



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARÁSITOLOGÍA

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

TESIS

**USO DEL GEN CITOCROMO B (CYTB) PARA LA DETERMINACIÓN DE
ESPECIES EN AISLADOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA)*, EN LA REPÚBLICA DE
PANAMÁ**

LICDA. MICHELLE M. DÁVILA M.

C.I.P. 8-828-841

Trabajo de graduación para optar
por el Título Magister Scientiae
en Microbiología Ambiental

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2021

DEDICATORIA

En memoria de mi amada madre, que desde el cielo vigila mis pasos.

Mamá Osa iniciaste este camino a mi lado, pero Dios te llamo antes de culminarlo.

Con amor,

Tu hija

AGRADECIMIENTOS

- Deja que las promesas de Dios brillen sobre tus problemas. ~ Corrie Ten Boom

Gracias a Dios por permitirme completar un paso más, en mi desarrollo profesional, a pesar de los numerosos obstáculos, que a lo largo de este camino se presentaron.

Agradezco infinitamente a los Doctores Azael Saldaña, director e Investigador de la Sección de Parasitología y José Calzada director de (DIDETEC) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la salud (ICGES), por facilitarme el uso de sus instalaciones, insumos y apoyo. Al Dr. Franklyn Samudio, mi más profundo agradecimiento por compartir sus ideas y conocimientos especializados en Parasitología y Análisis Molecular. Gracias por su empatía aun en la más difícil de las circunstancias.

Un especial agradecimiento a las Licenciadas Vanessa Pineda y Vanessa Vásquez por su invaluable consejería, ambas con sus conocimientos e infinita paciencia supieron aclarar mis dudas e inquietudes, de forma oportuna.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación SENACYT, por el apoyo financiero que brindan a través de las convocatorias de fondos para Investigación y Desarrollo. Este apoyo es fundamental para que científicos panameños formados en el extranjero logren establecer sus líneas de investigación aplicadas a la realidad de nuestro país.

A los/as profesores/as del Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, pues sin ellos no habríamos llegado hasta este momento cumbre, quienes compartieron sus conocimientos y despertaron en mi esa pasión por la investigación científica. A todos los compañeros de Maestría, pues con ellos compartí momentos inolvidables, sonrisas y lágrimas, horas de estudio y de esparcimiento. Gracias a todas aquellas personas que me brindaron aliento para no claudicar, en esta carrera, no de velocidad sino de resistencia y perseverancia.

Michelle Dávila

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE ILUSTRACIONES	VIII
ÍNDICE TABLAS	XI
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVIII
GENERALIDADES DEL ESTUDIO	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS DE TRABAJO	5
CAPÍTULO 1: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	6
LEISHMANIASIS ASPECTOS RELEVANTES	7
Epidemiología Mundial	7
Situación epidemiológica en las Américas y Panamá	9
MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIASIS	14
Leishmaniasis Cutánea (LC)	14
Leishmaniasis visceral (LV)	14
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	14
TRATAMIENTO	15
BIOLOGÍA DEL PARÁSITO	15
Morfología	15
Ciclo de Vida	16
Características moleculares del parásito	19
Taxonomía, subgéneros y complejos de especies	21
USO DEL CITOCROMO B PARA EL ANÁLISIS GÉNERO <i>LEISHMANIA</i>	22
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	24
CONSIDERACIONES BIOÉTICAS DEL ESTUDIO	25
AISLADOS DE LEISHMANIA ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO	25
Procesamiento de Muestras	25
Caracterización molecular del gen del citocromo B (cytb) en aislados locales de <i>Leishmania</i> spp.	26
Análisis de resultados	29
CAPÍTULO 3: PRINCIPALES HALLAZGOS	31
EVALUACIÓN DE LAS SECUENCIAS PARCIALES Y COMPLETAS DE CYTB	32
INFERENCIA FILOGENÉTICA	33

ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS	34
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	51
FIGURAS	65
TABLAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de anidamiento de cebadores y longitud del fragmento de interés cytb	66
Figura 2. Amplificación de cytb fragmento de 948bp	66
Figura 3. Árbol filogenético inferido del análisis bayesiano del gen cytb usando Mr. Bayes v. 3.2.....	67
Figura 4. Mapa de Distribución de especies del Subgénero <i>Viannia</i> encontradas por la secuenciación de cytb	68
Figura 5. Red de haplotipos inferida por un método de unión mediana utilizando secuencias de citocromo b de <i>Leishmania panamensis</i>	68

ÍNDICE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estado de endemividad de la Leishmaniasis cutánea en el mundo 2019. Fuente: (www.who.int/images/default-source/maps/Leishmaniasis_cl_2019.png).	8
Ilustración 2. estado de endemividad de la Leishmaniasis cutánea en el mundo 2019. Fuente: (www.who.int/images/default-source/maps/Leishmaniasis_vl_2019.png).	9
Ilustración 3. Mapa con el índice combinado de transmisión de Leishmaniasis, 2019. Fuente: SisLeish - OPS/OMS - MINSA	13
Ilustración 4. Leishmaniasis cutánea: lesión única, ulcerada, pequeña, con bordes elevados infiltrados.	14
Ilustración 5. Leishmaniasis cutánea única Fuente: (OPS, 2019).	14
Ilustración 6. Leishmaniasis mucocutánea: Fuente: (OPS, 2019).	14
Ilustración 7. Las lesiones de Leishmaniasis cutánea difusa. Fuente: Freitas, C. <i>et al.</i> , 2018).	14
Ilustración 8. Leishmaniasis cutánea diseminada: Fuente: (OPS/OMS, 2019).	14
Ilustración 9. Leishmania recidivante Fuente: (Calvopina <i>et al.</i> , 2005).	14
Ilustración 10. Ciclo de vida de Leishmania spp.	16
Ilustración 11. (A) <i>Lu. panamensis</i> , (B) <i>Lu. gomezi</i> , (C. Fuente: foto MSc. Chystrie Rigg IGCES.	18
Ilustración 12. Conformación del ADN del cinetoplasto.	20
Ilustración 13. El maxicirculo del ADNk y los genes que lo componen y la longitud de los fragmentos en 5 especies de <i>Leishmania</i> : <i>L. major</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> y <i>L. tarentolae</i> . Fuente:(Akhoundi <i>et al.</i> , 2017).	21

Ilustración 14. Complejos de especies de <i>Leishmania</i> . Fuente: (van der Auwera & Dujardin, 2015).	22
Ilustración 15. Mapas con las zonas geográficas de donde se obtuvieron las muestras analizadas en el estudio.....	25

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Secuencias cytb parciales recuperadas de GenBank para describir sitios polimórficos que discriminan los complejos de <i>Leishmania</i>	70
Tabla 2. Secuencias cytb completas recuperadas de GenBank para diseñar cebadores específicos de <i>Leishmania</i>	88
Tabla 3. Estimaciones de la distancia evolutiva entre grupos de secuencias de cytb de <i>Leishmania</i>	89
Tabla 4. Distribución de Haplotipos por zona geográfica y frecuencia acumulada	89
Tabla 5. Sitios informativos de singletons y parsimonia encontrados en las secuencias de cytb analizadas.....	90

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	ADN del cinetoplasto
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNg	ARN guías
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNpol II	ARN polimerasa II
ARNr	ARN ribosomales
AVAD'S	Años de vida ajustados por discapacidad o Daly's Disability Adjusted Life Years (en inglés)
Boostrap	Análisis estadístico que determina el soporte de los grupos monofiléticos
COI	Citocromo C oxidasa subunidad I
COII	Citocromo C oxidasa subunidad II
COIII	Citocromo C oxidasa subunidad III
CoQ	Coenzima Q
cytb	citocromo b
Hsp70	Proteína del choque térmico de 70 kDa
Hsp83	Proteína del choque térmico de 83 kDa
kDa	Kilodalton
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LD	Leishmaniasis diseminada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LR	Leishmaniasis cutánea recidiva
LTA	Leishmaniasis tegumentaria americana
LV	Leishmaniasis visceral
Mg	Microgramos
Mg	Miligramos
MSPL	Principal proteasa de superficie
MURF	Marcos abiertos de lectura del maxicírculo
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido
ND	Subunidad de la nicotinamida adenín dinucleótido deshidrogenasa

