3853</b>                          |                                       |

Resultado: P valor = 0.38.

No hay diferencia significativa en la media de la carga parasitaria entre ambos sexos.

Aceptamos que la carga parasitaria es independiente del sexo de los individuos.

**Prueba de hipótesis para comparar la carga parasitaria entre individuos con lesiones con tiempo de evolución > 90 días e individuos con lesiones con tiempo de evolución < 90 DÍAS.**

Carga parasitaria en individuos con lesiones de menos de 90 días

Vs

Carga parasitaria en individuos con lesiones de más de 90 días

**Test U de Mann Whitney**

**BioEstat 5.3**

| Resultado              | Carga en lesión >90 días | Carga en lesión < 90 días |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Tamaño de la muestra   | 58                       | 4                         |
| Suma de rangos (Ri)    | 1842                     | 111                       |
| Mediana =              | 99923500                 | 3701000                   |
|                        | 101                      |                           |
| U =                    |                          |                           |
| Z(U) =                 | 0.4298                   |                           |
| p-valor (unilateral) = | 0.3337                   |                           |
| p-valor (bilateral) =  | 0.6673                   |                           |

Resultado: P valor: 0.66.

No hay diferencias significativas en la media de las cargas parasitarias entre individuos con heridas con un tiempo de evolución de menos de 90 días e individuos con un tiempo de evolución de la lesión de más de 90 días.

Aceptamos que en nuestro caso, la carga parasitaria de los individuos es independiente del tiempo de evolución de la herida, aunque tambien aceptamos que la mayoría de nuestras muestras eran de menos de 5 meses de evolución y no pudimos encontrar individuos con heridas de más de 6 meses de evolución.



**Prueba de hipótesis para comparar la carga parasitaria entre individuos menores de 18 años e individuos mayores de 18 años.**

Carga parasitaria en individuos menores de 18

vs

Carga parasitaria en individuos mayores de 18

**Test U de Mann Whitney**  
**BioEstat 5.3**

| <b>Resultado</b>             | <b>Carga en &gt; 18 años</b> | <b>Carga en &lt; de 18 años</b> |
|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Tamaño de la muestra         | 54                           | 8                               |
| Suma de rangos(Ri)           | 1730.5                       | 222.5                           |
| Mediana =                    | 99923500                     | 3097000                         |
|                              |                              |                                 |
| U =                          | 186.5                        |                                 |
| Z(U) =                       | 0.6194                       |                                 |
| p-valor (unilateral) =       | 0.2678                       |                                 |
| <b>p-valor (bilateral) =</b> | <b>0.5356</b>                |                                 |

Resultado: P valor= 0.53.

No hay diferencias significativas en la carga parasitaria entre los individuos menores de 18 años y mayores de 18 años.

Aceptamos que la carga parasitaria es independiente de la edad de los individuos.

**Prueba de hipótesis para comparar la carga parasitaria entre individuos infestados con *L. panamensis* e individuos infestados con *L. shawi* (putativa).**

Carga parasitaria en individuos infestados con *L. panamensis*  
vs  
Carga parasitaria en individuos infestados con *L. shawi*(putativa)

**Test U de Mann Whitney**

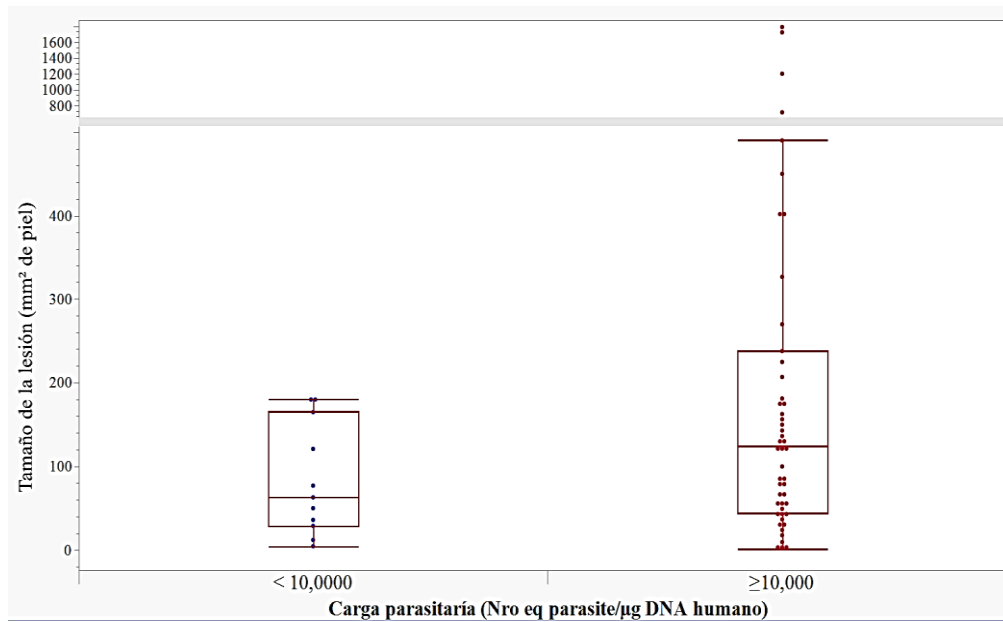
**BioEstat 5.3**

| Resultado              | Carga parasitaria de <i>L. panamensis</i> | Carga parasitaria de <i>L. shawi</i> (putativa) |
|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Tamaño de la muestra   | 51                                        | 10                                              |
| Suma de rangos(Ri)     | 1634.5                                    | 256.5                                           |
| Mediana =              | 243414000                                 | 5121000                                         |
|                        |                                           |                                                 |
| U =                    | 201.5                                     |                                                 |
| Z(U) =                 | 1.0422                                    |                                                 |
| p-valor (unilateral) = | 0.1487                                    |                                                 |
|                        |                                           |                                                 |
| p-valor (bilateral) =  | 0.2973                                    |                                                 |

Resultado: P valor= 0.29.

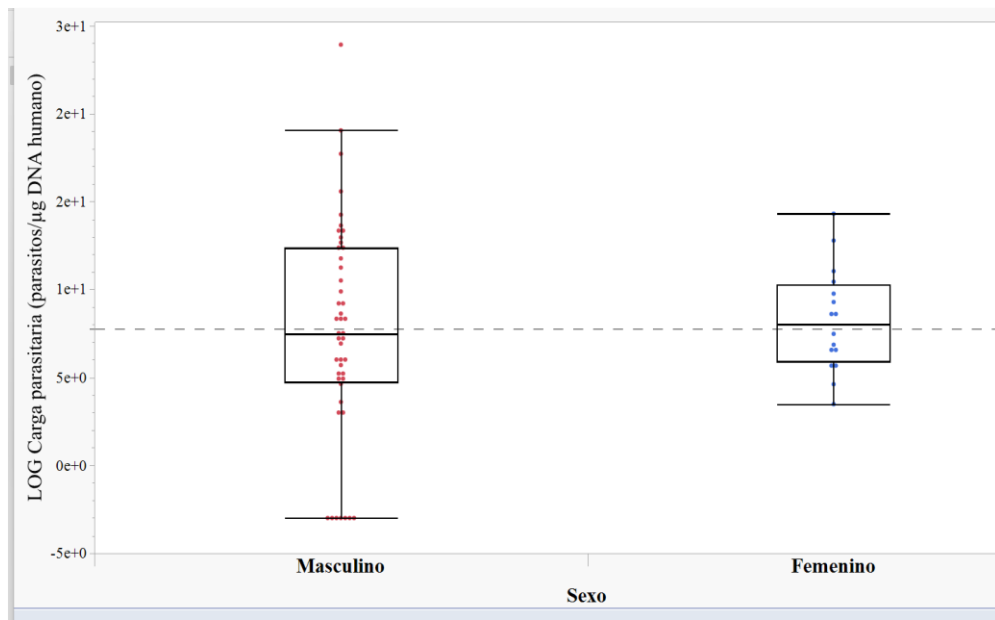
No hay diferencias significativas en la carga parasitaria entre los individuos debido a la especie de *Leishmania*.

Aceptamos que la carga parasitaria de los individuos es independiente de la especie de *Leishmania* encontrada en la herida, en nuestro caso *L. panamensis* y *L. shawi*(putativa).



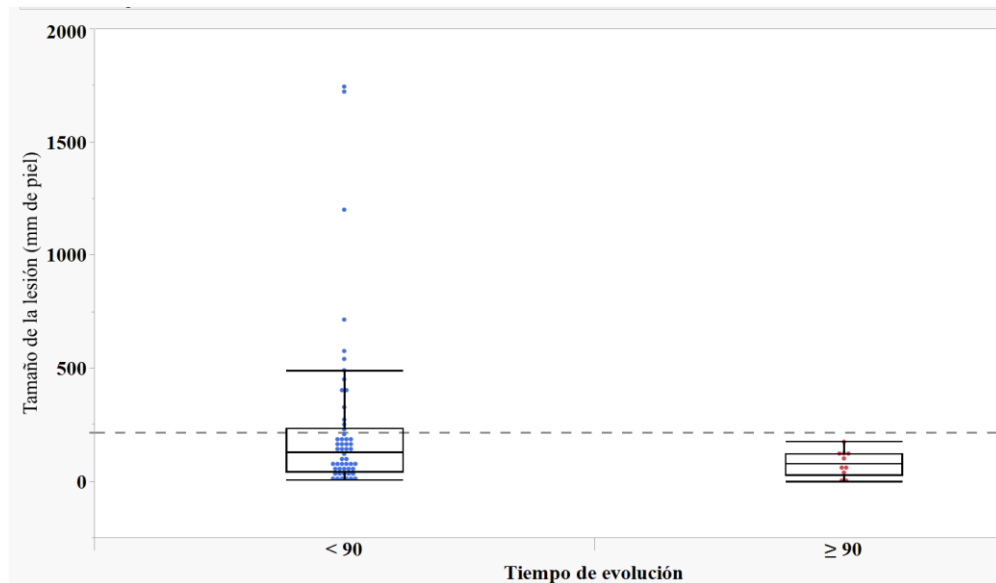
**Figura 20. Tamaño de la lesión en individuos con diferente carga parasitaria.**

No se observa diferencias en la media del tamaño de la lesión con respecto a la carga parasitaria (JMP 14.0).



**Figura 21. Carga parasitaria (en log) en individuos de ambos sexos.**

No se observan diferencias en la media de la carga parasitaria con respecto al sexo del individuo. (JMP 14.0).



**Figura 22. Tamaño de la lesión con respecto al tiempo de evolución de la lesión.**

No se observan diferencias en la media del tamaño de la lesión con respecto al tiempo de evolución de la lesión. (JMP 14.0).

## 5.6 Resultados de la prueba de límite de detección de los cebadores internos para el gen HSP70, diseñados en el Instituto Conmemorativo Gorgas.

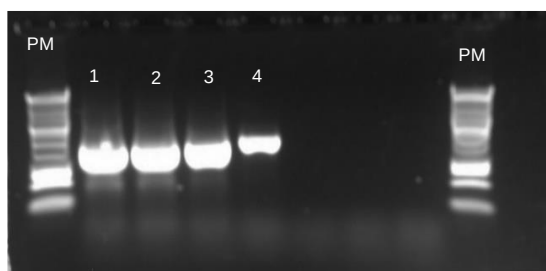
Se realizaron cultivos de parásitos de *Leishmania* sp. de diferentes cepas de referencias en medio bifásico NNN para realizar posterior extracción de DNA, para medir la sensibilidad de los cebadores internos utilizados en este estudio, según detalles en nuestra metodología. La cepas CP-008, CP-565 y CP-566 perteneciente a *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis* respectivamente mostraron bandas de captación del gen HSP70 hasta una concentración de 100 fentogramos al correr en gel de agarosa según la técnica descrita en nuestra metodología (figuras 23,24 y 25).



**Figura 23. Cepa 566. *Leishmania braziliensis*.**

**Estudio de sensibilidad para los cebadores internos.**

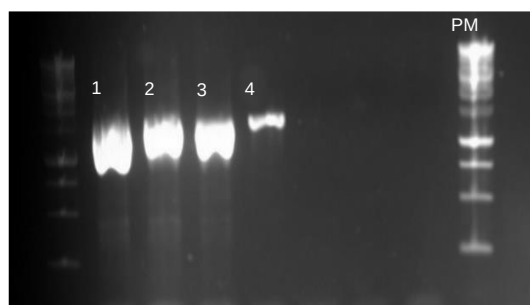
Se utilizó un marcador de peso molecular (PM) de 1000 KB en gel de agarosa y se observan en (1) la banda correspondiente a 100 pg. en (2) la banda correspondiente a 10 pg. en (3) la banda correspondiente a 1 pg. y en (4) la banda correspondiente a 100 fg, respectivamente



**Figura 24. Cepa *Leishmania panamensis*.**

**Estudio de sensibilidad para los cebadores internos.**

Se utilizó un marcador de peso molecular (PM) de 1000 KB en gel de agarosa y se observan en (1) la banda correspondiente a 100 pg. en (2) la banda correspondiente a 10 pg. en (3) la banda correspondiente a 1 pg. y en (4) la banda correspondiente a 100 fg, respectivamente



**Figura 25. Cepa 565. *Leishmania guyanensis*.**

**Estudio de sensibilidad para los cebadores internos.**

Se utilizó un marcador de peso molecular (PM) de 1000 KB en gel de agarosa y se observan en (1) la banda correspondiente a 100 pg. en (2) la banda correspondiente a 10 pg. en (3) la banda correspondiente a 1 pg. y en (4) la banda correspondiente a 100 fg, respectivamente

## **6.0 DISCUSIÓN**

HSP70 es un gen de 1959 pares de bases que está implicado en la adaptación de la célula a los factores de stress y codifica para una proteína de 657 aminoácidos que parece conferirle al parásito tolerancia al antimonio (20,93). El gen ha sido utilizado junto con el perfil de patrones de restricción (RFLP) como un gen blanco para la caracterización de *Leishmania* del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo y ha presentado buenos resultados utilizado con otros genes y proteínas para construir taxonomía y apoyo genético para todo el género (71,72,100,101). Sin embargo, últimos estudios reflejan la imposibilidad de este método, ampliamente utilizado, para distinguir *L.guyanensis* de *L. panamensis* en Panamá(44) y *L. guyanensis* de *L. linderbergi* en áreas de Brasil donde esta última es endémica (102).

Se han utilizado diferentes técnicas para el análisis del gen de HSP70 como por ejemplo el análisis de la curva de disociación de alta resolución de los amplicones o el perfil de los patrones de restricción del mismo (RFLP) (109–111). Sin embargo muchas de estas técnicas no son aplicables en muestras clínicas. Tomando en cuenta este hecho decidimos determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 1364 pb del gen HSP70 y realizar un análisis filogenético con 36 secuencias de referencia obtenidas del *GenBank*(NCBI), que engloban 22 especies que causan leishmaniasis en el Viejo y Nuevo Mundo pertenecientes a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. A nivel de la secuencia completa de este fragmento del gen de HSP70 encontramos 738 polimorfismos de un simple nucleotido y 76 singletons. De los 738 polimorfismos encontrados, 429 corresponden a transversiones y 309 son transiciones. De estas mutaciones, 226 SNPs corresponden a mutaciones no sinónimas que llevan a cambios de aminoácidos en la proteína final destacando la amplia variabilidad genética a nivel nucleotídico y aminoácido de este segmento genético. Esta variabilidad genética a nivel de los 1464 pb evaluados es respaldada por la gran distancia genética encontrada entre las especies de ambos subgeneros que osciló entre 0.86 a 1.0 dependiendo de las especies comparadas. En resumen, el análisis completo de este segmento genético nos permitió identificar una cantidad substancial de polimorfismos que sugieren que este fragmento del gen de HSP70 tiene un alto potencial para la discriminación de especies del género *Leishmania*. De hecho, nosotros encontramos diferentes polimorfismos en el segmento de 1364 pb que diferencian las especies de *Leishmania* de los subgeneros *Leishmania* y *Viannia* y que junto

a la distancia genética encontrada sustentan su capacidad para utilizar este marcador molecular en la discriminación de especies de ambos subgéneros. Nosotros encontramos 221 mutaciones no sinónimas que producen cambios en la secuencia proteica resultante dentro del Complejo *Leishmania*, lo que permiten distinguir distintas especies dentro de este complejo tales como *L. donovani*, *L. infantum*, *L. aethiopica* y *L. tropica*, del Viejo Mundo. Dentro del Complejo *Viannia* detectamos 22 mutaciones no sinónimas en las diferentes posiciones de alineamiento de los aminoácidos. Fue posible distinguir a *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi* y *L. lansoni* dentro de ese complejo. Además, logramos detectar mutaciones no sinónimas en el segmento de gen HSP70 estudiado que alteran la secuencia de aminoácidos resultantes y que discriminan a *L. shawi*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y a *L. naiffi* dentro del Complejo *Viannia*. Nuestras observaciones son compatibles con Montalvo y colaboradores (72) aunque ellos manifiestan limitaciones para distinguir *L. naiffi* de *L. panamensis* y *L. chagasi* de *L. infantum*.

El primer reporte del uso del gen del HSP70 para la determinación de especies del género *Leishmania* fue hecho por Garcia y colaboradores en el año 2004 utilizando 59 secuencias de referencia (71), seis años después este sistema de PCR fue evaluado adicionalmente con un conjunto de 45 cepas de referencia del Viejo y del Nuevo mundo y un conjunto de enzimas de restricción que ayudan en la discriminación de especies del género *Leishmania* resultando en un protocolo ampliamente utilizado actualmente para la discriminación de especies de *Leishmania* sp. (72). Durante la elaboración de este protocolo también se describió un grupo de SNPs que conforman sitios de restricción específicos para las enzimas mencionadas, sin embargo, no se describe minuciosamente otros polimorfismos que podrían tener suficiente señal filogenético para la asignación de especie utilizando el concepto filogenético de especie el cual es aplicado en organismos como *Leishmania* que no cumple a cabalidad con el concepto biológico de especie. Debido a la falta de evaluación de esta metodología con un grupo mayor de secuencias de referencia representativas de la variabilidad genética encontrada en el gen HSP70 han surgido problemas en la asignación de especie por PCR-RFLP como es el caso de *L. lindenbergi* y *L. guyanensis* circulando en el bioma amazónico en Brasil (102) o en la discriminación de *L. guyanensis* y *L. panamensis* en Panamá aplicando esta metodología (44).



Además, se han reportado variantes de este gen con propiedades medicas relevantes con diferencias en el numero de sitios de restricción debido a mutaciones puntuales que modifican estos sitios y que desafian la discriminación de especie por PCR-RFLP (112) Otro aspecto importante que hay que tomar en cuenta en el uso de este gen para el diagnóstico molecular y determinación de especie directo de muestras clínicas es su falta de sensibilidad. Esta falta de sensibilidad recae en el limitado número de copias de este gen lo que hace la detección de parásitos del género *Leishmania* en muestras clínicas con baja parasitemia, un desafio. En la descripción original del gen HSP70 en *L. major*, *L. amazonensis* y *L. infantum* se destaca la organización en arreglos consecutivos de 6 a 8 copias de este gen (113). Este bajo número de copias hace necesario el uso de metodologías más sensibles para la detección y determinación de especies, usando este gen directo en muestras clínicas como lo son el PCR en tiempo real o el PCR anidado. Debido a la necesidad de disponer de herramientas moleculares locales sensibles y específicas para la detección y determinación de especie desarrollamos un PCR anidado para la discriminación de especie e implementamos un qPCR para la detección y determinación de carga de parásitos del genero *Leishmania* directo de muestras clínicas.

Un PCR anidado similar al nuestro, fue inicialmente publicado por Kato y colaboradores en el año 2019 y aunque no fue reportada su limite de detección fue utilizado con éxito en la discriminación de especie por PCR-RFLP directo de muestras clínicas de pacientes ecuatorianos (114). Sin embargo, los fragmentos externo e interno obtenidos por este método tienen un tamaño de 847 pb y 468 pb respectivamente, lo que posiblemente sea un problema para la discriminación de especies de *Leishmania* sp. utilizando el concepto filogenético de especie. Por tal motivo decidimos diseñar un conjunto de cebadores internos que amplifican un fragmento mayor (1364 pb) del gen HSP70, el cual mostró con un conjunto de 36 muestras de referencia su potencial para discriminar especies del género *Leishmania*. Utilizando dos grupos de cebadores en el PCR anidado conseguimos obtener un limite de detección de 100 fentogramos utilizando *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, lo que equivale a al menos un parásito y sugiere que la técnica es capaz de detectar el parásito en muestras clínicas con carga parasitaria baja y determinar la especie por métodos filogenéticos. El PCR anidado presentado en este trabajo mostró tener un limite de detección similar a otros métodos basados en el mismo gen y utilizados en

muestras clínicas con excepción de *L. braziliensis* en la cual el límite de detección fue inferior a 100 fentogramos (115,116). La sensibilidad observada en especies del subgénero *Viannia* con el método empleado en este estudio y la abundancia en polimorfismos a lo largo del fragmento amplificado el cual es mayor que los previamente reportados para este gen, sugiere la utilidad del mismo para identificar molecularmente las especies del subgénero *Viannia* que circulan en áreas endémicas de Panamá.

Para corroborar la capacidad del PCR anidado para discriminar especies de *Leishmania* directo de muestras clínicas aplicamos esta metodología a 65 muestras clínicas confirmado por el Laboratorio de Referencia de leishmaniasis del Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud como positivas para leishmaniasis. Con la metodología desarrollada en el estudio pudimos amplificar el 100% de las muestras clínicas y discriminar la especie por PCR anidada, secuenciación del fragmento amplificado y análisis filogenético. Las secuencias del gen HSP70 de cincuenta y siete muestras evaluadas (83%) agruparon en el árbol junto a las cepas de referencia de *L. panamensis* lo que confirma que la mayoría de las muestras clínicas pertenecen a esta especie de *Leishmania*. Este resultado era esperado ya que estudios previos muestran que el 80% de los casos de leishmaniasis tegumentaria en el país son causadas por esta especie de *Leishmania* (1,16).

Además de *L. panamensis*, encontramos en 10 personas que participan del estudio (16%) una especie de *Leishmania* del subgénero *Viannia* que se ubicó en el árbol filogenético dentro de las especies del complejo guyanensis, agrupando específicamente con una cepa de referencia de *L. shawi*. Sin embargo, encontramos cinco SNPs que separan las secuencias de esta especie de la de la cepa de referencia de *L. shawi* que es un número de polimorfismos mayor que los que separan a *L. panamensis* de *L. guyanensis* con esta metodología, los cuales son solamente dos. Para resolver el estatus de esta especie dentro del complejo guyanensis es necesario el aislamiento y posterior uso de un conjunto de otros marcadores moleculares o incluso el uso de genomas completos, además de las características biológicas y epidemiológicas que ayuden a aplicar el concepto filogenético de especie para identificar definitivamente esta especie de *Leishmania*. Por otro lado, la secuencias de HSP70 de dos de las muestras clínicas obtenidas en nuestro estudio

agruparon con secuencias de referencia de *L. braziliensis* en el árbol filogenético. Un estudio previo utilizando un fragmento menor del gen de HSP70 para la discriminación de especies de *Leishmania* reportó la presencia en baja frecuencia de *L. braziliensis* en algunos lugares endémicos de nuestro país además de *L. naifi* y *L. guyanensis* (117). No cabe duda de que cambios ecológicos relacionados a actividades y movimiento poblacional con cambios demográficos subsecuentes han facilitado la participación de especies del subgenero *Viannia* eminentemente silvestres en ciclos de transmisión doméstico/peridoméstico de la enfermedad. Este cambio amerita el desarrollo de técnicas sensibles como las técnicas moleculares desarrolladas en este estudio que ayuden al sistema de vigilancia epidemiológico a identificar las especies locales de *Leishmania* y conocer su distribución en el país.

El advenio de la biología molecular y el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación masiva, además de la disponibilidad actual de equipos biomédicos avanzado ha permitido el desarrollo de métodos moleculares sensibles y específicos que facilitan el estudio de agentes etiológicos de importancia médica. Este es el caso del *qPCR*, la evolución actual del *PCR* convencional, el cual permite el monitoreo en tiempo real de la amplificación de blancos moleculares, la cuantificación de la carga y estudios de la expresión genética de agentes etiológicos específicos. La sensibilidad de esta técnica se estima ser de 10 a 100 veces superior a la del *PCR* convencional y como se detecta la emisión de fluorescencia durante la acumulación del producto amplificado en el mismo tubo de *PCR*, se evita etapas posteriores que aumentan las probabilidades de contaminación en el laboratorio. Al día de hoy, no existe un método y flujo de trabajo consensado utilizando técnicas altamente sensibles y específicos como el *qPCR* para la detección de parásitos del género *Leishmania* y determinación de su carga directa de muestras clínicas que ayuden en el manejo del paciente con la enfermedad. El desarrollo del flujo de trabajo de esta técnica debe implicar el uso de controles externos e internos y de amplificación que faciliten la detección confiable del parásito y eviten el reporte de falsos positivos y negativos en los laboratorios de las redes de diagnóstico de leishmaniasis en las Américas.

Los marcadores mayormente empleados en la detección y determinación de carga parasitaria directo de muestras clínicas de *Leishmania* sp. en la actualidad son segmentos específicos de los genes kDNA y 18S rDNA . Estos dos marcadores debido a su alto número de copias, 200 a 400 en el caso del 18S rDNA y 10,000 a 20,000 en el caso del kDNA han demostrado un límite de detección y de determinación de carga de DNA equivalente a  $1.0 \times 10^{-1}$  parásitos/mililitro y  $1 \times 10^{-2}$  parásitos/mililitro para los marcadores 18S rDNA y kDNA, respectivamente (118,119).

Protocolos qPCR basados en estos dos marcadores han demostrado la capacidad de detectar bajas cargas parasitarias de parásitos del género *Leishmania* en muestras clínicas por lo que son considerados excelentes candidatos para su implementación como métodos de elección para detectar y determinar carga parasitaria del género *Leishmania* en muestras clínicas.

La implementación de técnicas sensibles, específicas y que ayuden en la detección del agente causal y en el manejo del paciente sobretodo en enfermedades negligenciadas es de suma importancia para los programas de vigilancia y control locales y regionales. La enfermedad de leishmaniasis es considerada una enfermedad desatendida la cual actualmente no cuenta con un flujo de trabajo común para la detección molecular de parásitos del género *Leishmania* en las Américas. Esto quiere decir que no existe un consenso en los protocolos para la detección del parásito en los países latinoamericanos y la mayoría de estas metodologías establecidas difieren en aspectos importantes como lo son el tipo de marcador molecular empleado, los métodos de extracción, controles de calidad interno y externo y los métodos moleculares empleados para la detección. Esto lleva a los laboratorios de investigación y de la red diagnóstica de países endémicos a establecer protocolos con marcadores moleculares cuyo desempeño ya haya sido evaluado en estudios científicos. En este sentido, los marcadores más utilizados para la detección y determinación de carga parasitaria directo de muestras clínicas son el 18S rDNA y DNA del cinetoplasto (kDNA) de parásitos del género *Leishmania* sp. Ambos marcadores han mostrado alta eficiencia y alta sensibilidad en los límites de detección y determinación de carga parasitaria cuando fueron utilizados en muestras clínicas. Por este motivo decidimos implementar un protocolo de qPCR basado en sondas taqman utilizando kDNA como

marcador molecular con el propósito de detectar el parásito y su carga en muestras clínicas de pacientes sospechosos de leishmaniasis. Protocolos basados en las regiones conservadas de los minicírculos de *Leishmania* sp. han demostrado una gran sensibilidad debido al número de copias de este marcador (10,000 minicírculos) lo que lo hace ideal para la detección y determinación de carga de parásitos de este género (16,120–122).