NTD's	Neglected tropical diseases
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC	Grupos de genes policistrónicos
RFLP	Polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción
RPS12	Proteína ribosomal S12
SisLeish	Sistema de Información de Leishmaniasis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism / Polimorfismo de un simple nucleótido
USD	United States dollar
UTR	Secuencias transcritas, pero no traducidas

RESUMEN

La leishmaniasis tegumentaria (LT), es una de las parasitosis de transmisión vectorial de las más frecuentes en Panamá, cuya incidencia aproximada es de 26,8 por cada 100 000 habitantes. *Leishmania (V.) panamensis*, es la especie implicada en la mayoría de los casos reportados. La LT es considerada una enfermedad tropical desatendida, que afecta a poblaciones en situación socioeconómica vulnerable que habitan en zonas endémicas y a los visitantes de dichas zonas. En Panamá 90,1% de la población habita en zonas de transmisión. Estudios recientes revelan que la leishmaniasis produce una carga de enfermedad de 2,35 millones de AVAD (años de vida perdidos ajustados por discapacidad), de los cuales 2,3% recaen en las Américas. La progresión clínica de esta parasitosis es multifactorial, depende en gran medida del estado inmunológico del individuo, el grado de virulencia de la especie infectante y su resistencia a fármacos. Se han asociado complejos de especies a manifestaciones clínicas específicas como lo son la leishmaniasis mucocutánea; una de las formas más deformantes y discapacitantes. Para este estudio se diseñó una estrategia de amplificación por PCR convencional y secuenciamiento de Sanger de una región de 948pb del gen del citocromo b (cytb), presente en los maxicírculos del cinetoplasto de *Leishmania*. Se analizaron un total de 100 aislados procedentes de áreas endémicas como: Bocas del toro, Coclé, Panamá Oeste, Panamá y Darién. A las secuencias obtenidas se sometieron un Análisis Bayesiano con el software Mr.Bayes v.3.2. para determinar la presencia de haplotipos se analizaron mediante el software PopART v.1.7. El fragmento de 948bp analizado cuenta con suficiente poder resolutivo para discriminar entre especies de *Leishmania*, con un 100% de concordancia respecto al enfoque de PCR-RFLP del gen Hsp70 publicado anteriormente. Se confirma que *L. (V.) panamensis* es la especie más frecuente, también circulan *L. guyanensis*, *L. braziliensis* y *L. naiffi*. El 15% de las secuencias cytb evaluadas, consisten en 145 polimorfismos de un simple nucleótido, que incluyendo 42 singletons y 103 sitios parsimonia informativa que ayudan discriminar a los miembros del subgénero de *Viannia* y distingue entre los tres complejos de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo. Además, este fragmento permitió identificar tres haplotipos de *L. panamensis* y dos haplotipos de *L. guyanensis* que circulando en la región oeste del país.

ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis (TL) is one of the most frequent vector-borne parasitosis in Panama, with an approximate incidence of 26,8 per 100,000 inhabitants. *Leishmania (V.) panamensis* is the species implicated in most of the reported cases. TL is considered a neglected tropical disease, affecting socioeconomically vulnerable populations living in endemic areas and visitors to these areas. In Panama, 90.1% of the population lives in transmission areas. Recent studies reveal that leishmaniasis causes a disease burden of 2.35 million DALYs (disability-adjusted life years lost), of which 2.3% fall in the Americas. The clinical progression of this parasitosis is multifactorial, depending largely on the immunological status of the individual, the degree of virulence of the infecting species and its drug resistance. Species complexes have been associated with specific clinical manifestations such as mucocutaneous leishmaniasis, one of the most deforming and disabling forms. For this study, a strategy of conventional PCR amplification and Sanger sequencing of a 948bp region of the Cytochrome B (cytb) gene, present in the maxicircles of the *Leishmania* kinetoplast, was designed. A total of 100 isolates from endemic areas such as Bocas del Toro, Cocle, West Panama, Panama and Darien were analyzed. The sequences obtained were subjected to a Bayesian analysis with Mr.Bayes v.3.2 software. To determine the presence of haplotypes, they were analyzed with PopART v.1.7 software. The 948bp fragment analyzed has sufficient resolving power to discriminate between *Leishmania* species, with 100% concordance with respect to the PCR-RFLP approach of the Hsp70 gene previously published. *L. (V.) panamensis* is confirmed to be the most frequent species, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* and *L. naiffi* are also circulating. Fifteen percent of the cytb sequences evaluated consist of 145 SNP's, including 42 singletons and 103 informative parsimony sites that help discriminate members of the *Viannia* subgenus and distinguish between the three New World *Leishmania* species complexes. In addition, this fragment allowed the identification of three haplotypes of *L. panamensis* and two haplotypes of *L. guyanensis* circulating in the western region of the country.

GENERALIDADES DEL ESTUDIO

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad, transmitida por dípteros hematófagos de la Familia *Psychodidae* popularmente conocidos como “chitras” o “ya te vi”. Esta parasitosis es causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*, actualmente se reconocen al menos 20 especies de este género capaces de afectar al ser humano, ocasionándole dolorosas y deformantes secuelas.

La clasificación taxonómica desde los primeros reportes ha sido un tema de constante revisión, debido a que no existe variación morfológica relevante entre las especies que permita diferenciarlas. Al principio se clasificaron según el tropismo del parásito en el humano o por la región de procedencia del caso; ya en los años 80's se empezó a considerar características, biológicas (sitio de desarrollo en el vector, desarrollo en el huésped vertebrado); características bioquímicas (isoenzimas), características inmunológicas como (reactividad a anticuerpos monoclonales y serotipificación del factor de excreción). Con el desarrollo de la biología molecular, se ha logrado el estudio de genomas completos, genes y de regiones con elementos polimórficos SNP's del parásito. Lo que ha permitido la clasificación en 3 subgéneros *Leishmania (Leishmania)*, *Leishmania (Viannia)* y *Leishmania (Sauroleishmania)*, Clados y hasta la agrupación por complejos de especies.

Uno de los genes que ha demostrado alta sensibilidad para discriminar especies e inferir diversidad inter-intraespecífica tanto en el Viejo Mundo como en las Américas, es el gen citocromo b que se encuentra presente en maxicírculo del cinetoplasto (estructura homóloga a la mitocondria de otros eucariotas), que codifica para una enzima de la cadena respiratoria. Para evaluar la capacidad de este gen para identificar especies y variantes del subgénero

Viannia en aislados locales, se desarrolló una estrategia de PCR, luego de evaluar más de 360 secuencias editadas y preeditadas *in silico*. Se identificó una región de 948bp altamente conservada, pero con suficiente variabilidad para discriminar entre especies del subgénero *Viannia*. Un total de 100 aislados procedentes de áreas endémicas con tasas de transmisibilidad sostenidas se secuenciaron y los resultados del análisis filogenético se correlacionaron con la procedencia geográfica de cada uno.