El uso del método de *qPCR* implementado en nuestro laboratorio en conjunto con la toma de muestra directa de la lesión utilizando un dispositivo citológico (*citology brush*) mostró una eficacia en la detección del parásito en muestras clínicas de alrededor de 100% cuando se comparó con la detección hecha mediante *PCR* convencional basado en *nested PCR* utilizado en este estudio para determinar especie. Otros protocolos basados en la detección mediante *qPCR* aunado a una toma de muestra utilizando cepillos citológicos o palillos de algodón demostraron una excelente sensibilidad en la detección de parásitos del subgénero *Viannia* directa de muestras clínicas ulceradas (99).

La toma de muestra utilizando estos dispositivos citológicos representan formas menos invasivas de obtener suficiente material de la dermis que permita la detección y determinación de carga del parásito en muestras clínicas de *Leishmania*. Al ser menos invasivo la toma de muestras se podrían utilizar en lesiones ulceradas en el rostro, extremidades y tronco de las personas afectadas como también en lesiones mucocutáneas del paladar blando facilitando la detección y determinación de carga en este tipo de muestras. Además, el uso del *citology brush* junto a un amortiguador que preserve a temperatura ambiente el material genético del parásito facilitaría el transporte de las muestras desde regiones de difícil acceso a centros de referencia en donde se utilicen métodos moleculares como el *qPCR* para la detección molecular del parásito. Además, la implementación de un ensayo dúplex utilizando un control interno, el gen que codifica la *RNAseP* humana, permite la determinación de falsos negativos y la presencia de posibles inhibidores en la muestra de ADN extraída lo que garantiza una detección y determinación de carga de una manera confiable. El desarrollo de un método para la detección de parásitos del género *Leishmania* requieren la utilización de controles en etapas críticas del protocolo como lo son la etapa de extracción del material genético y detección del marcador molecular empleado (123). En este sentido la adición de estos controles al protocolo

empleado en este estudio nos permitió implementar un método de qPCR capaz de detectar y determinar la carga parasitaria de parásitos del subgenero *Viannia* directo de muestras clínicas con los requerimientos de calidad necesarios para garantizar la confiabilidad del resultado final. De hecho la tendencia actual es incorporar este tipo de controles en protocolos de qPCR como los previamente descritos basado en los marcadores moleculares 18 rDNA y kDNA.

Durante la implementación encontramos un límite de detección y determinación de carga similar a los antes reportados para este marcador alcanzando un límite de detección y cuantificación de DNA equivalente a  $10^{-2}$  parásitos por reacción. Esto garantiza la detección y cuantificación de cargas menores de un parásito en muestras clínicas de leishmaniasis utilizando el método ya implementado en el laboratorio. Valores similares de detección y determinación de carga utilizando este marcador ya habían sido previamente reportados (84). De hecho en las muestras clínicas evaluadas en este estudio se determinaron cargas tan bajas como  $1.0000000000E-02$  parásitos equivalentes /  $\mu\text{g}$  de células humanas y tan altas como  $8.634670455E+23$  parásitos equivalentes /  $\mu\text{g}$  de células humanas.

Al correlacionar las variables estudiadas con la carga parasitaria encontrada en las lesiones de los pacientes no encontramos diferencia significativa entre el promedio de carga parasitaria y las variables sexo, edad, especie de *Leishmania* y tamaño de la lesión. Estudios previos que relacionaron carga parasitaria con las mismas variables tampoco encontraron correlación (84, 91). En estos estudios se emplearon los marcadores kDNA y 18s rDNA y no se encontraron diferencias significativas entre el tamaño de la lesión, edad, sexo o especie de *Leishmania* y la carga parasitaria determinada. Sin embargo, la mayoría de nuestras secuencias(83%) fueron clasificadas como *L. panamensis* y procedían de lesiones con menos de 5 meses de evolución y pudimos observar por lo general alta carga de parásitos mediante la cuantificación por kDNA.

Las lesiones de leishmaniasis tegumentaria son el resultado final de la interacción entre el parásito y el hospedero humano y factores genéticos del parásito e inmunogenética del hospedero afectan directamente el desenlace final de la enfermedad. El tamaño de la lesión puede ser considerado como un producto de la severidad de la enfermedad y debido a la falta de relación entre carga parasitaria y tamaño de la lesión, marcadores

inmunológicos de cura o severidad de la enfermedad podrían ser utilizados como alternativa. En el caso de *L. panamensis*, el principal agente etiológico de la leishmaniasis tegumentaria en Panamá, los linfocitos T reguladores tienen un rol importante en la regulación negativa de la expresión de citocinas inflamatorias lo que lleva a una disminución del reclutamiento de estas células por el hospedero lo que lleva a una reducción del tamaño de la lesión (124).

Por otro lado, estudios *in vivo* de *L. braziliensis* han encontrado que la subfamilia de la interleucina 10 es esencial para el proceso de cura de la enfermedad manteniendo las propiedades de reparación de la piel y limitando la patología independiente del control del parásito (125). Es evidente que biomarcadores inmunológicos como los niveles de citocina podrían ser una alternativa factible para la investigación de la patogénesis de la enfermedad (126,127)

Pensamos que nuestra técnica *qPCR* con los biomarcadores *kDNA* y *RNAseP* puede ser utilizada en Panamá para ayudar al manejo de pacientes en la detección de parásitos del subgénero *Viannia* y monitorear, futuramente, si la carga parasitaria puede determinar el éxito del tratamiento o la falla terapéutica. Nuestra técnica podría ser empleada para detección de parásitos de *Leishmania* sp., pronóstico del tratamiento y en el tamizaje de vectores. La estandarización y validación de un método *qPCR* consenso permite la posibilidad de ofrecer una técnica altamente especializada a los centros de diagnóstico en Panamá, facilitando de este modo la detección de *Leishmania* sp. en casos específicos en donde los métodos parasitológicos clásicos no tienen sensibilidad.

## **7.0 CONCLUSIONES**



- Determinamos que el fragmento interno evaluado con 1364 pb correspondiente al gen HSP70 demostró suficientes polimorfismos para discriminar los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* y también para discriminar especies dentro del subgénero *Viannia*.
- Corroboramos que *Leishmania panamensis* es el agente causal de la mayoría de las lesiones por causa de la leishmaniasis tegumentaria en Panamá.
- Determinamos que 16 % de los individuos que participaron en nuestro estudio están parasitados con una especie de *Leishmania* dentro del complejo guyanensis, relacionada evolutivamente con *L. shawi*, pero con 5 SNPs que la separan de *L.shawi*, que es una cantidad mayor de SNPs de los que separan a *L. panamensis* de *L.guyanensis*, sin embargo, mediante el análisis de proteínas la especie fue clasificada como una variante de *L. panamensis*, por lo cual es necesario realizar otros estudios para ubicar esta variante dentro del subgénero *Viannia*.
- Corroboramos que no existe relación entre la carga parasitaria y el tamaño de la lesión cutánea en los individuos afectados con leishmaniasis tegumentaria. También corroboramos que no existe relación entre la carga parasitaria y otras variables como edad, sexo, tiempo de evolución de la lesión o la especie de *Leishmania*, lo que nos sugiere que las lesiones de leishmaniasis tegumentaria son el resultado final de la interacción entre el parásito y el hospedero humano y factores genéticos del parásito e inmunogenética del hospedero que afectan directamente el desenlace de la enfermedad.
- Concluimos que en conjunto nuestras metodología de PCR anidada y la qPCR aplicadas en este estudio son sumamente eficaces para la detección, discriminación y cuantificación de *Leishmania sp.*

## 8.0 RECOMENDACIONES

Nuestras recomendaciones son las siguientes:

- Validar nuestra metodología para uso en el sistema de salud público en Panamá.
- Desarrollar más estudios con nuevos biomarcadores para asociar la patogénesis del parásito a la enfermedad y que permitan detectar identificar y cuantificar al parásito mediante *qPCR*.
- Dirigir los estudios hacia la solución y prognosis de la enfermedad, monitoreo del tratamiento y evaluación de las terapias aplicadas.
- Realizar tamizajes de vectores y reservorios para comprender mejor las interacciones parásito-hospedero que permitan un manejo integral de este gran problema de salud pública en Panamá.

## **9.0 ANEXOS**

## **CUADROS DE NUCLEÓTIDOS**

Polimorfismos encontrados en el segmento interno del gen HSP70 analizado en este estudio

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 432 | 434 | 438 | 444 | 447 | 453 | 456 | 459 | 460 | 474 | 477 | 483 | 484 | 486 | 489 | 490 | 491 | 492 | 495 | 496 | 498 | 501 | 504 | 505 | 507 | 510 | 511 | 516 | 531 | 534 | 537 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i>     | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | A   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. guyanensis</i>     | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | A   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. shawi</i>          | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | A   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. braziliensis</i>   | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. peruviana</i>      | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. naiffi</i>         | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. lainsoni</i>       | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |
| <i>L. mexicana</i>       | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. amazonensis</i>    | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. donovani</i>       | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. chagasi</i>        | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. infantum</i>       | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. major</i>          | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | A   |
| <i>L. enrietti</i>       | G   | T   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. martiniquensis</i> | G   | T   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | T   | G   | A   | T   | G   | T   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. tarentolae</i>     | G   | T   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | T   | G   | G   | G   | G   | C   | T   | G   | A   | G   |
| <i>L. tropica</i>        | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. aethiopica</i>     | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | T   | G   | T   | G   | G   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |
| <i>L. arabica</i>        | C   | A   | G   | A   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | G   | C   | T   | C   | T   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | G   |
| <i>L. gerbilli</i>       | C   | A   | G   | A   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | G   | C   | T   | C   | G   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | G   |
| <i>L. turanica</i>       | G   | T   | G   | G   | G   | C   | C   | C   | T   | A   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | C   | C   | C   | G   | T   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | A   |
| <i>L. orientalis</i>     | G   | T   | G   | G   | A   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | T   | G   | A   | G   | G   | G   | C   | C   | G   | G   | G   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 540 | 543 | 546 | 549 | 555 | 556 | 558 | 559 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 | 567 | 569 | 570 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 | 583 | 584 | 585 | 589 | 591 | 594 | 595 | 606 | 609 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i>     | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. guyanensis</i>     | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. shawi</i>          | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. braziliensis</i>   | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. peruviana</i>      | G   | C   | C   | A   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. naiffi</i>         | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. lainsoni</i>       | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. mexicana</i>       | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. amazonensis</i>    | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. donovani</i>       | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. chagasi</i>        | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. infantum</i>       | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. major</i>          | G   | C   | C   | G   | T   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. enrietti</i>       | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. martiniquensis</i> | G   | C   | C   | G   | T   | C   | A   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | T   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. tarentolae</i>     | G   | C   | C   | G   | T   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. tropica</i>        | C   | T   | C   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | A   | A   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | G   | A   | A   | G   | G   | C   | A   | T   | C   |
| <i>L. aethiopica</i>     | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. arabica</i>        | G   | C   | A   | G   | G   | C   | T   | A   | A   | A   | A   | A   | G   | C   | T   | G   | C   | G   | C   | A   | A   | G   | A   | A   | G   | A   | C   | G   | G   | C   | T   |
| <i>L. gerbilli</i>       | G   | C   | A   | G   | G   | C   | T   | A   | A   | A   | A   | G   | C   | T   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | A   | A   | G   | A   | C   | G   | G   | C   | T   |
| <i>L. turanica</i>       | G   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |
| <i>L. orientalis</i>     | C   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | A   | T   | C   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                               | 628 | 634 | 636 | 639 | 645 | 646 | 647 | 648 | 651 | 652 | 654 | 663 | 664 | 665 | 666 | 669 | 672 | 673 | 674 | 675 | 678 | 681 | 684 | 690 | 693 | 696 | 705 | 708 | 712 | 713 | 715 | 717 |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| L. panamensis                 | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. guyanensis                 | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. shawi                      | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. braziliensis               | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. peruviana                  | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. n. agly                    | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. r. soni                    | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. mexicana                   | A   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. o. m. nensis               | A   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. d. an. v. nensis           | A   | T   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. chagasi                    | A   | T   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. infantum                   | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. major                      | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | T   | A   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. en. nensis                 | A   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | T   | A   | T   | C   | T   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. m. r. n. g. u. m. s. i. s. | A   | C   | G   | C   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | C   | C   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | C   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. h. n. n. o. s. i. s.       | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | C   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | C   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. tropica                    | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | A   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. o. e. n. h. o. p. i. c. a. | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | A   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. o. r. o. c. a.             | T   | C   | G   | A   | C   | G   | A   | G   | T   | T   | C   | G   | G   | T   | C   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | T   | C   | C   | T   | T   | C   | T   | A   | A   | A   | G   |
| L. g. e. n. s. i. s.          | T   | C   | G   | A   | C   | G   | A   | G   | T   | T   | C   | G   | G   | T   | C   | G   | G   | A   | A   | C   | T   | T   | C   | C   | T   | T   | C   | T   | A   | A   | A   | G   |
| L. h. n. n. o. s. i. s.       | A   | C   | G   | G   | G   | T   | C   | C   | G   | G   | A   | A   | A   | G   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | C   |
| L. o. n. e. n. t. i. s.       | A   | C   | G   | G   | C   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | A   | G   | G   | G   | A   | A   | C   | C   | C   | G   | T   | C   | C   | C   | T   | C   | C   | G   | C   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                               | 718 | 720 | 721 | 722 | 723 | 725 | 726 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 737 | 738 | 739 | 745 | 746 | 747 | 749 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| L. panamensis                 | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. guyanensis                 | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. shawi                      | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. braziliensis               | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. peruviana                  | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. n. agly                    | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. r. soni                    | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. mexicana                   | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | C   | A   | A   | G   |
| L. o. m. nensis               | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | C   | A   | A   | G   |
| L. d. an. v. nensis           | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. chagasi                    | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. infantum                   | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. major                      | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. en. nensis                 | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | G   | T   | G   | A   | C   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. m. r. n. g. u. m. s. i. s. | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | C   | A   | A   | G   |
| L. h. n. n. o. s. i. s.       | G   | C   | A   | C   | T   | C   | A   | C   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | C   | A   | A   | G   |
| L. tropica                    | G   | C   | G   | A   | C   | A   | T   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | A   | G   | C   | -   | -   | -   | T   | C   | G   | C   | T   | G   | C   | C   | A   | A   | G   |     |
| L. o. e. n. h. o. p. i. c. a. | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |
| L. o. r. o. c. a.             | A   | G   | A   | A   | G   | T   | T   | G   | T   | G   | G   | A   | C   | G   | C   | C   | C   | G   | C   | A   | C   | A   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | -   | -   | -   |
| L. g. e. n. s. i. s.          | A   | G   | A   | A   | G   | T   | T   | G   | T   | G   | G   | A   | C   | G   | C   | C   | C   | G   | C   | A   | C   | A   | G   | A   | A   | C   | T   | C   | -   | -   | -   |
| L. h. n. n. o. s. i. s.       | G   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | C   | A   | C   | T   | A   | G   | C   | -   | -   | -   | T   | C   | G   | C   | T   | G   | C   | G   | C   | A   | A   | G   |
| L. o. n. e. n. t. i. s.       | G   | C   | A   | C   | G   | T   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | T   | C   | G   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | G   | G   | T   | A   | A   | G   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 763 | 764 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 786 | 787 | 788 | 790 | 791 | 795 | 803 | 807 | 814 | 815 | 816 | 818 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i>     | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. guyanensis</i>     | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. shawi</i>          | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. braziliensis</i>   | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. peruviana</i>      | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. naiffi</i>         | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. lainsoni</i>       | G   | A   | C   | T   | T   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. mexicana</i>       | A   | A   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | T   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. amazonensis</i>    | A   | A   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | T   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. donovani</i>       | A   | A   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. chagasi</i>        | A   | A   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. infantum</i>       | A   | A   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. major</i>          | A   | A   | C   | T   | G   | G   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. enrietti</i>       | G   | A   | C   | T   | G   | A   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. martiniquensis</i> | G   | A   | C   | T   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. tarentolae</i>     | T   | G   | C   | T   | G   | A   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. tropica</i>        | G   | A   | T   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. aethiopica</i>     | A   | A   | C   | G   | G   | C   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. arabica</i>        | G   | A   | A   | T   | C   | T   | C   | G   | A   | A   | T   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | A   | G   | G   | C   | C   | T   | G   | C   | T   | A   | A   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. gerbilli</i>       | G   | A   | A   | T   | C   | T   | C   | G   | A   | A   | T   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | A   | G   | G   | C   | C   | T   | G   | C   | T   | A   | A   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. turanica</i>       | G   | A   | T   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |
| <i>L. orientalis</i>     | G   | A   | C   | T   | G   | A   | C   | G   | T   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | G   | C   | T   | C   | G   | T   | C   | G   | C   | G   | C   | C   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 819 | 825 | 826 | 827 | 829 | 834 | 835 | 836 | 838 | 839 | 840 | 841 | 844 | 845 | 849 | 850 | 851 | 852 | 853 | 855 | 859 | 861 | 865 | 866 | 867 | 868 | 870 | 871 | 872 | 876 | 877 | 878 |   |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| <i>L. panamensis</i>     | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. shawi</i>          | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. peruviana</i>      | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. naiffi</i>         | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. lainsoni</i>       | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. mexicana</i>       | C   | T   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | A   | A   |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | C   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | A   | A   |   |
| <i>L. donovani</i>       | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. chagasi</i>        | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | T   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. infantum</i>       | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | T   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. major</i>          | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. enrietti</i>       | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | A   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | C   | C   | A   | T   | T   | C   | A   | A   |   |
| <i>L. martiniquensis</i> | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | C   | A   | A |
| <i>L. tarentolae</i>     | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | T   | A   | C   | G   | C   | A   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. tropica</i>        | G   | C   | A   | C   | C   | C   | A   | G   | T   | C   | C   | A   | A   | C   | A   | A   | A   | C   | A   | C   | A   | T   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | A   | G   | G   | G |
| <i>L. aethiopica</i>     | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. arabica</i>        | G   | T   | C   | A   | T   | G   | C   | C   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | A   | G   | G   | A   | G   | C   | C   | T   | G   | T   | T   | G   | G   | G |
| <i>L. gerbilli</i>       | G   | T   | C   | A   | T   | G   | C   | C   | C   | A   | C   | C   | G   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | A   | G   | G   | A   | G   | C   | C   | T   | G   | T   | T   | G   | G   | G |
| <i>L. turanica</i>       | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | T   | T   | T   | G   | A   | A |
| <i>L. orientalis</i>     | G   | C   | A   | C   | C   | G   | C   | C   | G   | C   | G   | A   | C   | A   | G   | A   | C   | G   | A   | C   | A   | C   | G   | C   | C   | C   | A   | T   | T   | T   | C   | A   | A |

ESPECIE DE LESHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 880 | 881 | 882 | 888 | 889 | 890 | 891 | 892 | 893 | 894 | 896 | 897 | 903 | 906 | 909 | 910 | 911 | 912 | 922 | 925 | 926 | 928 | 929 | 930 | 932 | 933 | 935 | 936 | 939 | 940 | 941 | 942 |   |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| <i>L. panamensis</i>     | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. shawi</i>          | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. peruviana</i>      | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. naiffi</i>         | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. kishinouyei</i>    | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. mexicana</i>       | G   | T   | T   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | G   | T   | T   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. donovani</i>       | G   | T   | T   | T   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. chagasi</i>        | A   | T   | T   | T   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. infantum</i>       | A   | T   | T   | T   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. major</i>          | A   | T   | T   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. enneti</i>         | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. martiniquensis</i> | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. tarentolae</i>     | A   | T   | T   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | T   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. tropica</i>        | A   | A   | T   | C   | T   | T   | C   | T   | C   | G   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | T   | G   | C   | G   | C   | A   | T   | A   | G   | T   | G   | A   | G   |   |
| <i>L. aesthropica</i>    | G   | T   | T   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |
| <i>L. arabica</i>        | T   | A   | C   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | G   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | A   | A   | T   | G   | C   | C   | T   | C   | C   | A   | A   | G |
| <i>L. gerbilli</i>       | T   | A   | C   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | A   | A   | T   | G   | C   | C   | T   | C   | C   | A   | A   | G   |   |
| <i>L. furuncula</i>      | G   | T   | T   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | T   | G   | C   | G   | C   | A   | T   | A   | G   | T   | G   | A   | G   |   |
| <i>L. orientalis</i>     | G   | T   | C   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | C   | C   | C   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | C   | T   | G   | G   | G   | C   | A   | C   | T   | G   | C   | C   | G   | C   |   |

ESPECIE DE LESHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 944 | 945 | 946 | 947 | 948 | 949 | 951 | 952 | 953 | 957 | 961 | 964 | 965 | 966 | 972 | 973 | 974 | 975 | 978 | 981 | 982 | 984 | 985 | 988 | 990 | 991 | 992 | 994 | 995 | 996 | 997 | 998 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i>     | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. guyanensis</i>     | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. shawi</i>          | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. braziliensis</i>   | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. peruviana</i>      | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. naiffi</i>         | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. kishinouyei</i>    | G   | C   | A   | C   | C   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. mexicana</i>       | G   | C   | A   | C   | C   | A   | T   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | A   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. amazonensis</i>    | G   | C   | A   | C   | G   | A   | T   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | A   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. donovani</i>       | G   | C   | A   | C   | G   | A   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. chagasi</i>        | G   | C   | A   | C   | G   | A   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. infantum</i>       | G   | C   | A   | C   | G   | A   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. major</i>          | G   | C   | A   | C   | G   | A   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | A   | C   |
| <i>L. enneti</i>         | G   | T   | A   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | C   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | A   | C   |
| <i>L. martiniquensis</i> | G   | C   | A   | C   | A   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | C   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. tarentolae</i>     | G   | C   | A   | C   | G   | A   | C   | C   | A   | A   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. tropica</i>        | A   | G   | T   | G   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | A   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | T   | G   | G   | T   | A   | A   | G   | C   | C   | A   | G   | G   | A   |     |
| <i>L. aestivipara</i>    | G   | C   | A   | C   | G   | A   | C   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | G   | A   | G   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | C   | T   | C   |
| <i>L. arabica</i>        | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | G   | T   | C   | C   | A   | A   | A   | A   | A   | G   | A   | G   | T   | A   | A   | A   | A   | G   | A   | A   | A   | G   | T   | G   | A   |
| <i>L. gerbilli</i>       | A   | C   | A   | C   | G   | C   | G   | G   | T   | C   | C   | A   | A   | A   | A   | A   | G   | A   | G   | T   | A   | A   | A   | C   | A   | A   | A   | A   | G   | T   | G   | A   |
| <i>L. surinamensis</i>   | A   | G   | T   | G   | C   | C   | C   | G   | A   | G   | A   | A   | A   | G   | G   | G   | C   | A   | T   | G   | G   | T   | C   | A   | G   | C   | C   | A   | A   | G   | G   | A   |
| <i>L. orientalis</i>     | G   | T   | A   | C   | G   | A   | G   | C   | A   | G   | G   | C   | G   | C   | G   | C   | A   | G   | C   | C   | A   | A   | A   | G   | C   | A   | A   | C   | G   | T   | G   | C   |



ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 999 | 1008 | 1002 | 1003 | 1008 | 1009 | 1011 | 1014 | 1017 | 1020 | 1023 | 1026 | 1029 | 1032 | 1035 | 1038 | 1041 | 1045 | 1047 | 1051 | 1052 | 1053 | 1054 | 1056 | 1057 | 1059 | 1060 | 1061 | 1063 | 1065 | 1072 | 1077 |   |   |
|--------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|---|
| <i>L. panamensis</i>     | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. shawi</i>          | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. peruviana</i>      | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | A    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. naiffi</i>         | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. lainsoni</i>       | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. mexicana</i>       | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. donovani</i>       | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. chagasi</i>        | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. infantum</i>       | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. major</i>          | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. enrietti</i>       | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | T    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | T |   |
| <i>L. martiniquensis</i> | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | T    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. tarentolae</i>     | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. tropica</i>        | C   | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | C    | C    | C    | A    | G    | C    | A    | C    | A    | A    | C    | C    | A    | G    | A    | C    | C    | G    | C    | T    | C    | C    | G    | C    | C |   |
| <i>L. oethiopica</i>     | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |
| <i>L. arabica</i>        | T   | A    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | C    | C    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | G    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | A    | A    | G    | C    | A | C |
| <i>L. gerbilli</i>       | C   | A    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | C    | C    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | G    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | A    | A    | A    | A    | G    | C    | A | C |
| <i>L. turanica</i>       | C   | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | C    | C    | T    | A    | G    | C    | A    | C    | A    | A    | C    | C    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | T    | C    | C    | C    | G    | C    | C |   |
| <i>L. orientalis</i>     | C   | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | G    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | G    | C |   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1080 | 1085 | 1090 | 1091 | 1092 | 1093 | 1094 | 1095 | 1107 | 1113 | 1116 | 1125 | 1128 | 1140 | 1141 | 1142 | 1144 | 1146 | 1149 | 1150 | 1152 | 1157 | 1158 | 1159 | 1161 | 1162 | 1163 | 1165 | 1166 | 1167 | 1168 | 1169 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. guyanensis</i>     | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. shawi</i>          | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. braziliensis</i>   | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. peruviana</i>      | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. naiffi</i>         | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | T    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. lainsoni</i>       | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. mexicana</i>       | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. amazonensis</i>    | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. donovani</i>       | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | G    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. chagasi</i>        | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | G    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. infantum</i>       | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | G    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. major</i>          | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. enrietti</i>       | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | C    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. martiniquensis</i> | A    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | C    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. tarentolae</i>     | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. tropica</i>        | G    | T    | C    | G    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | G    | G    | C    | A    | A    | T    | C    | G    | C    | G    | T    | C    | T    | T    | C    | T    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. oethiopica</i>     | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | G    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. arabica</i>        | G    | C    | A    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | C    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | -    | -    | -    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | G    | T    |
| <i>L. gerbilli</i>       | G    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | A    | C    | G    | G    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |
| <i>L. turanica</i>       | G    | T    | C    | G    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | T    | G    | C    | A    | A    | T    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | C    | T    | T    | C    | C    | A    | A    | A    |
| <i>L. orientalis</i>     | G    | T    | A    | A    | G    | A    | G    | C    | C    | T    | C    | C    | C    | G    | T    | T    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    |