En Panamá a pesar de haberse estudiado ampliamente esta parasitosis, no se había correlacionado antes la variabilidad genética de los aislados con su sitio de procedencia. Los cambios en la dinámica epidemiológica de la transmisión de la leishmaniasis son potenciados por diversos factores entre los cuales destacan el cambio climático y la alteración antropogénica (las migraciones, la minería y la deforestación en pro del urbanismo) perturban los ciclos interacción entre vector, parásito y huésped; favoreciendo la variabilidad genética y la circulación simpátrica de especies del parásito. Conocer la procedencia de organismos con propiedades biológicas diferentes, presentes en el escenario epidemiológico local, ayuda a comprender el impacto de estas variantes genéticas en la epidemiología y control de la enfermedad. La búsqueda y evaluación de marcadores moleculares que simultáneamente permitan realizar detección, determinación de especies y estudiar la estructura poblacional del parásito, contribuye a informar sobre las variantes genéticas, circulantes en las regiones endémicas y su posible impacto en el tratamiento y formas clínicas de la enfermedad. Lo que robustece los programas de vigilancia epidemiológica, contribuyendo a las iniciativas nacionales y regionales para el control y vigilancia epidemiológica de esta parasitosis.

OBJETIVO GENERAL

Identificar un fragmento dentro del gen (citocromo b) que discrimine entre especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* y sus variantes en aislados clínicos provenientes de diferentes áreas endémicas del país.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar una estrategia de PCR convencional basado en la amplificación del gen del citocromo b del cinetoplasto, para la identificación de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.
- Identificar especies de *Leishmania (Viannia) spp.* de aislados de diferentes áreas endémicas del país mediante PCR, secuenciamiento y análisis filogenético del gen del citocromo b.
- Evaluar la capacidad del gen del citocromo b para determinar variación intraespecífica de *Leishmania* del subgénero *Viannia* mediante análisis de haplotipos utilizando secuencias del gen del citocromo b.
- Determinar los posibles haplotipos con el área geográfica de procedencia.
- Conocer la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* entre los aislados de este estudio.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El gen del citocromo b (cytb) presenta suficiente variación inter e intraespecífica para identificar especies y variantes de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, circulantes en diferentes zonas endémicas de Panamá.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

LEISHMANIASIS ASPECTOS RELEVANTES

Leishmaniasis es el nombre con que se conoce al espectro de manifestaciones clínicas, causadas por la infección con el protozoo hemo flagelado del género *Leishmania* (Armúa-fernández, 2019; Ramírez *et al.*, 2016); cuya transmisión es de tipo vectorial, a través de la picadura de las hembras de la Subfamilia Phlebotominae (Shimabukuro *et al.*, 2017). Se caracteriza por tener una gran complejidad biológica y epidemiológica (Miranda *et al.*, 2016). De acuerdo con su evolución clínica la leishmaniasis se puede clasificar principalmente en 3 formas típicas: Leishmaniasis visceral **LV**, esta es la forma clínica más grave de la enfermedad, a menudo conocida como kala-azar. También se presenta la Leishmaniasis cutánea **LC** (la más común) y Leishmaniasis mucocutánea **LMC** (la más deformante), muchos autores asocian a ambos tipos de manifestaciones clínicas bajo el termino Leishmaniasis Tegumentaria **LT**. (Armúa-fernández, 2019; WHO-PAHO, 2019).

Epidemiología Mundial

Se reconocen al menos, 20 especies del género *Leishmania*, capaces de afectar al hombre. Cada año se reportan 1.3 millones de casos nuevos y de 20-30 mil muertes. (Akhoundi *et al.*, 2016; OPS/OMS, 2017). Existen reportes de casos en los 5 continentes y es considerada endémica en 102 países o territorios (Akhoundi *et al.*, 2016; OPS/OMS, 2017).

Se calcula que alrededor de 350 millones de personas habitan en zonas de riesgo para adquirir la infección. Además, es considerada por la OMS una de las 10 enfermedades de transmisión

vectorial, que afectan a las poblaciones más vulnerables y desfavorecidas del mundo, especialmente en los continentes de Asia, África y América (OPS/OMS, 2017).

La leishmaniasis cutánea está ampliamente distribuida (ver ilustración. 1); destacan tres regiones epidemiológicas: las Américas, el este del Mediterráneo y Asia occidental (desde el Medio Oriente hasta Asia Central). Desde estas zonas se reportan aproximadamente un tercio de los casos. En cuanto a la incidencia global de LC, se estima que ronda el 70 al 75%, con los recuentos más altos reportados principalmente en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Etiopía, Irán, Nicaragua, Perú, Sudán y Siria (WHO-PAHO, 2019). En el caso de Leishmaniasis Visceral, más del 90% de los casos mundiales ocurren en seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán del Sur y Sudán (ver ilustración. 2); (OPS/OMS, 2019).

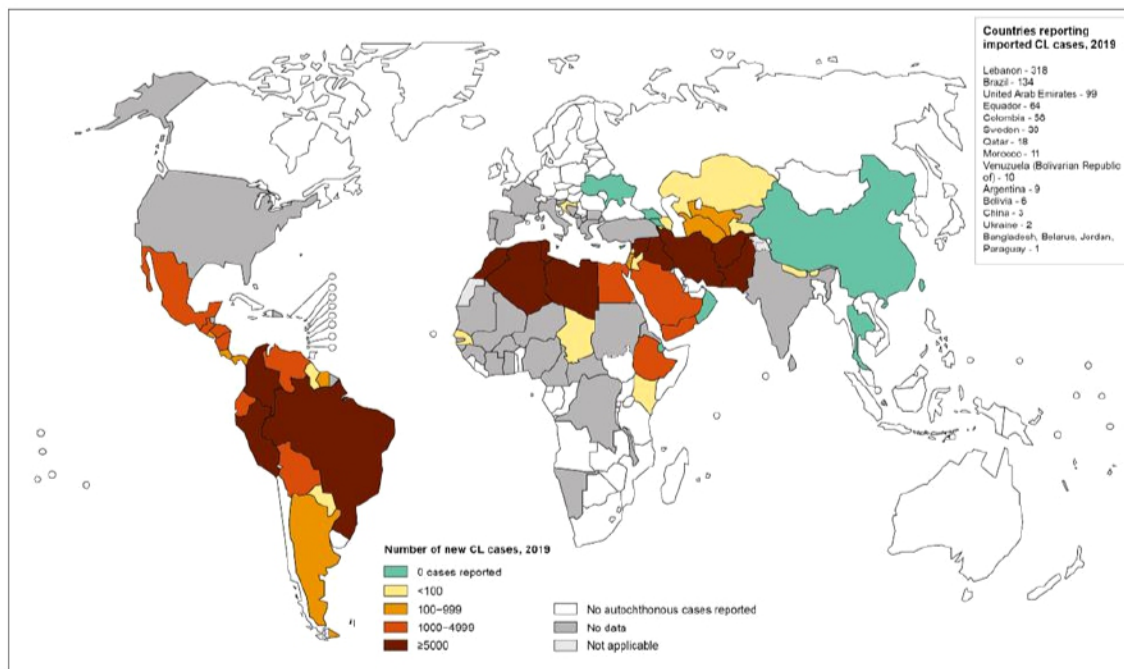
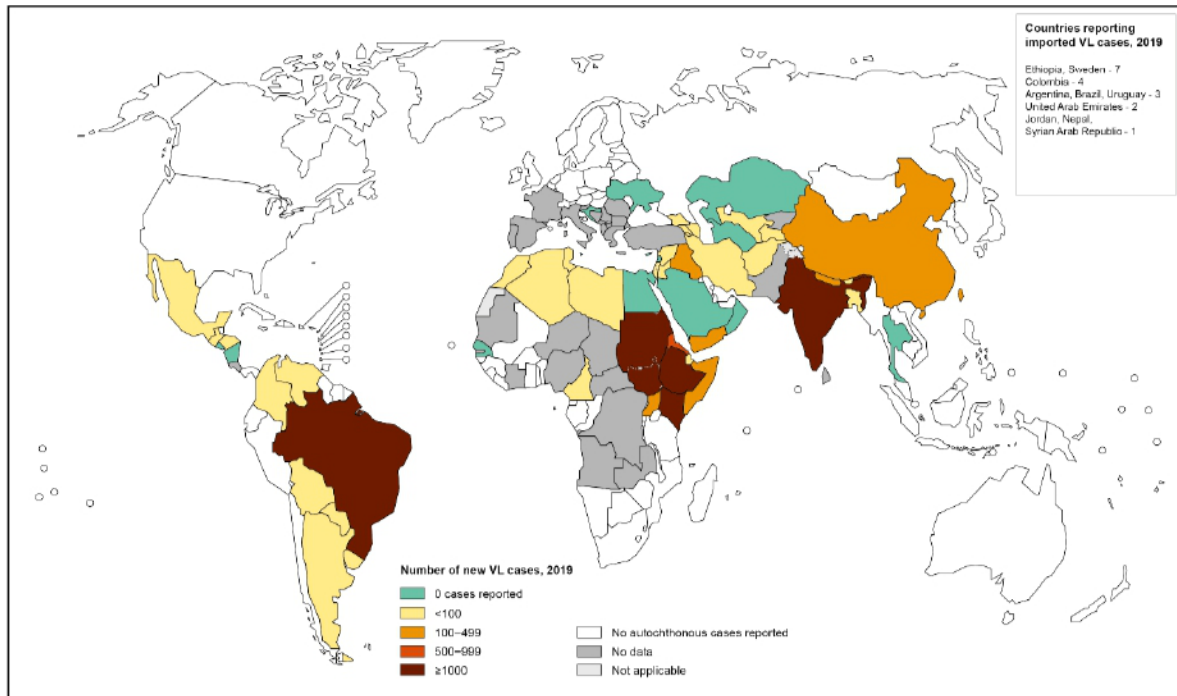


Ilustración 1. Estado de endemicidad de la Leishmaniasis cutánea en el mundo 2019. Fuente: (www.who.int/images/default-source/maps/Leishmaniasis_cl_2019.png).



-Ilustración 2. estado de endemidad de la Leishmaniasis cutánea en el mundo 2019. Fuente: (www.who.int/images/default-source/maps/Leishmaniasis_vl_2019.png).

Situación epidemiológica en las Américas y Panamá

En las Américas, las Leishmaniasis constituyen un problema de salud pública debido a su morbimortalidad y amplia distribución geográfica, afectando principalmente a las personas más pobres y con mayor dificultad de acceso a los servicios de salud (Alvar *et al.*, 2012; OPS/OMS, 2017).

De las 35 naciones que conforman el continente americano, 18 son endémicas para Leishmaniasis; sin embargo, sólo 17 de las mismas reportan obligatoriamente sus casos al Sistema de Información Regional de las Leishmaniasis en las Américas (SisLeish). En el 2019 se reportaron 41 617 casos nuevos por 12 de las 17 naciones endémicas. En los últimos años a nivel de la región, se ha empezado a observar una tendencia decreciente en el número de casos de LT, sin embargo en 5 países (El Salvador, Guatemala, Honduras, México y Suriname) se

ha presentado un incremento en el número de casos anuales (2019), entre los que destacan México y El Salvador, con aumentos de 76% y 360%, respectivamente (OPS/OMS, 2020).

Mientras que en el caso de la Leishmaniasis visceral (LV), 13 países son endémicos y entre los años 2001 al 2019 se han reportado en promedio 3 470 casos anuales. En el 2019, del total de casos, 2 529 (97%) fueron notificados por Brasil y el resto por Argentina, Bolivia, Colombia, Guatemala, Honduras, México, Paraguay, Venezuela y Uruguay. Resaltan por el incremento de casos: Argentina, Paraguay y Uruguay. Bolivia reportó por primera vez un caso de leishmaniasis visceral (WHO-PAHO, 2020). Para comprender la diferencia (aumento o disminución) entre número de casos reportados por los países endémicos del continente, es importante estudiar los determinantes ambientales, sociales y económicos (Ramírez *et al.*, 2016).

En el caso de las determinantes ambientales se destacan las regiones fronterizas entre los países, como zonas con alta prevalencia de leishmaniasis. En el caso de la república de Panamá que limita al Oeste con Costa Rica y al Este con Colombia; dichas áreas poseen densa cobertura boscosa, son puntos estratégicos para el tránsito de migrantes y en ellas residen un gran número de pueblos originarios. Lo que sin duda propicia la interacción de la triada epidemiología (huésped susceptible, agente etiológico y medio ambiente). En el año 2019, el 14% de los casos reportados en provenían de lugares fronterizos (WHO-PAHO, 2020).

Panamá y Costa Rica, son parte del corredor biológico centroamericano, iniciativa regional que promueve la conservación de ciertas áreas en común por contener especies de flora y fauna endémicos o en peligro de extinción y/o ecosistemas naturales únicos; como es el Parque Internacional La Paz, que conecta las provincias de Chiriquí, Bocas del Toro y la Comarca

indígena Ngobe-Bugle (Panamá) con las provincias de San José, Cartago, Limón y Puntarenas (Costa Rica). Dicho país para el trienio 2016-2019 reportó un índice combinado de transmisión Medio, con 601 nuevos casos reportados, donde el 41% de los casos se reportaron en la zona fronteriza con Panamá, en dichas zonas el índice combinado de leishmaniasis está clasificado como intenso a muy intenso. Del total los casos reportados 6 (1%) correspondieron a LC, mientras que el resto 595 (99%) se reportaron sin especificar, esto representa 11,3 nuevos casos por cada 100 000 habitantes. Las especies circulantes son *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*; la mayoría de los afectados son los menores de 15 años (WHO-PAHO, 2020).

En 1989 Zeledón y colaboradores, reportaron los primeros casos de *L. (L.) infantum* = *L. chagasi* ocasionando LC (atípica), en una región semiárida, alrededor de Liberia, Guanacaste; diez años más tarde Carrillo y colaboradores reportaron el primer caso de LV por *L. (L.) infantum* en Costa Rica (Jaramillo-Antillón *et al.*, 2018).

Al este de Panamá la provincia del Darién limita con Colombia, donde se encuentra Parque Nacional Darién, cuya flora y fauna cohabitan con grupos indígenas y migrantes. Durante el trienio 2016-2019, Colombia reportó 5 907 nuevos casos, de los cuales 5 829 casos fueron de leishmaniasis cutánea (98,7%), 78 de leishmaniasis mucosa (1,3%), reportándose 94,2 nuevos casos por cada 100,000 habitantes, lo que equivale a un índice combinado de transmisión INTENSO. En Colombia circulan las especies *L. amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. mexicana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. lansoni*, *L. (V.) naiffi* y *L. venezuelensis*.

Aproximadamente el 52,5% de su población habitan en zonas de transmisión y la mayoría de los casos (60,6%) se reportan en hombres mayores de 20 años (OPS/OMS, 2020).

A pesar de que han transcurrido más de un siglo desde el primer reporte leishmaniasis tegumentaria en Panamá (Darling, 1910). Esta enfermedad sigue siendo una de las zoonosis parasitarias mayor incidencia en nuestro país, con una incidencia de 26,8 nuevos casos cada 100,000 habitantes. Alrededor del 90,1% de toda la población panameña habita en zonas de transmisión (OPS/OMS, 2020). En Panamá no se han reportados casos de leishmaniasis visceral en humanos, a pesar de que se ha comprobado la presencia *Lutzomyia longipalpis*, principal vector de LV. No obstante, es endémica para las formas cutánea y mucocutánea de la enfermedad (Miranda *et al.*, 2009).