## ESPECIE DE LEISHMANIA

## POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1171 | 1172 | 1173 | 1175 | 1176 | 1177 | 1178 | 1179 | 1180 | 1182 | 1183 | 1186 | 1188 | 1189 | 1191 | 1194 | 1197 | 1199 | 1200 | 1203 | 1204 | 1206 | 1207 | 1209 | 1212 | 1215 | 1216 | 1218 | 1224 | 1226 | 1227 | 1 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| <i>L. panamensis</i>     | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. shawi</i>          | A    | C    | A    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. peruviana</i>      | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. naiffi</i>         | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. lainsoni</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. mexicana</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. donovani</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. chagasi</i>        | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. infantum</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. major</i>          | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |   |
| <i>L. enrietti</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. martiniquensis</i> | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. tarentolae</i>     | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | T    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. tropica</i>        | A    | C    | G    | A    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | C    | T    | G    | C    | T    | G    | A    | C    | C    |      |   |
| <i>L. aethiopica</i>     | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | A    | C    | C    |      |   |
| <i>L. arabica</i>        | G    | G    | C    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | C    | T    | G    | T    | T    | C    | T    | G    | T    | T    | C    | A    | C    | C    | T    | T    |      |   |
| <i>L. gerbilli</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | G    | C    | C    |      |   |
| <i>L. turanica</i>       | A    | C    | G    | A    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | T    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | T    | G    | C    | T    | G    | A    | C    | C    |      |   |
| <i>L. orientalis</i>     | A    | C    | G    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | T    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | G    | C    | C    |      |   |

## ESPECIE DE LEISHMANIA

## POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1233 | 1236 | 1240 | 1242 | 1243 | 1244 | 1248 | 1252 | 1253 | 1261 | 1263 | 1264 | 1265 | 1269 | 1273 | 1274 | 1275 | 1276 | 1278 | 1283 | 1284 | 1288 | 1289 | 1290 | 1292 | 1296 | 1298 | 1299 | 1300 | 1302 | 1303 | 1 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| <i>L. panamensis</i>     | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. shawi</i>          | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. peruviana</i>      | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. naiffi</i>         | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | Y    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. lainsoni</i>       | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. mexicana</i>       | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | A    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | A    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. donovani</i>       | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | T    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. chagasi</i>        | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | T    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. infantum</i>       | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | T    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. major</i>          | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. enrietti</i>       | C    | G    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | T    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | C    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. martiniquensis</i> | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | C    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. tarentolae</i>     | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. tropica</i>        | T    | C    | T    | T    | G    | T    | C    | C    | C    | T    | G    | A    | C    | G    | G    | T    | G    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | G    | A    | C    | A    | C    | G    |   |
| <i>L. aethiopica</i>     | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | G    | C    | G    | T    | C    | G    |   |
| <i>L. arabica</i>        | A    | C    | A    | G    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | G    | C    | A    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | C    | C    | C    | T    | T    | C    |   |
| <i>L. gerbilli</i>       | C    | G    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | T    | C    | C    | C    | T    | T    | C    |   |
| <i>L. turanica</i>       | T    | C    | T    | C    | G    | T    | C    | C    | C    | T    | G    | A    | C    | G    | G    | T    | G    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | G    | A    | C    | A    | C    | G    |   |
| <i>L. orientalis</i>     | C    | G    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | G    | T    | G    | T    | C    | T    | G    | C    | C    | T    | C    | G    |   |

ESPECIE DE *LEISHMANIA*

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1305 | 1308 | 1311 | 1314 | 1316 | 1317 | 1318 | 1319 | 1320 | 1324 | 1325 | 1326 | 1329 | 1330 | 1335 | 1337 | 1338 | 1341 | 1350 | 1351 | 1352 | 1353 | 1354 | 1357 | 1358 | 1359 | 1360 | 1361 | 1363 | 1365 | 1366 | 1367 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. guyanensis</i>     | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | Y    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. shawi</i>          | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. brasiliensis</i>   | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. peruviana</i>      | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. naiffi</i>         | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | R    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. kilnsani</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. mexicana</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. amazonensis</i>    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. donovani</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. dhogarii</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. infantum</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. major</i>          | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. enrietti</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. martiniquensis</i> | G    | C    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. nannobae</i>       | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. tropica</i>        | C    | T    | T    | G    | G    | T    | A    | A    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | A    | C    | A    | T    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | C    | C    | C    | C    | G    | T    | G    |
| <i>L. anthracis</i>      | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. arabica</i>        | G    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | T    | G    | T    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |
| <i>L. genlii</i>         | G    | C    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | T    | G    | T    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | A    | A    |
| <i>L. taurica</i>        | C    | T    | T    | G    | G    | T    | A    | A    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | A    | C    | A    | T    | C    | C    | G    | C    | G    | T    | T    | T    | C    | C    | G    | T    | G    |
| <i>L. orientalis</i>     | G    | C    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | C    | C    | A    | A    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | T    | G    |

ESPECIE DE *LEISHMANIA*

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1370 | 1371 | 1372 | 1373 | 1374 | 1377 | 1382 | 1383 | 1387 | 1388 | 1389 | 1390 | 1392 | 1393 | 1397 | 1404 | 1407 | 1408 | 1409 | 1419 | 1420 | 1421 | 1422 | 1423 | 1427 | 1428 | 1431 | 1432 | 1434 | 1437 | 1438 | 1440 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. guyanensis</i>     | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. shawi</i>          | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. brasiliensis</i>   | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. peruviana</i>      | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. naiffi</i>         | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. kilnsani</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. mexicana</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. amazonensis</i>    | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. donovani</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | T    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. dhogarii</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | T    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. infantum</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | T    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. major</i>          | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | A    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. enrietti</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | A    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | C    |
| <i>L. martiniquensis</i> | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | C    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    |
| <i>L. nannobae</i>       | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. tropica</i>        | A    | G    | T    | G    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | C    | C    | G    | A    | A    | G    | C    | A    | T    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    |
| <i>L. anthracis</i>      | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | A    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | G    |
| <i>L. arabica</i>        | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    |
| <i>L. genlii</i>         | G    | C    | T    | T    | G    | T    | A    | G    | G    | A    | C    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | A    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | G    | C    |
| <i>L. taurica</i>        | A    | G    | T    | G    | C    | C    | C    | A    | C    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | C    | A    | G    |
| <i>L. orientalis</i>     | A    | C    | C    | T    | G    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | A    | G    | G    | C    |      | G    | T    | G    | C    | A    | G    | T    | G    | G    | G    | A    | C    |

ESPECIE DE *LEISHMANIA*

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1446 | 1447 | 1449 | 1450 | 1453 | 1454 | 1455 | 1456 | 1459 | 1467 | 1468 | 1469 | 1470 | 1473 | 1474 | 1475 | 1476 | 1479 | 1480 | 1481 | 1482 | 1485 | 1486 | 1489 | 1490 | 1491 | 1492 | 1493 | 1494 | 1497 | 1498 | 1499 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. guyanensis</i>     | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. shawi</i>          | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. brasiliensis</i>   | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. peruviana</i>      | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. naiffi</i>         | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. fainsoni</i>       | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. mexicana</i>       | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. amazonensis</i>    | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. dianovani</i>      | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. chagasi</i>        | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. infantum</i>       | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. major</i>          | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. enrieti</i>        | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | A    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. martiniquensis</i> | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | A    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. tarantolae</i>     | C    | C    | G    | G    | G    | C    | C    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | T    | C    | A    | A    |
| <i>L. tropica</i>        | C    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | G    | G    | T    | T    | C    | G    |
| <i>L. aesthiopica</i>    | C    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | T    | C    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |
| <i>L. arabica</i>        | T    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | A    | C    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | A    | A    | A    |
| <i>L. gerbilli</i>       | T    | G    | T    | G    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | A    | C    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | T    | C    | T    | A    | A    | A    |
| <i>L. turanica</i>       | C    | G    | G    | A    | A    | C    | G    | G    | G    | C    | A    | T    | C    | G    | A    | G    | C    | C    | G    | T    | C    | G    | G    | T    | C    | G    | G    | G    | T    | T    | C    | G    |
| <i>L. orientalis</i>     | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | C    | C    | T    | C    | C    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | A    |

ESPECIE DE *LEISHMANIA*

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1500 | 1501 | 1502 | 1503 | 1504 | 1506 | 1507 | 1508 | 1509 | 1515 | 1518 | 1519 | 1520 | 1521 | 1524 | 1529 | 1533 | 1536 | 1539 | 1543 | 1548 | 1549 | 1558 | 1566 | 1567 | 1568 | 1569 | 1572 | 1575 | 1576 | 1577 | 1578 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | T    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. guyanensis</i>     | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. shawi</i>          | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. brasiliensis</i>   | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. peruviana</i>      | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. naiffi</i>         | G    | C    | G    | C    | A    | T    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. fainsoni</i>       | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | A    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | T    | C    | G    |
| <i>L. mexicana</i>       | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | A    | A    | T    | G    |
| <i>L. amazonensis</i>    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | A    | A    | T    | G    |
| <i>L. dianovani</i>      | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | T    | G    |
| <i>L. chagasi</i>        | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | T    | G    |
| <i>L. infantum</i>       | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | T    | G    |
| <i>L. major</i>          | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | T    | G    |
| <i>L. enrieti</i>        | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | G    | C    | C    |
| <i>L. martiniquensis</i> | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | T    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | T    | G    | G    | C    | C    |
| <i>L. tarantolae</i>     | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | T    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | T    | G    |
| <i>L. tropica</i>        | A    | A    | A    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | T    | T    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    |
| <i>L. aesthiopica</i>    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | T    | G    |
| <i>L. arabica</i>        | G    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | A    | T    | A    | C    | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | G    | T    | G    | C    |
| <i>L. gerbilli</i>       | G    | C    | G    | G    | G    | G    | G    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | A    | T    | A    | C    | C    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | T    | G    | C    | C    |
| <i>L. turanica</i>       | A    | A    | A    | G    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | T    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | G    | G    | C    | G    | A    | G    |
| <i>L. orientalis</i>     | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | C    | C    | C    | A    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | A    | C    | T    | G    | G    | C    | C    |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1579 | 1580 | 1583 | 1584 | 1586 | 1587 | 1588 | 1589 | 1590 | 1592 | 1593 | 1597 | 1598 | 1599 | 1600 | 1601 | 1602 | 1603 | 1604 | 1605 | 1606 | 1608 | 1611 | 1614 | 1617 | 1620 | 1623 | 1624 | 1625 | 1626 | 1630 | 1631 |   |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| <i>L. panamensis</i>     | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. shawi</i>          | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. peruviana</i>      | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. naijfi</i>         | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. lainsoni</i>       | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | C    |   |
| <i>L. mexicana</i>       | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. donovani</i>       | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. chagasi</i>        | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. infantum</i>       | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. major</i>          | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | A    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G    |   |
| <i>L. enrietti</i>       | A    | A    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | C    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | T    | C    | C    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G |
| <i>L. martiniquensis</i> | A    | G    | A    | C    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G |
| <i>L. tarentolae</i>     | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | G |
| <i>L. tropica</i>        | A    | A    | T    | T    | C    | T    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | G    | G    | A    | T    | G    | A    | A    | C    | A    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C |
| <i>L. aethiopica</i>     | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | A    | G    | G    | G |
| <i>L. arabica</i>        | G    | A    | T    | C    | A    | G    | G    | A    | T    | A    | C    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | T    | G    | C    | T    | G    | T    | G    | T    | C    | A    | G    | A    | A    | G    | T    | C |
| <i>L. gerbilli</i>       | G    | A    | T    | C    | A    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | C    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | T    | G    | C    | C    | G    | T    | C    | A    | G    | A    | A    | A    | G    | T    | C |
| <i>L. turanica</i>       | A    | A    | T    | T    | C    | T    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | G    | T    | G    | A    | A    | C    | A    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | C    | G    | C    | A    | C |
| <i>L. orientalis</i>     | A    | A    | A    | C    | A    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | A    | A    | G    | G    | T    | G    | C    | A    | G    | C    | T    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | G    | C |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1632 | 1635 | 1638 | 1640 | 1642 | 1643 | 1645 | 1647 | 1649 | 1653 | 1654 | 1656 | 1657 | 1658 | 1659 | 1660 | 1661 | 1663 | 1664 | 1665 | 1666 | 1668 | 1669 | 1670 | 1671 | 1675 | 1676 | 1677 | 1678 | 1680 | 1681 | 1682 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. guyanensis</i>     | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. shawi</i>          | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. braziliensis</i>   | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | T    | C    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. peruviana</i>      | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | T    | C    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. naiiffi</i>        | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. lainsoni</i>       | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | T    | C    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. mexicana</i>       | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. amazonensis</i>    | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. donovani</i>       | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. chagasi</i>        | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. infantum</i>       | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | G    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. major</i>          | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. enrietti</i>       | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | C    | A    | C    | G    | A    | C    | A    | T    |
| <i>L. martiniquensis</i> | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | C    | A    | C    | A    | C    | A    | C    | T    |
| <i>L. tarentolae</i>     | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | C    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | T    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. tropica</i>        | G    | G    | A    | A    | T    | A    | A    | C    | T    | C    | A    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | G    | T    |
| <i>L. aethiopica</i>     | C    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | G    | C    | C    | A    | G    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | G    | T    |
| <i>L. arabica</i>        | G    | A    | A    | G    | A    | T    | G    | G    | A    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | A    | A    |
| <i>L. gerbilli</i>       | G    | A    | G    | G    | A    | T    | G    | G    | A    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | A    | A    |
| <i>L. turanica</i>       | G    | G    | A    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | C    | A    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | A    | C    | C    | C    | G    | G    | A    | C    | C    | C    | G    | G    | T    | G    | T    |
| <i>L. orientalis</i>     | T    | G    | G    | A    | T    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | A    | A    | G    | A    | A    | A    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | C    | C    | C    | G    | A    | C    | A    | T    |



ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1684 | 1685 | 1686 | 1687 | 1688 | 1689 | 1690 | 1691 | 1692 | 1693 | 1694 | 1695 | 1696 | 1698 | 1699 | 1700 | 1701 | 1702 | 1703 | 1704 | 1705 | 1706 | 1707 | 1711 | 1712 | 1713 | 1734 | 1715 | 1716 | 1717 | 1718 | 1 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| <i>L. panamensis</i>     | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. guyanensis</i>     | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | A    | C    | C    | G    | C    | T |
| <i>L. shawi</i>          | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | G    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. braziliensis</i>   | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | T    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. peruviana</i>      | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | G    | G    | T    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. naijfi</i>         | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | W    | G    | C    | A    | G    | G    | R    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. lainsoni</i>       | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. mexicana</i>       | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | C    | G    | C    | A    | A    | G    | T    | C    | G    | A    | C    |   |
| <i>L. amazonensis</i>    | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | C    | G    | C    | A    | A    | G    | T    | C    | G    | A    | C    |   |
| <i>L. donovani</i>       | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | T    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. chagasi</i>        | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | T    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. infantum</i>       | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | T    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. major</i>          | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | T    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. ennietti</i>       | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | A    | C    | T    | A    | C    |   |
| <i>L. martiniquensis</i> | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | G    | G    | A    | A    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | A    | C    | A    | G    | C    |   |
| <i>L. tarentolae</i>     | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | G    | A    | T    | G    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. tropica</i>        | C    | A    | G    | A    | A    | -    | -    | -    | T    | G    | G    | A    | A    | C    | A    | C    | G    | C    | A    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | A    | G    | A    | A    |   |
| <i>L. aethiopica</i>     | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | A    | G    | A    | T    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | G    | C    | C    | A    | C    |   |
| <i>L. arabica</i>        | C    | T    | T    | G    | G    | T    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | C    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. gerbilli</i>       | C    | T    | T    | G    | G    | T    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | C    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | G    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | G    | C    |   |
| <i>L. turanica</i>       | C    | A    | G    | A    | A    | -    | -    | -    | T    | G    | G    | A    | A    | C    | A    | C    | G    | C    | A    | G    | G    | G    | G    | C    | G    | C    | C    | A    | G    | A    | A    |   |
| <i>L. orientalis</i>     | T    | C    | C    | G    | G    | -    | -    | -    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | G    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | A    | C    | C    | G    | C    |   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS

|                          | 1720 | 1722 | 1723 | 1724 | 1725 | 1726 | 1727 | 1728 | 1730 | 1731 | 1732 | 1734 | 1735 | 1736 | 1737 | 1738 | 1739 | 1740 | 1741 | 1742 | 1743 | 1744 | 1745 | 1746 | 1747 | 1748 | 1749 | 1751 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. panamensis</i>     | C    | G    | A    | A    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. guyanensis</i>     | C    | G    | A    | A    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | A    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. shawi</i>          | C    | G    | A    | A    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. braziliensis</i>   | C    | G    | A    | A    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | A    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. peruviana</i>      | C    | G    | A    | A    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. naijfi</i>         | C    | G    | A    | C    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. lainsoni</i>       | C    | G    | A    | A    | C    | T    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | A    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. mexicana</i>       | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | T    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. amazonensis</i>    | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. donovani</i>       | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    | G    | A    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. chagasi</i>        | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    | G    | A    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. infantum</i>       | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    | G    | A    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. major</i>          | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. enniatti</i>       | C    | G    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | G    | T    | C    | C    | C    | G    | C    | C    | T    | G    | A    | C    | G    | G    |
| <i>L. martiniquensis</i> | C    | G    | A    | G    | C    | A    | A    | G    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | G    | T    | C    | C    | G    | C    | G    | C    | T    | A    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. tarentolae</i>     | C    | C    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | C    | G    | A    | C    | C    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. tropica</i>        | A    | C    | C    | A    | G    | G    | A    | C    | C    | C    | G    | C    | A    | G    | C    | G    | C    | T    | G    | C    | C    | T    | C    | G    | A    | G    | C    | G    |
| <i>L. aethiopica</i>     | C    | G    | A    | A    | C    | A    | A    | G    | A    | G    | A    | C    | G    | A    | C    | G    | T    | G    | G    | T    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | G    | G    |
| <i>L. arabica</i>        | A    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | A    | T    | G    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | T    |
| <i>L. gerbilli</i>       | A    | C    | G    | A    | G    | G    | A    | G    | C    | T    | G    | G    | A    | A    | G    | G    | A    | T    | G    | C    | C    | C    | T    | C    | G    | A    | C    | T    |
| <i>L. turanica</i>       | A    | C    | C    | A    | G    | G    | A    | C    | C    | C    | G    | C    | A    | A    | C    | G    | C    | T    | G    | C    | C    | T    | C    | G    | A    | G    | C    | G    |
| <i>L. orientalis</i>     | C    | G    | A    | G    | C    | A    | A    | C    | C    | G    | A    | C    | G    | A    | G    | T    | C    | C    | A    | C    | G    | C    | T    | G    | A    | C    | G    | G    |

## **CUADRO DE AMINOÁCIDOS**

ESPECIE DE LEISHMANIA

Posición de los Aminoácidos

|                             | 154 | 162 | 164 | 166 | 169 | 171 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 192 | 193 | 195 | 197 | 199 | 210 | 215 | 216 | 218 | 222 | 225 | 238 | 239 | 240 | 241 | 244 | 245 | 246 | 247 | 249 | 250 | 252 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSG-1 | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. guyanensis</i>        | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. shawi</i>             | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. braziliensis</i>      | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. peruviana</i>         | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. naiffi</i>            | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. binsoni</i>           | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. mexicana</i>          | S   | A   | T   | S   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. amazonensis</i>       | S   | A   | T   | S   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. donovani</i>          | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. chagasi</i>           | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. infantum</i>          | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. major</i>             | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. enrietti</i>          | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | D   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. martiniquensis</i>    | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. tarentolae</i>        | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. tropica</i>           | S   | A   | T   | A   | E   | L   | M   | D   | R   | K   | G   | K   | G   | K   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | D   | A   | T   | E   | L   | M   | R   | C   |
| <i>L. aesthnapica</i>       | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | T   | E   | E   | F   | R   | K   | K   |
| <i>L. arabica</i>           | A   | S   | K   | A   | N   | V   | L   | N   | K   | -   | -   | A   | G   | K   | I   | V   | S   | D   | E   | F   | V   | N   | N   | M   | M   | K   | V   | D   | G   | L   | R   | K   | Q   |
| <i>L. gerbilli</i>          | A   | S   | K   | A   | N   | V   | L   | N   | K   | -   | -   | A   | G   | K   | I   | V   | S   | D   | E   | F   | V   | N   | N   | M   | M   | K   | V   | D   | G   | L   | R   | K   | Q   |
| <i>L. turanicus</i>         | S   | A   | S   | A   | N   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | E   | S   | V   | K   | A   | R   | L   | V   | D   | A   | T   | E   | L   | M   | R   | C   |
| <i>L. orientalis</i>        | S   | A   | T   | A   | E   | L   | L   | D   | K   | G   | D   | G   | K   | R   | V   | I   | T   | D   | G   | I   | K   | N   | R   | L   | V   | T   | S   | D   | E   | F   | R   | K   | K   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

|                     | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 268 | 272 | 273 | 276 | 280 | 281 | 282 | 284 | 285 | 287 | 289 | 291 | 292 | 293 | 294 | 297 | 298 | 299 | 304 |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| L. panamensis-PSG-1 | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | N   | R   |
| L. guyanensis       | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | N   | R   |
| L. shawi            | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | N   | R   |
| L. braziliensis     | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | N   | R   |
| L. peruviana        | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | N   | R   |
| L. naiffi           | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | N   | R   |
| L. binsoni          | G   | K   | D   | L   | S   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. mexicana         | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | S   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. amazonensis      | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | S   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. donovani         | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. chagasi          | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. infantum         | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. major            | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | I   | Q   | A   | T   | R   |
| L. enrietti         | G   | K   | D   | L   | T   | S   | S   | Q   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. martiniquensis   | G   | K   | D   | L   | T   | T   | S   | Q   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | D   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. tarentolae       | G   | K   | C   | L   | T   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | I   | Q   | A   | T   | R   |
| L. tropica          | G   | K   | D   | C   | R   | G   | N   | A   | R   | A   | T   | R   | T   | R   | V   | T   | S   | T   | T   | N   | I   | I   | A   | Y   | E   | G   | N   | F   | S   | K   | R   |
| L. anthracis        | G   | K   | N   | L   | A   | S   | S   | H   | R   | A   | L   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |
| L. arabica          | N   | V   | D   | I   | S   | N   | D   | Q   | K   | A   | L   | A   | K   | A   | A   | Q   | H   | P   | E   | R   | V   | V   | S   | V   | E   | G   | Y   | S   | E   | K   | K   |
| L. gerbilli         | N   | V   | D   | I   | S   | N   | D   | Q   | K   | A   | L   | A   | K   | A   | A   | Q   | H   | P   | E   | R   | V   | V   | S   | V   | E   | G   | Y   | S   | E   | K   | K   |
| L. turanicus        | G   | K   | D   | C   | R   | G   | N   | A   | R   | A   | T   | R   | T   | R   | A   | T   | A   | T   | Q   | T   | I   | I   | A   | F   | E   | N   | V   | Q   | A   | T   | R   |



## ESPECIE DE LEISHMANIA

## POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

|                             | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 321 | 322 | 325 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 349 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 358 | 362 | 364 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSC-1 | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. guyanensis</i>        | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. shawi</i>             | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. braziliensis</i>      | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. peruviana</i>         | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. naiffi</i>            | L   | C   | G   | D   | L   | X   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. lainsoni</i>          | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. mexicana</i>          | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. amazonensis</i>       | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. donovani</i>          | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. chagasi</i>           | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. infantum</i>          | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. major</i>             | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. enrietti</i>          | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. martiniquensis</i>    | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | A   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. tonantzenae</i>       | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. tropica</i>           | M   | C   | R   | D   | Q   | F   | E   | K   | C   | L   | E   | K   | K   | A   | D   | M   | K   | P   | Q   | D   | V   | D   | D   | V   | I   | Q   | I   | V   | S   | Q   | G   | L   | R   |
| <i>L. ethiopica</i>         | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | I   | Q   | E   | R   | Q   | K   | M   | D   | K   | R   | S   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |
| <i>L. arabica</i>           | L   | N   | M   | A   | L   | F   | K   | N   | T   | L   | V   | Q   | K   | E   | K   | L   | K   | K   | S   | D   | I   | D   | E   | I   | V   | Q   | L   | I   | K   | D   | G   | P   | K   |
| <i>L. gerbilli</i>          | L   | N   | M   | A   | L   | F   | K   | N   | T   | L   | V   | Q   | K   | E   | K   | L   | K   | K   | S   | D   | I   | D   | E   | I   | V   | Q   | L   | I   | K   | D   | S   | P   | K   |
| <i>L. tucumana</i>          | M   | C   | H   | D   | Q   | F   | E   | K   | C   | L   | E   | K   | K   | A   | D   | M   | K   | P   | Q   | D   | V   | D   | D   | V   | I   | Q   | I   | V   | S   | Q   | G   | L   | R   |
| <i>L. orientalis</i>        | L   | C   | G   | D   | L   | F   | R   | S   | T   | M   | Q   | E   | R   | Q   | K   | L   | D   | K   | R   | A   | V   | H   | D   | V   | V   | S   | L   | V   | S   | D   | G   | L   | K   |

## ESPECIE DE LEISHMANIA

## POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

|                             | 365 | 381 | 382 | 384 | 385 | 387 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 397 | 400 | 403 | 406 | 409 | 414 | 415 | 418 | 421 | 422 | 423 | 425 | 426 | 428 | 430 | 433 | 434 | 435 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSC-1 | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. guyanensis</i>        | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. shawi</i>             | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. braziliensis</i>      | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. peruviana</i>         | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. naiffi</i>            | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | X   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. lainsoni</i>          | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. mexicana</i>          | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. amazonensis</i>       | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. donovani</i>          | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. chagasi</i>           | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. infantum</i>          | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. major</i>             | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. enrietti</i>          | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. martiniquensis</i>    | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. tonantzenae</i>       | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. tropica</i>           | S   | H   | I   | A   | G   | H   | S   | K   | T   | D   | G   | L   | L   | L   | T   | S   | V   | A   | S   | V   | P   | S   | T   | M   | V   | Q   | T   | T   | N   | N   | A   |
| <i>L. ethiopica</i>         | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | A   |
| <i>L. arabica</i>           | G   | A   | V   | T   | -   | E   | E   | V   | G   | G   | K   | V   | V   | V   | I   | S   | I   | V   | T   | K   | E   | T   | Q   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | Q   |
| <i>L. gerbilli</i>          | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | I   | T   | Y   | Q   |
| <i>L. tucumana</i>          | S   | H   | I   | A   | G   | H   | S   | K   | T   | D   | G   | L   | L   | L   | T   | S   | V   | A   | S   | V   | P   | S   | T   | M   | V   | Q   | T   | T   | N   | N   | A   |
| <i>L. orientalis</i>        | S   | F   | I   | T   | G   | K   | K   | Q   | T   | E   | G   | L   | L   | L   | T   | T   | I   | A   | T   | A   | K   | T   | T   | I   | T   | K   | S   | V   | T   | Y   | A   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