En la actualidad se considera que existe un subregistro del 50% del número total de casos reportados, debido a que ocurren en áreas rurales y apartadas donde no se cuenta con la cobertura de atención médica. Además, se han presentados casos cuyo curso clínico es autolimitado, por lo que los pacientes no acuden en busca de atención médica. Inclusive en ocasiones recurren a curas caseras que incluyen: cataplasmas de plantas, aplicación de pasta dental, uso sustancias cáusticas tales como el ácido de batería y en las peores circunstancias la cauterización con una cuchara caliente o un machete (Christensen *et al.*, 1983). Entre los años 2015-2018 el 46% de los reportes de nuevos casos reportados provenían de la provincia de Bocas de Toro, 13% de Coclé, 8% Colón y 6% Panamá Oeste (comunicación oral, MINSA 2019).

Para el año 2019, Panamá reportó la ocurrencia de 920 nuevos casos de Leishmaniasis tegumentaria, de los cuales 891 (96,8%) correspondieron a lesiones cutáneas, 10 (1,1%)

lesiones mucosas y 19 (2,1%) no especificados. Lo que representa un nivel MEDIO de transmisión. Sin embargo, según vemos en la ilustración 3, el índice de transmisión varía entre provincias, por ejemplo en las zonas de Bocas del Toro, Coclé y Panamá Oeste se considera

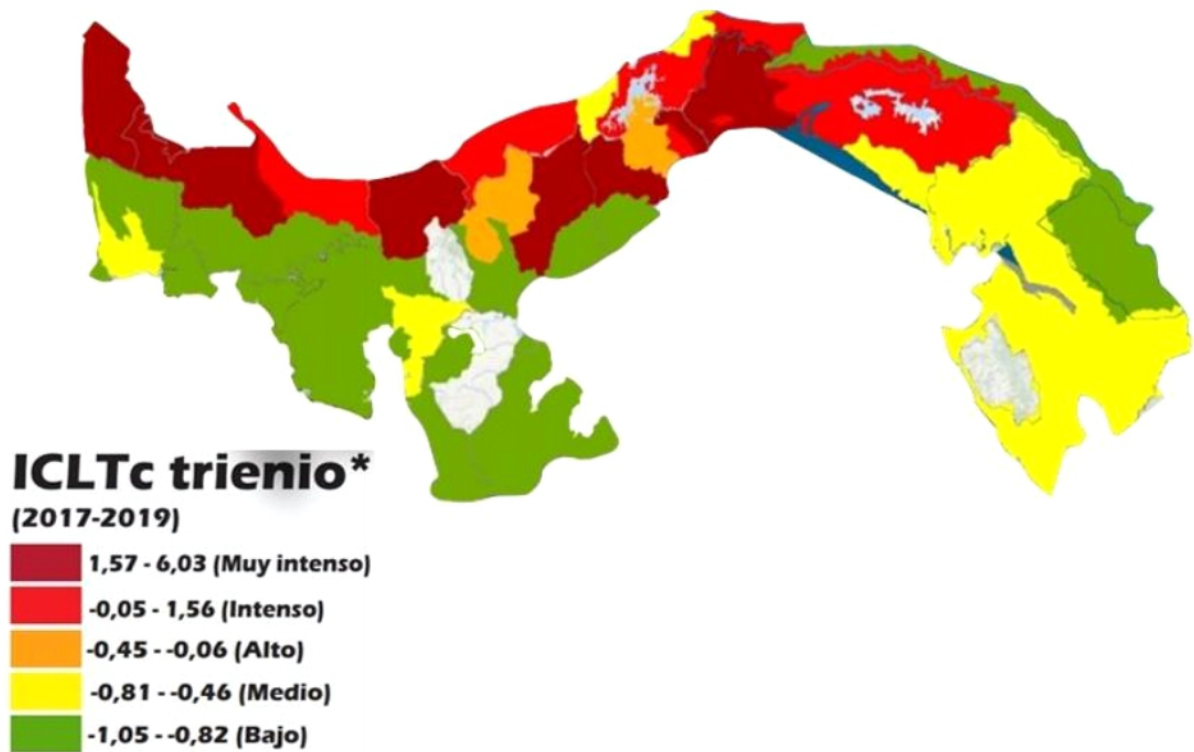


Ilustración 3. Mapa con el índice combinado de transmisión de Leishmaniasis, 2019. Fuente: SisLeish - OPS/OMS - MINSA

MUY INTENSO, mientras que en la zona del Darién mantuvo para el 2019 un índice de transmisión MEDIO (WHO-PAHO, 2020).

En los primeros reportes epidemiológicos de Leishmaniasis en Panamá, las regiones estudiadas en su mayoría eran zonas boscosas de Bocas del Toro, Coclé, Colón, Veraguas, Panamá, San Blas y Darién; en los cuales el perezoso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*), es el principal reservorio del parásito y su transmisión se asociaba principalmente a la incursión del ser

humano a estas zonas por motivos ocupacionales y recreativos (Alvar *et al.*, 2012; Christensen *et al.*, 1983; Miranda *et al.*, 2009). Las especies de este protozoo que circulan en las regiones endémicas son: *L. (V.) panamensis*, que es la más frecuentemente reportada, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) naiffi*; en el pasado se reportó *L. (M) mexicana* (Christensen *et al.*, 1972; Miranda *et al.*, 2009; Sosa *et al.*, 2019).

En la actualidad la ocurrencia de cambios ambientales como Fenómeno de Niño, altera los ciclos de transmisión (Miranda *et al.*, 2009). A pesar de que se reportan casos nuevos todo el año, hay un aumento significativo al inicio de la época lluviosa y del periodo de cosecha (Alvar *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2014). Además, el incremento de la acción antropogénica en zonas boscosas de alta endemicidad para favorecer la urbanización y la explotación minera, acerca a los humanos al vector y cierra el ciclo de transmisión (WHO-PAHO, 2019).

Se han caracterizado tres ciclos diferentes de transmisión de acuerdo con el entorno en que se desarrollan: el selvático, el doméstico-rural y el doméstico-urbano (Christensen *et al.*, 1972; A. Herrero *et al.*, 1973), entre los que se incluye a nuevos reservorios domésticos y silvestres, que aproxima vector y consecuentemente al parásito a zonas peri domiciliarias (De Vásquez *et al.*, 1990; Miranda *et al.*, 2009). En Panamá, alrededor del 45,3% de los casos reportados durante 2019 fueron niños menores de 10 años; mientras que en cuanto a género el 54,6% de los casos se reportó en hombre y el 45,4% en mujeres, lo que indica una posible transmisión domiciliar o peri-domiciliar (WHO-PAHO, 2020).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIASIS

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

TRATAMIENTO

Las sales de antimonio pentavalente, administrado por vía parenteral durante 20 a 28 días, son el tratamiento de primera línea. Reportan tasas de curación clínica de entre el 25% y el 93%, para los casos ocasionados por la infección con *L.(V) panamensis* en adultos. (OPS *et al.*, 2016; Sosa *et al.*, 2019). Actualmente en Panamá existe el antimoniato de meglumina registrado bajo el nombre comercial Glucantime. Otra alternativa farmacológica descrita en la “Guía para el abordaje integral de la Leishmaniasis en Panamá, es el estibogluconato de sodio, pero actualmente no se halla disponible en el país. A pesar de las buenas tasas de recuperación con estos medicamentos, se asocian con toxicidad que puede limitar que el paciente reciba un ciclo completo de tratamiento (OPS *et al.*, 2016). Otras alternativas terapéuticas son la miltefosina (el único que se administra oralmente y puede ocasionar efectos gastrointestinales), la pentamidina y la anfotericina B; las últimas dos se administran parenteralmente (Soto, 2019).

BIOLOGÍA DEL PARÁSITO

Morfología

El protozoo causante de la Leishmaniasis es digenético; presenta dos formas o estadios durante su ciclo de vida. El promastigote (forma extracelular) que mide entre 14 y 20 μm de largo por 2 a 4 de ancho., es alargado (fusiforme) y posee un flagelo anterior que le permite la movilidad en el intestino de los insectos vectores. Y el amastigote (forma intracelular) que mide entre 2 y 5 μm , es esférico u ovoide, carece de flagelo, y se multiplica principalmente en los macrófagos del huésped vertebrado. Ambos estadios poseen una única mitocondria modificada

conocida como cinetoplasto (con forma de bastón) y se multiplican por fisión binaria(OPS/OMS, 2019; Sunter & Gull, 2017).