|                            | 439 | 440 | 442 | 444 | 446 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 461 | 463 | 465 | 466 | 474 | 475 | 476 | 478 | 480 | 483 | 484 | 485 | 486 | 487 | 490 | 492 | 494 | 495 |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSC1 | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. guyanensis</i>       | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. shawi</i>            | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. braziliensis</i>     | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. peruviana</i>        | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. naiffi</i>           | P   | G   | H   | Q   | X   | A   | M   | T   | X   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. taitani</i>          | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. mexicana</i>         | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. amazonensis</i>      | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. donovani</i>         | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. chagasi</i>          | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. infantum</i>         | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. major</i>            | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. enrieti</i>          | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. martiniquensis</i>   | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. tarentaise</i>       | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. tropica</i>          | R   | N   | V   | K   | F   | P   | L   | V   | S   | Q   | C   | Q   | C   | T   | T   | T   | D   | K   | A   | R   | N   | T   | V   | N   | T   | D   | G   | I   | S   | V   | E   |
| <i>L. aesthiopica</i>      | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |
| <i>L. arabica</i>          | P   | S   | L   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | A   | V   | D   | E   | N   | S   | Q   | T   | S   | D   |
| <i>L. gerbilli</i>         | P   | S   | L   | Q   | F   | G   | M   | V   | S   | Q   | N   | R   | L   | K   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | A   | V   | D   | E   | N   | S   | Q   | T   | S   | D   |
| <i>L. turanica</i>         | R   | N   | V   | K   | F   | P   | L   | T   | K   | D   | C   | Q   | C   | T   | T   | T   | D   | K   | A   | R   | N   | T   | V   | N   | T   | D   | G   | I   | S   | V   | E   |
| <i>L. orientalis</i>       | P   | G   | H   | Q   | F   | A   | M   | T   | K   | D   | C   | H   | L   | T   | D   | S   | G   | V   | P   | Q   | E   | T   | L   | D   | A   | N   | G   | N   | S   | E   | E   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

|                            | 496 | 497 | 498 | 500 | 501 | 502 | 503 | 507 | 510 | 515 | 516 | 517 | 520 | 523 | 524 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 542 | 544 |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSC1 | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | S   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | M   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. guyanensis</i>       | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | S   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | M   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. shawi</i>            | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | S   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | M   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. braziliensis</i>     | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | S   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | M   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. peruviana</i>        | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | S   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | M   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. naiffi</i>           | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | S   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | M   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. taitani</i>          | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | Q   | A   | K   | A   | Q   | R   | E   | K   | A   |
| <i>L. mexicana</i>         | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | A   | D   | K   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. amazonensis</i>      | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | A   | D   | K   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. donovani</i>         | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | A   | D   | R   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. chagasi</i>          | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | A   | D   | R   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. infantum</i>         | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | A   | D   | R   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. major</i>            | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | E   | D   | K   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. enrieti</i>          | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | A   | K   | Y   | E   | A   | A   | K   | E   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. martiniquensis</i>   | K   | G   | T   | K   | R   | N   | H   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | A   | R   | Y   | E   | Q   | A   | K   | E   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. tarentaise</i>       | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | A   | D   | K   | E   | Q   | R   | E   | K   | G   |
| <i>L. tropica</i>          | E   | S   | G   | R   | K   | E   | A   | Q   | T   | K   | E   | Q   | S   | R   | E   | E   | K   | F   | A   | E   | E   | R   | M   | N   | S   | E   | R   | T   |
| <i>L. aesthiopica</i>      | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | M   | K   | Y   | E   | E   | D   | K   | A   | Q   | R   | D   | K   | G   |
| <i>L. arabica</i>          | K   | S   | S   | K   | R   | E   | E   | T   | K   | E   | E   | E   | R   | R   | E   | A   | E   | F   | E   | D   | E   | R   | K   | V   | R   | E   | K   | S   |
| <i>L. gerbilli</i>         | K   | S   | S   | K   | R   | E   | E   | T   | K   | E   | E   | E   | R   | R   | E   | A   | E   | F   | E   | D   | E   | R   | K   | V   | R   | E   | K   | S   |
| <i>L. turanica</i>         | E   | S   | G   | R   | K   | E   | A   | Q   | T   | K   | E   | Q   | S   | R   | E   | E   | K   | F   | A   | E   | E   | R   | M   | N   | S   | E   | R   | T   |
| <i>L. orientalis</i>       | K   | G   | T   | K   | R   | N   | Q   | T   | K   | K   | D   | E   | R   | N   | D   | A   | K   | Y   | E   | A   | A   | K   | E   | Q   | R   | D   | K   | G   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

|                             | 547 | 548 | 549 | 550 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSC-1 | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | A   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. guyanensis</i>        | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | A   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. shawi</i>             | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | A   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. braziliensis</i>      | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | V   | S   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. peruviana</i>         | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | V   | S   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. naiffi</i>            | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | V   | A   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. lainsoni</i>          | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | S   | D   | T   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. mexicana</i>          | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | G   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. amazonensis</i>       | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | G   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. donovani</i>          | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | G   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. chagasi</i>           | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | G   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. infantum</i>          | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | G   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. major</i>             | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | S   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. enrietti</i>          | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | N   | D   | T   | N   | M   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. martiniquensis</i>    | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | N   | D   | T   | N   | M   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. tarentolae</i>        | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | G   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. tropica</i>           | N   | Y   | T   | F   | M   | R   | A   | T   | L   | D   | D   | P   | D   | V   | Q   | N   | -   | G   | I   |
| <i>L. aethiopica</i>        | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | L   | S   | D   | S   | N   | V   | S   | G   | -   | K   | L   |
| <i>L. arabica</i>           | S   | I   | A   | Y   | L   | R   | N   | Q   | I   | N   | D   | K   | D   | K   | L   | G   | D   | K   | L   |
| <i>L. gerbille</i>          | S   | I   | A   | Y   | L   | R   | N   | Q   | I   | N   | D   | K   | D   | K   | L   | G   | D   | K   | L   |
| <i>L. turanica</i>          | N   | Y   | T   | F   | M   | R   | A   | T   | L   | D   | D   | P   | D   | V   | Q   | N   | -   | G   | I   |
| <i>L. orientalis</i>        | N   | Y   | A   | Y   | M   | K   | N   | T   | I   | N   | D   | P   | N   | M   | S   | G   | -   | K   | L   |

ESPECIE DE LEISHMANIA

|                             | 567 | 568 | 569 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 576 | 577 | 578 | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>L. panamensis</i> -PSC-1 | E   | E   | S   | R   | T   | A   | L   | N   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. guyanensis</i>        | E   | E   | S   | R   | T   | V   | L   | N   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | T   | A   | L   | E   |
| <i>L. shawi</i>             | E   | E   | S   | R   | A   | A   | L   | N   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. braziliensis</i>      | E   | E   | S   | R   | S   | A   | L   | N   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | T   | A   | L   | E   |
| <i>L. peruviana</i>         | E   | E   | S   | R   | S   | A   | L   | N   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. naiffi</i>            | E   | E   | X   | R   | X   | T   | L   | T   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. lainsoni</i>          | E   | E   | S   | K   | A   | A   | L   | N   | S   | A   | I   | S   | A   | I   | D   | T   | A   | L   | E   |
| <i>L. mexicana</i>          | D   | D   | T   | K   | S   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | D   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. amazonensis</i>       | D   | D   | T   | K   | S   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | E   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. donovani</i>          | D   | D   | S   | K   | A   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | D   | V   | T   | L   | E   |
| <i>L. chagasi</i>           | D   | D   | S   | K   | A   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | D   | V   | T   | L   | E   |
| <i>L. infantum</i>          | D   | D   | S   | K   | A   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | D   | V   | T   | L   | E   |
| <i>L. major</i>             | D   | D   | S   | K   | A   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | D   | A   | A   | L   | E   |
| <i>L. enrietti</i>          | E   | E   | S   | K   | T   | T   | L   | S   | N   | A   | I   | N   | A   | I   | E   | S   | A   | L   | T   |
| <i>L. martiniquensis</i>    | E   | E   | S   | K   | T   | A   | L   | S   | K   | A   | I   | K   | A   | I   | E   | S   | A   | L   | E   |
| <i>L. tarentolae</i>        | D   | D   | G   | K   | A   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | E   | A   | T   | L   | E   |
| <i>L. tropica</i>           | T   | Q   | G   | R   | Q   | K   | I   | Q   | D   | A   | V   | D   | A   | V   | S   | A   | A   | S   | S   |
| <i>L. aethiopica</i>        | E   | D   | S   | K   | A   | T   | L   | N   | K   | E   | I   | K   | E   | I   | D   | V   | V   | L   | E   |
| <i>L. arabica</i>           | D   | A   | D   | K   | K   | A   | I   | E   | E   | A   | V   | E   | A   | V   | K   | D   | A   | L   | D   |
| <i>L. gerbille</i>          | D   | A   | D   | K   | R   | A   | I   | E   | E   | A   | V   | E   | A   | V   | K   | D   | A   | L   | D   |
| <i>L. turanica</i>          | T   | Q   | G   | R   | Q   | K   | I   | Q   | D   | A   | V   | D   | A   | V   | N   | A   | A   | S   | S   |
| <i>L. orientalis</i>        | E   | E   | S   | K   | T   | T   | L   | S   | N   | A   | I   | N   | A   | I   | E   | S   | T   | L   | T   |

## REFERENCIAS

1. Christensen HA, De Vasquez AM, Petersen JL. Short report: Epidemiologic studies on cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;60(1):54–57.
2. OPS, OMS. Guía para el abordaje integral de la leishmaniasis en Panamá, 2015. Panamá: 2015. Disponible en: [https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/programas/guia\\_de\\_leishmaniasis\\_2015.pdf](https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/programas/guia_de_leishmaniasis_2015.pdf)
3. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Clinical review Leishmaniasis: new approaches to disease control.
4. Manual de procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en las Américas, 2019 [Internet]. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275320631>
5. Cox FEG. History of human parasitology. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 595–612.
6. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Vol. 7, *PLoS ONE*. 2012.
7. Catalina Tovar A, María Yasnot A. Visceral Leishmaniasis in Latin America and Therapy Perspectives. *Rev MVZ Cordoba*. 1 de mayo de 2017;22:6075–88.
8. Alberto Da Costa/ + C, De V, Peixoto De Toledo PC, Genaro O, Williams P, Mayrink W. Montenegro Skin Test-Evaluation of the Composition and Stability of the Antigen Preparation. Vol. 91, *Mem Inst Oswaldo Cruz*.
9. Skraba CM, de Mello TFP, Pedroso RB, Ferreira ÉC, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop*. el 1 de julio de 2015;48(4):437–44.

10. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Vol. 65, Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. 1990. p. 111–25.
11. Rodriguez, N, Guzman B, Rodas, A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization. Vol. 32, Journal of Clinical Microbiology. 1994.
12. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G. Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol. 93, Rio de Janeiro.
13. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. Vet Parasitol. el 24 de noviembre de 2011;182(1):14–21.
14. Chaves LF, Calzada JE, Valderrama A, Saldaña A. Cutaneous Leishmaniasis and Sand Fly Fluctuations Are Associated with El Niño in Panamá. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(10).
15. Valderrama Cumblera A, Santos M, Castro A, Andrade Filho JD. Especies crípticas Lutzomyia longipalpis (Diptera: Phlebotominae) y sus implicaciones en la en la transmisión de leishmaniasis en Panamá. Revista Médica de Panamá - ISSN 2412-642X. el 30 de abril de 2019;39(1).
16. Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, et al. Molecular epidemiology of American tegumentary Leishmaniasis in Panama. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Octubre de 2009; 81(4):565–71.
17. Saldaña A, Chaves LF, Rigg CA, Wald C, Smucker JE, Calzada JE. Short Report: Clinical Cutaneous Leishmaniasis Rates Are Associated with Household Lutzomyia gomezi, Lu. Panamensis, and Lu. trapidoi Abundance in Trinidad de Las Minas, Western Panama. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Marzo de 2013;88(3):572–4.

18. González K, Calzada JE, Saldaña A, Rigg CA, Alvarado G, Rodríguez-Herrera B, et al. Survey of wild mammal hosts of cutaneous leishmaniasis parasites in Panamá and Costa Rica. *Trop Med Health*. 2015;43(1):75–8.
19. Dutari LC, Loaiza JR. American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: A historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasit Vectors*. el 11 de mayo de 2014;7(1).
20. Brochu C, Haimeur A, Ouellette M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania* [Internet]. *Cell Stress & Chaperones*. Cell Stress Society International; 2004. Disponible en: [www.genedb.org](http://www.genedb.org).
21. Miranda A, Saldaña A, González K, Paz H, Santamaría G, Samudio F, et al. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. septiembre de 2012;106(9):544–8.
22. De Ruiter CM, Van Der Veer C, Leeflang MMG, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3147–55.
23. Poinar G, Poinar R. *Paleoleishmania proterus* (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*. 2004;155(3):305–10.
24. Sung GH, Poinar GO, Spatafora JW. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Mol Phylogenet Evol*. noviembre de 2008;49(2):495–502

25. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. Vol. 10, PLoS Neglected Tropical Diseases. Public Library of Science; 2016.
26. Steverding D. The history of leishmaniasis. Vol. 10, Parasites and Vectors. BioMed Central; 2017. p. 1–10.
27. Lainson R, Rangel EF. Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol. 100, Rio de Janeiro. 2005.
28. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. Vol. 373, The Lancet. Elsevier B.V.; 2009. p. 1570–5.
29. Lainson R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Panamazonica Saude. marzo de 2010;1(2).
30. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. Vol. 6, Clinical Microbiology Reviews. 1993.
31. Llanes A, Restrepo CM, Vecchio G Del, Anguizola FJ, Leonart R. The genome of Leishmania panamensis: Insights into genomics of the L. (Viannia) subgenus. Sci Rep. 2015;5:1–10.
32. Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. Vol. 10, Parasites and Vectors. BioMed Central Ltd.; 2017
33. Sacks D, Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis 1 [Internet]. 2001. Disponible en: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
34. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. Vol. 7, Open Biology. Royal Society Publishing; 2017.