Ciclo de Vida

La forma infectante, el promastigote metacíclico, es inoculado a través de la picadura de flebotominos, los cuales pueden adquirir la infección de humanos y de reservorios tales como roedores, cánidos y primates. Después de que el flebótomo (chítira) se ha alimentado de un huésped mamífero infectado, los promastigotes móviles se desarrollan y se multiplican en el intestino del vector; en el curso de 8 a 20 días aparecen parásitos infectantes, que son infectantes al picar. En los seres humanos y otros mamíferos, los microorganismos son fagocitados por los macrófagos (ver ilustración 8)(OPS *et al.*, 2016).

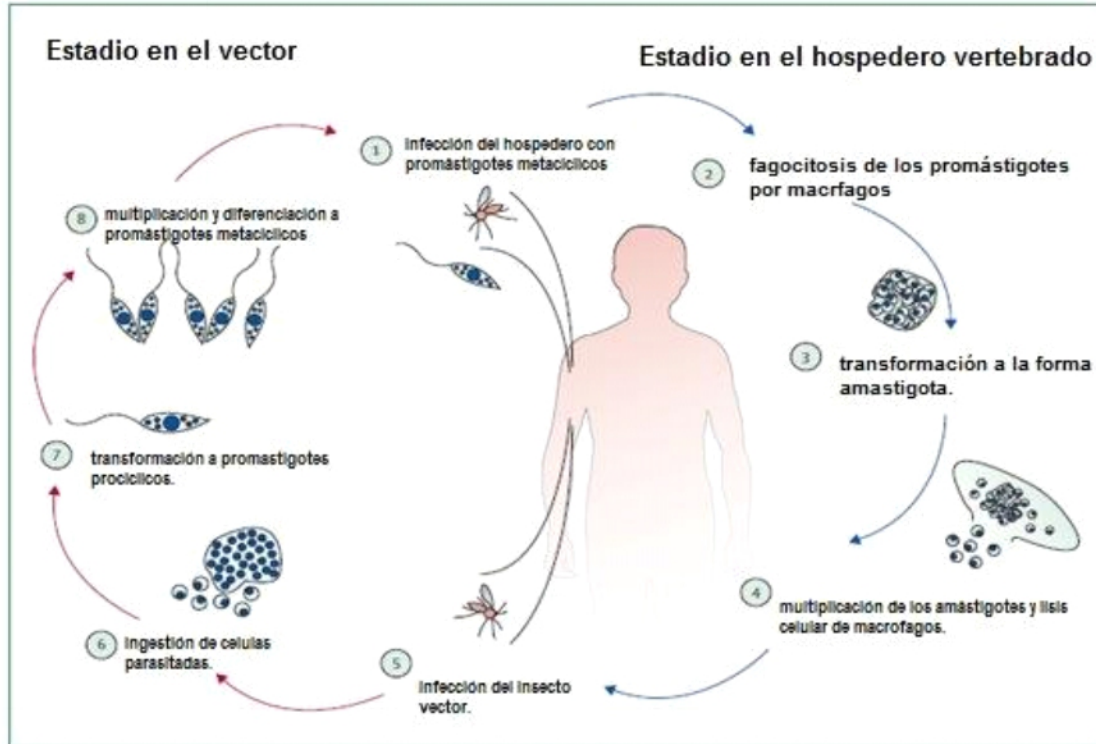


Ilustración 10. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Vector

Los vectores de esta parasitosis son mosquitos de unos 4 mm de tamaño, de la familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*, generalmente conocidos como flebotomíneos (Christensen *et al.*, 1983). Se han identificado a la fecha, seis géneros: tres en el viejo mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Chinius* y tres en América: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warineya* (Rigg *et al.*, 2019; Shimabukuro *et al.*, 2017)

Desarrollan un ciclo de vida holometábolo; las hembras son hematófagas, pues necesitan mucha energía para producir los huevos, poseen un aparato bucal altamente especializado y cuerpo está cubierto de finas setas, sus patas son largas y sus alas son pequeñas (Valderrama *et al.*, 2011).

Localmente los vectores de Leishmaniasis son conocidos como “chitras o yate vi” (OPS/OMS, 2019). De las 76 especies presentes en Panamá, *Lutzomyia gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* (ver ilustración 9), *Lu. sanguinaria*, *Lu. ylephiletor* y *Lu. carrerai thula*; todas con hábitos antropofílicos son mayormente las implicadas en la transmisión al humano. (Chaves *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2009; WHO-PAHO, 2019).

En estudios más recientes, en una zona de alta endemicidad Rigg y colaboradores reportaron la presencia de especies zoofílicas (*Lu. triramula* y *Lu. dysponeta*), lo que pone de manifiesto posibilidad de sinergia que favorezca la transmisibilidad, dado que vectores con preferencias alimentarias distintas, cohabitan en una zona donde el humano y reservorios como el perro cohabitan (Rigg *et al.*, 2019).

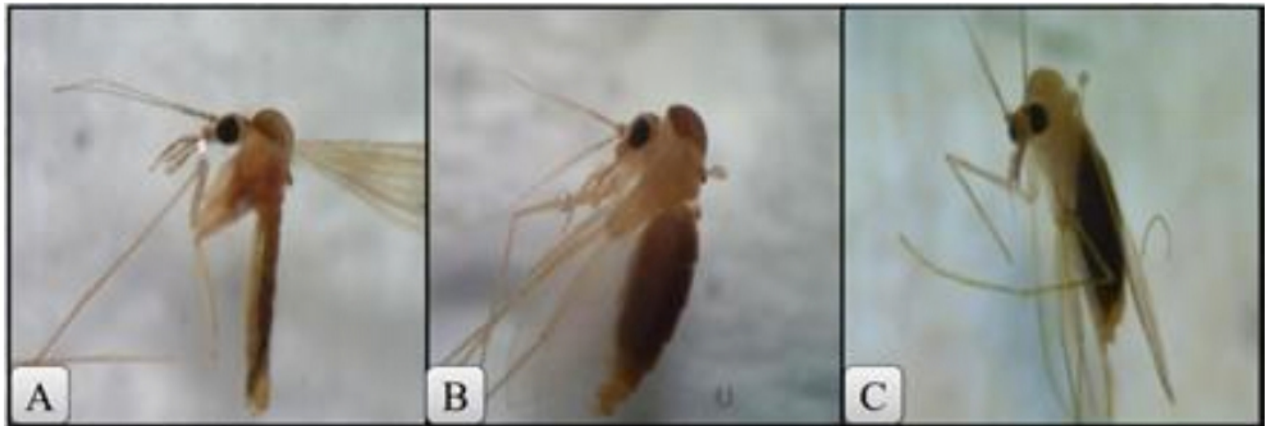


Ilustración 11.(A) *Lu. panamensis*, (B) *Lu. gomezi*, (C). Fuente: foto MSc. Chystrie Rigg IGCES.

Reservorios

En los primeros estudios realizados para comprender la eco-epidemiología de esta parasitosis en Panamá, se identificaron mamíferos forestales con infecciones naturales de leishmaniasis. En este estudio al menos 6 géneros de animales perteneciente a los órdenes Rodentia, Carnivora y Primates estaban infectados con el parásito. En estas zonas forestales o selváticas los perezosos *Choloepus hoffmanni* y *Bradypus infuscatus*, son reservorios importantes para especies de *Leishmania* causantes de leishmaniasis humana (Howard A. Christensen *et al.*, 1983; Aristides Herrer & Telford, 1966). Sin embargo, hoy se sabe que no solo estos mamíferos tienen importante implicación en los ciclos de transmisión de leishmaniasis, sino que también se asocian mamíferos menor tamaño como lo son los marsupiales, tales como *Didelphis marsupialis*; también pequeños roedores como *Oryzomys capito*, *Proechimys semispinosus* y *Metachirus nudicaudatus*., los cuales tienen relevancia en los ciclos de transmisión domestico-rural (Calzada *et al.*, 2015).