35. Griffin Gwadz. Enfermedades Parasitarias (Parásitos Sin Fronteras). Disponible en: <https://static1.squarespace.com/static/57e567d315d5db08326c632d/t/58f92c6da5790a609ef50079/1492724869370/Parasitic+Diseases+6th+Edition+Spanish+LR+w+Cover.pdf>
36. Killick-Kendrick R. The life-cycle of leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. En: Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. 1990. p. 37–42.
37. Scarpassa VM, Alencar RB. Molecular taxonomy of the two Leishmania vectors Lutzomyia umbratilis and Lutzomyia anduzei (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. Parasit Vectors. 2013;6(1).
38. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers; 1994.
39. Valderrama A, Herrera M, Salazar A. Relación entre la composición de especies del género de Lutzomyia franca (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) y los diferentes tipos de bosques en Panamá. Vol. 24, Acta Zoológica Mexicana (n.s.). 2008.
40. Valderrama A, Tavares MG, Dilermando J, Filho A. Phylogeography of the Lutzomyia gomezi (Diptera: Phlebotominae) on the Panama Isthmus [Internet]. 2014. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/9>
41. Magill A. J. (1995). Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatologic clinics*, 13(3), 505–523.
42. Oliveira GMG de, Figueiró Filho EA, Andrade GM de C, Araújo LA de, Oliveira MLG de, Cunha RV da. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de



Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Panamazonica Saude*. septiembre de 2010;1(3).

43. Klaus SN, Frankenburg S. *Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis*. 1999.
44. Del Miranda AC, González KA, Samudio F, Pineda VJ, Calzada JE, Capitan-Barrios Z, et al. Molecular identification of parasites causing cutaneous leishmaniasis in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. el 1 de abril de 2021;104(4):1326–34.
45. Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Negl Trop Dis*. marzo de 2010;4(3).
46. Valderrama A, Tavares MG, Dilermando J, Filho A. Phylogeography of the *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Phlebotominae) on the Panama Isthmus [Internet]. 2014. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/9>
47. Herrer A, Christensen HA, Beumer RJ. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1973;
48. Serafim TD, Coutinho-Abreu I V., Dey R, Kissinger R, Valenzuela JG, Oliveira F, et al. *Leishmaniasis: the act of transmission*. Vol. 37, *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 976–87.
49. Berman J. *Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment*. 2005;
50. Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. octubre de 2003;97(SUPPL. 1).

51. Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. Vol. 46, International Journal of Dermatology. 2007. p. 132–42.
52. Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. Trop Med Health [Internet]. 2016;44(1):1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s41182-016-0002-0>
53. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. Vol. 3, Frontiers in Immunology. 2012.
54. Gallo S, Galvis Franco W, Jaramillo Ayerbe F, Van den Enden Medina L. Leishmaniasis cutánea crónica en el nuevo mundo: serie de casos de otra gran simuladora. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica. el 8 de febrero de 2023;30(2).
55. Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. QJM. 2014;
56. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Vol. 7, Lancet Infectious Diseases. 2007. p. 581–96.
57. Del Rosal Rabes T, Baquero-Artigao F, García Miguel MJ. Abril/junio. Vol. 46, Revista Pediatría de Atención Primaria •. 2010.
58. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol. marzo de 2007;25(2):203–11.
59. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. Vol. 6, Clinical Microbiology Reviews. 1993.

60. Braz LMA. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: What happened with MST (Montenegro skin test) in Brazil? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61(December 2018):2018–20.
61. Guedes DC, Minozzo JC, Pasquali AKS, Faulds C, Soccol CR, Thomaz-Soccol V. New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(6):788–94.
62. Romero LI, Paz HM, Ortega-Barría E, Bayard V, Hochberg LP, Collins KM, et al. Evaluation of serological assays based on a novel excreted antigen preparation for the diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *J Microbiol Methods*. junio de 2004;57(3):391–7.
63. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da Silva ES, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 7, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2013.
64. Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Vol. 22, *Molecular Diagnosis and Therapy*. Springer International Publishing; 2018. p. 443–57.
65. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. Vol. 36, *Journal of Clinical Microbiology*. 1998.
66. Nicolas L, Prina E, Lang T. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of. *Society*. 2002;40(5):1666–9.

67. De Almeida ME, Koru O, Steurer F, Herwaldt BL, Da Silva AJ. Detection and differentiation of *Leishmania* spp. In clinical specimens by use of a SYBR green-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* el 1 de enero de 2017;55(1):281–90.
68. Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schöni G, Abdeen Z. Identification of Old World *Leishmania* species by PCR-RFLP of the 7 spliced leader RNA gene and reverse dot blot assay. *Tropical Medicine and International Health.* 2010;15(8):872–80.
69. Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis by Nucleic Acid Detection Using PCR. Snounou G, editor. *PLoS One.* el 29 de abril de 2011;6(4):e19304.
70. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for leishmania species typing in european tropical infectious disease clinics. *Eurosurveillance.* 2013;18(30).
71. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J Clin Microbiol.* mayo de 2004;42(5):2294–7.
72. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology.* julio de 2010;137(8):1159–68.
73. Berman JD. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years [Internet]. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article/24/4/684/439989>

74. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Vol. 19, Trends in Parasitology. Elsevier Ltd; 2003. p. 502–8.
75. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. Vol. 15, International Journal of Infectious Diseases. 2011.
76. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Vol. 57, Molecular Aspects of Medicine. Elsevier Ltd; 2017. p. 1–29.
77. Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JMC, Costa GGL, Herai RH, et al. The genome sequence of leishmania (*Leishmania*) amazonensis: Functional annotation and extended analysis of gene models. DNA Research. diciembre de 2013;20(6):567–81.
78. Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. Vol. 31, Trends in Parasitology. Elsevier Ltd; 2015. p. 100–8.
79. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. Vol. 36, Journal of Clinical Microbiology. 1998.
80. Nicolas L, Prina E, Lang T. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 2002;40(5):1666–1669.
81. Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites

- by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;72(4):423–9.
82. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):1–13.
  83. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3892–904.
  84. Jara M, Adaui V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1826–33.
  85. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012;5(1):15. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/15>
  86. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One*. 2014;9(2).
  87. Diotallevi A, Buffi G, Ceccarelli M, Neitzke-Abreu HC, Gnutzmann LV, da Costa Lima MS, et al. Real-time PCR to differentiate among *Leishmania* (*Viannia*) subgenus,

Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Leishmania) amazonensis: Application on Brazilian clinical samples. *Acta Trop.* 2020.

88. Hide, M., Bras-Goncalves, R., & Banuls, A. L. (2007). Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. *Parasitology*, 134(3), 379-389.
89. León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, et al. Analytical performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Front Microbiol.* 2017;8(OCT):1–13.
90. Gow I, Millar D, Ellis J, Melki J, Stark D. Semi-quantitative, duplexed qPCR assay for the detection of leishmania spp. using bisulphite conversion technology. *Trop Med Infect Dis.* 2019;4(4).
91. Adams ER, GMA, SL, RR, MR, CA, AA, SH, & SNG. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology.* 2014;141(14):1891–7.
92. Rosales-Chilama M, Rosales-Chilama M, Diaz-Moreno N, Diaz-Moreno N, Dario Prieto M, Giraldo-Parra L, et al. Comparative assessment of DNA targets and amplification methods for leishmania (*Viannia*) detection in human samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2020;102(6):1323–7.
93. Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(7):4493–9.

94. Genest PA, Haimeur A, Légaré D, Sereno D, Roy G, Messier N, et al. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;
95. Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, Del Castillo A, et al. Cloning and characterization of the *Leishmania (viannia) braziliensis* HSP70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rlb70(513-663). *Journal of Parasitology*. abril de 2003;89(2):372–8.
96. Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*. marzo de 2007;134(3):369–77.
97. Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;
98. Valencia BM, Veland N, Alba M, Adaui V, Arevalo J, Low DE, et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR for the Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *PLoS One*. el 21 de noviembre de 2012;7(11).
99. Suárez M, Valencia BM, Jara M, Alba M, Boggild AK, Dujardin JC, et al. Quantification of *leishmania* (*Viannia*) kinetoplast DNA in ulcers of cutaneous leishmaniasis reveals inter-site and intersampling variability in parasite load. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):1–14.
100. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Van der Auwera G, Marín M, et al. Molecular identification of *Leishmania* spp. in clinical isolates from Colombia based on hsp70 gene. *Biomedica*. 2016;36:37–44.



101. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010;
102. Cantanhêde LM, Mattos CB, De Souza Ronconi C, Filgueira CPB, Da Silva Júnior RF, Limeira C, et al. First report of *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* causing tegumentary leishmaniasis in the Brazilian western Amazon region. *Parasite*. 2019;26.
103. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes [Internet]. Vol. 36, *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. Disponible en: <http://jcm.asm.org/>
104. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. el 1 de julio de 2003;41(7):3147–53.
105. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*. 1993;11(9):1026–30.
106. Castelli G, Bruno F, Reale S, Catanzaro S, Valenza V, Vitale F. Diagnosis of leishmaniasis: Quantification of parasite load by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Pathogens*. el 1 de julio de 2021;10(7).
107. Lopez M, IR, CM, EJ, LCA, OC, & AJ (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work procedure. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;49(3):348–56.
108. Peña C. Comentario: Métodos de inferencia filogenética. *Rev peru biol*. 2011;18(2):265–7.

109. Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of Leishmania Species. PLoS Negl Trop Dis. el 29 de febrero de 2016;10(2).
110. Nemati S, Fazaeli A, Hajjarian H, Khamesipour A, Anbaran MF, Bozorgomid A, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of the Iranian Leishmania parasites based on HSP70 gene PCR-RFLP and sequence analysis. Korean Journal of Parasitology. el 1 de agosto de 2017;55(4):367–74.
111. Espada CR, Ortiz PA, Shaw JJ, Barral AMP, Costa JML, Uliana SRB, et al. Identification of Leishmania (Viannia) species and clinical isolates of Leishmania (Leishmania) amazonensis from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations. Diagn Microbiol Infect Dis. el 1 de agosto de 2018;91(4):312–8.
112. Mendieta D, Vásquez V, Jaén L, Pineda V, Saldaña A, Calzada JE, et al. Insights into the Genetic Diversity of Leishmania (Viannia) panamensis in Panama, Inferred via Multilocus Sequence Typing (MLST). Pathogens. el 1 de mayo de 2023;12(5).
113. Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World Leishmania species. Parasitology. marzo de 2007;134(3):369–77.
114. Kato H, Gomez EA, Seki C, Furumoto H, Martini-Robles L, Muzzio J, et al. PCR-RFLP analyses of leishmania species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. PLoS Negl Trop Dis. el 1 de mayo de 2019;13(5).

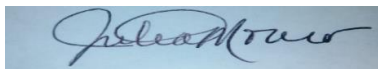
115. Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis.* octubre de 2012;74(2):142–50.
116. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van Der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* julio de 2012;31(7):1453–61.
117. Reina AM, Mewa JC, Calzada JE, Saldaña A. Characterization of *Leishmania* spp. Causing Cutaneous Lesions with a Negative Parasitological Diagnosis in Panama. *Trop Med Infect Dis.* el 1 de octubre de 2022;7(10).
118. León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, et al. Analytical performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Front Microbiol.* el 4 de octubre de 2017;8(OCT).
119. Filgueira CPB, Moreira OC, Cantanhêde LM, de Farias HMT, Porrozzi R, Britto C, et al. Comparison and clinical validation of QPCR assays targeting *leishmania* 18s rDNA and HSP70 genes in patients with american tegumentary leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* el 1 de octubre de 2020;14(10):1–18.
120. Barrio A, Mora MC, Ramos F, Moreno S, Samson R, Basombrío MA. Short Report: Use of kDNA-based Polymerase Chain Reaction as a Sensitive and Differentially Diagnostic Method of American Tegumentary Leishmaniasis in Disease-Endemic Areas of Northern Argentina. 2007.

121. Inst M, Cruz O, Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo O, Adolfo G, et al. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. Vol. 104. 2009.
122. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. abril de 2006;44(4):1435–9.
123. Pereira L de OR, Moreira RB, de Oliveira MP, Reis S de O, de Oliveira Neto MP, Pirmez C. Is Leishmania (Viannia) braziliensis parasite load associated with disease pathogenesis? International Journal of Infectious Diseases. el 1 de abril de 2017;57:132–7.
124. Ehrlich A, Moreno Castilho T, Goldsmith-Pestana K, Chae WJ, Bothwell ALM, Sparwasser T, et al. The Immunotherapeutic Role of Regulatory T Cells in Leishmania (Viannia) panamensis Infection . The Journal of Immunology. el 15 de septiembre de 2014;193(6):2961–70.
125. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. Hum Immunol. junio de 2009;70(6):383–90.
126. Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y ichi, Kato H, Marco JD, et al. Phylogenetic analysis of the genus Leishmania by cytochrome b gene sequencing. Exp Parasitol. abril de 2009;121(4):352–61.
127. Davila M, Pineda V, Calzada JE, Saldaña A, Samudio F. Evaluation of cytochrome b sequence to identify leishmania species and variants: The case of Panama. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2021;116(1).

128. Leishman, W.B. (1903). On the possibility of the occurrence of tripanosomiasis in India.  
British Medical Journal, 1(2213), 1252.  
<https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2513550&blobtype=pdf>

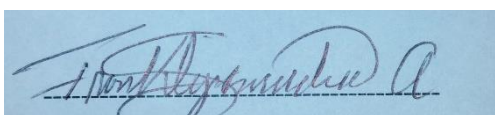
**Firmas****Fecha**

Firma del estudiante:



Septiembre 2020

Firma del Asesor de tesis.



Firma de los miembros de la Comisión de Tesis:

---

---

---

---

---

---

Firma del Coordinador:

---

---

Firma del director de Postgrado de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado:

---

---