Características moleculares del parásito

Las especies de *Leishmania* del Viejo Mundo tienen 36 cromosomas, mientras que las especies del Nuevo Mundo contienen del subgénero *Leishmania* 34 (8-29-36 están fusionados en *L. (L.) mexicana*) y subgénero *Viannia* 35 (20-34 fusionados) cromosomas. (Akhoundi *et al.*, 2017; Dujardin, 2009).

El genoma mitocondrial de los parásitos del género *Leishmania*, al igual que otros tripanosomatidos se encuentra en una estructura conocida como cinetoplasto que es homóloga a la mitocondria de otros eucariotas (Fotouhi-Ardakani *et al.*, 2016). El ADN de cinetoplasto (ADNk) (ver ilustración 10), está organizado en una gran e intrincada red circular de ADN. Esta organizado como discos de 1-2 μm de diámetro, visibles al microscopio óptico. Cuenta con aproximadamente 10000 minicírculos (de 0.5 a 10 kb) y 20-50 maxicírculos (20 a 40 kb de tamaño), lo que representa el 20-25% del ADN total del parásito (Espinosa *et al.*, 2018).

Los maxicírculos poseen información codificante para 18 genes estructurales entre los cuales

están varias de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial como el citocromo b (cytb), las subunidades I, II y III del citocromo c oxidasa (COI, COII, COIII), las subunidades 1, 3, 4, 7, 8 y 9 de la NADH deshidrogenasa (ND1, ND3, ND4, ND7, ND8 y ND9) y la proteína ribosomal S12 (RPS12); además de cuatro marcos de lectura abiertos conocidos como MURF1, MURF2, MURF4 o ATPasa 6 (Camacho *et al.*, 2019).

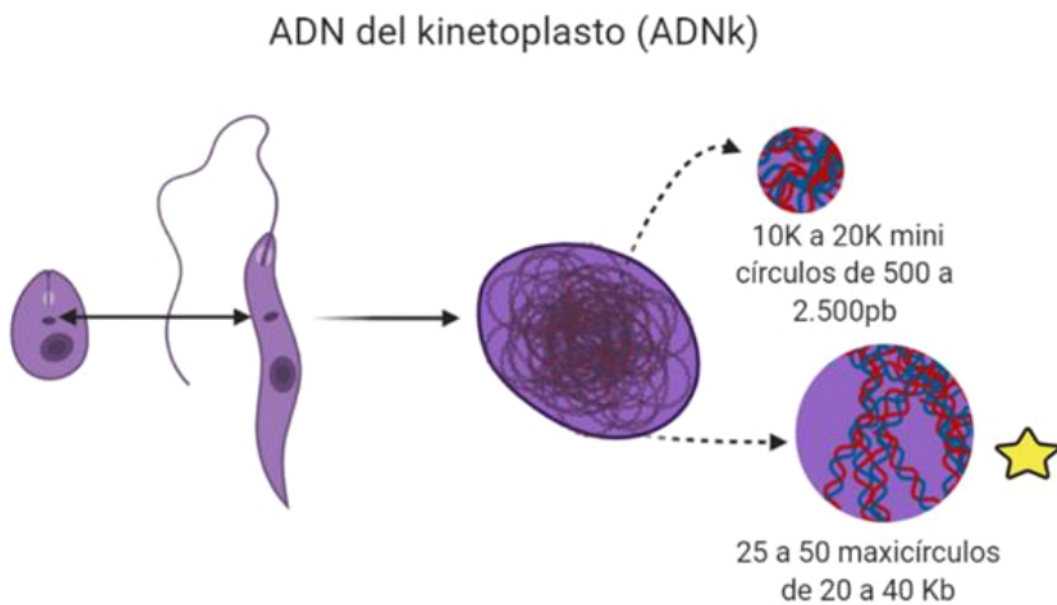


Ilustración 12. Conformación del ADN del cinetoplasto

Taxonomía, subgéneros y complejos de especies

Actualmente, el género *Leishmania* está subdividido en tres subgéneros: *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* y *L. (sauroleishmania)*, siendo este último subgénero parásitos de reptiles. (Espinosa *et al.*, 2018). En el 2016, se propone el establecimiento de un nuevo subgénero *Leishmania (Mundinia)*, para incluir a tripanosomátidos que afectan a animales como caballos, puercoespines y lagartos; además, se propone la creación de nuevas especies, tal como es el caso de *Leishmania “siamensis”* la cual resultó ser sinónima con *Leishmania martiniquensis*, que afecta a caballos y vacas (Espinosa *et al.*, 2018).

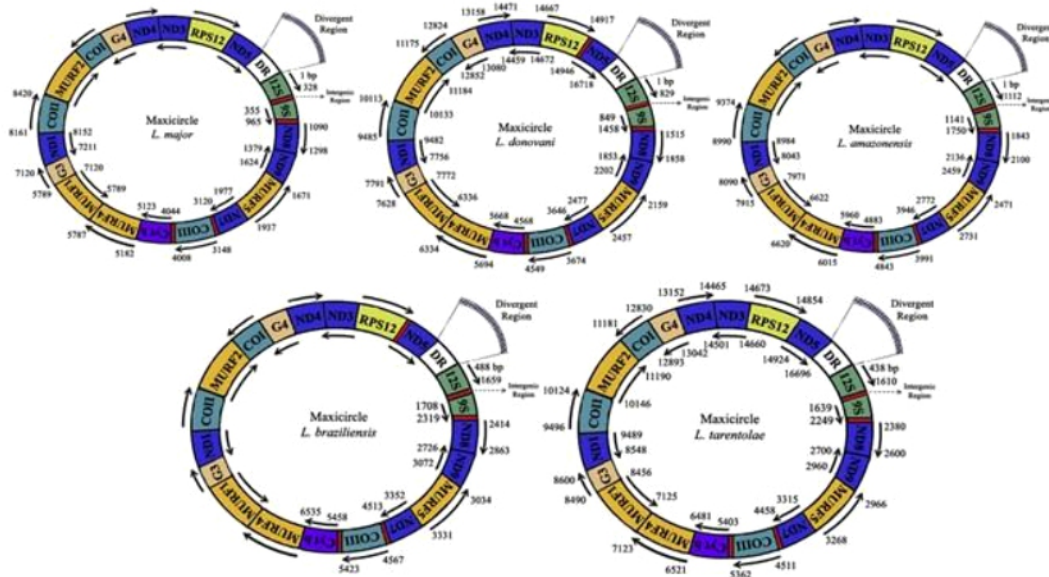


Ilustración 13. El maxicirculo del ADNk y los genes que lo componen y la longitud de los fragmentos en 5 especies de *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. tarentolae*. Fuente:(Akhoundi *et al.*, 2017).

Además de la clasificación de los subgéneros, las especies que ocasionan manifestaciones clínicas (biológicas) similares se agrupan en complejos de especies. En el caso del subgénero

Leishmania, se tienen 5 complejos de especies (ver Ilustración 14) (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) mexicana*). Mientras que el subgénero *Viannia*, se tienen 2 complejos de especies (*L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*)(van der Auwera & Dujardin, 2015). En las Américas, las leishmaniasis del subgénero *Viannia* (*L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis* y *L. (V) guyanensis*) tienen la capacidad de invadir las mucosas naso-orofaríngeas y producir el cuadro de leishmaniasis mucosa, también pueden ocasionar la leishmaniasis cutánea difusa y diseminada (OPS/OMS, 2019).

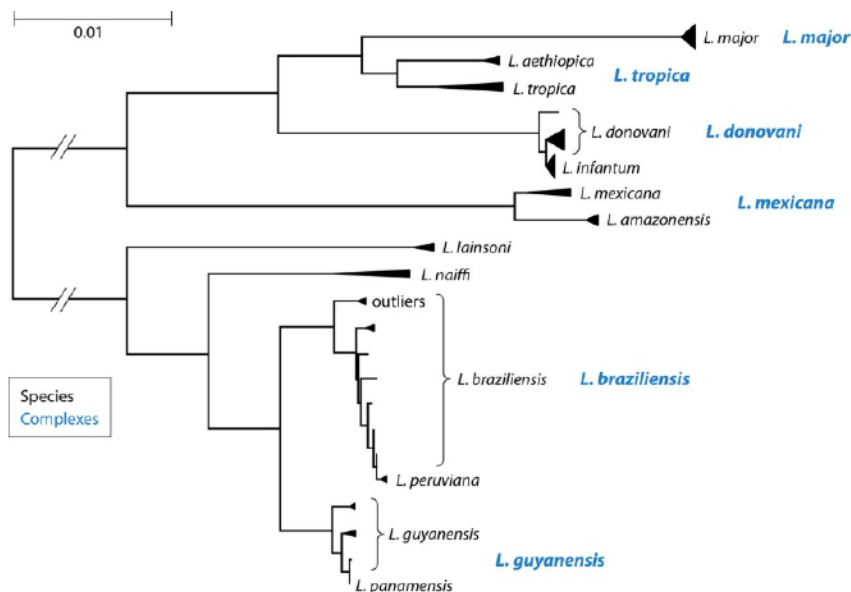


Ilustración 14. Complejos de especies de *Leishmania*. Fuente: (van der Auwera & Dujardin, 2015).

USO DEL CITOCROMO B PARA EL ANÁLISIS GÉNERO *LEISHMANIA*

El secuenciamiento del citocromo b permitió realizar la identificación de especies y encontrar diversidad intraespecífica (haplotipo), siendo *L. (V.) panamensis*, quien presentó la mayor

diversidad genética ($Hd = 0.123$; $S = 80$). En el estudio propone el uso del citocromo b como una herramienta molecular para realizar el barcoding de especies, pues además de tener resultados robustos, permitiendo la identificación de especies también permite identificar diversidad en las poblaciones (Kato *et al.*, 2016). En Ecuador se realizó un estudio para evaluar la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* basado en el cyt b, el cual permitió reportar incluso nuevas especies circulantes (Kato *et al.*, 2016). Este tipo de análisis para conocer la estructura poblacional y su relación geográfica no se ha realizado en Panamá con una cantidad estadísticamente significativa. Tampoco se ha evaluado aislados de reservorios, ni de vectores.

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

CONSIDERACIONES BIOÉTICAS DEL ESTUDIO

Este trabajo de investigación se presentó ante el Comité de Bioética de la Investigación de la Universidad de Panamá, el cual lo declaró exento de revisión en la nota NCBUP/176/2020. (ver anexo 1).

AISLADOS DE *LEISHMANIA* ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Se tomó en consideración la pureza del ADN, mediante la tasa de absorbancia a 260nm y 280nm. Se considero ADN de buena calidad para amplificar, solo aquellas muestras cuya índice (260/280) estuviera entre 1.7-2.0, las muestras por debajo del rango se cultivaron y extrajeron nuevamente. Luego de ser cuantificadas las 100 muestras se procedió a preparar diluciones (soluciones de trabajo), a razón de [10ng/ μ l] por cada 100 μ l.

Caracterización molecular del gen del citocromo B (cytb) en aislados locales de *Leishmania* spp.

Para la amplificación de las secuencias del gen estudiado, en los aislados de *Leishmania* spp., se empleó una estrategia de PCR convencional o también conocida como PCR tiempo final.

Diseño de Cebadores (Primers)

Para el diseño de cebadores *in silico* se empleó la suite bioinformática UGENE v3.7 (Okonechnikov *et al.*, 2012). En la cual se alinearon más de 350 (Tabla 1), secuencias del citocromo B de *Leishmania* utilizando el algoritmo MAFFT, editadas y preditadas disponibles de forma gratuita en el Gen Bank y en TriTrypDB (base de genes especializada en trypanosomátidos). Con ayuda del PRIMER3 de la suite bioinformática de Ugene (Tabla 2), se diseñaron 10 grupos de cebadores. Los cuales se ingresaron en Integrated DNA Technologies (OligoAnalyzer), verificar su contenido de CG, temperatura de alineamiento, descartar la formación de dímeros y/o estructuras secundarias. Se procedió a encargar 3 parejas de cebadores los cuales se evaluaron con muestras de referencia de *Leishmania panamensis* (2306), *L. guyanensis* (W565) y *L. (V.) braziliensis* (W566).

Los cebadores elegidos se alinearon en las regiones (1-21) **cytb-VF** 5'-AAGCGGAGAGAAAAGAAAAGG-3' y (925-948) **cytb-VR** 5'-AATGAATAAGTAAATCATAATAAC-3' ver (Figura 1), las cuales amplifican un producto de PCR de 948pb. Luego de identificar el grupo de cebadores con mejor desempeño, se procedió a amplificar los 100 aislados.

Amplificación por PCR

Las condiciones óptimas para amplificar el fragmento del gen *cytb* seleccionado consistieron en la adición de una unidad de Platinum® Taq DNA Polymerase, High Fidelity, 0.2 μ M de dNTP's, 2.5 mM de MgSO₄, 0.3 μ M de cebadores **cytb -VF** y **cytb-VR**, 2.5 μ l de tampón de alta fidelidad 10X, 50 ng de ADN genómico y agua hasta un volumen final de 25 μ l. El ADN diana se amplificó después de una desnaturalización primaria de 95°C durante 5 minutos después de 35 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos y una extensión final de 68°C durante 10 minutos.

Corrida de gel de agarosa

Luego de cada ciclo de amplificación se procedió a correr en gel de Agarosa a 1.2% con Gel Red® (Biotium), cada muestra para comprobar presencia del ADN amplificado. Empleando escalera molecular de Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder, los amplicones de un tamaño aproximado de 900 pares de bases que presentaban una sola banda (ver Figura 2); sin amplificaciones inespecíficas (smear), se consideraron aptas para el proceso de purificación por columna. Mientras aquellos que no cumplieron con esto se amplificaron nuevamente.

Purificación por columna y dilución

Luego de obtener el producto de PCR deseado, se procedió a purificar por el método de columna con el kit comercial Purelink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), cada uno de los 100 aislados. Posteriormente se cuantificó cada amplificado con ayuda del Nanodrop tomando en cuenta la relación del índice 260nm/280nm (entre 1.7-2.0); las muestras que cumplieron con el índice se ajustaron a una concentración de **ADN [10ng/ μ l]**.

Secuenciación de fragmento de interés del gen *cytb* por el método de Sanger

Reacción de secuenciamiento

Para la preparación de la reacción de secuenciamiento de Sanger se empleó el kit comercial BigDye® Terminator 3.1 (Applied Biosystems). Por cada reacción se emplearon: 2µl de BDT Ready Reaction Premix (2.5x), 1µl de BigDye Sequencing Buffer (5x), 1µl de cebador a una concentración de 3.2pmol/µl, 3µl de DNA [10ng/µl] y 3µl de dH₂O para llegar a un volumen final de reacción de 10µl. Para la reacción de control positivo de amplificación se incorporaron: 2µl de Reaction Premix (2.5x), 1µl de BigDye Sequencing Buffer (5x), 1µl de Cebador - 3.2pmol/µl, 1µl de M13 Plasmid y 5µl de dH₂O hasta obtener un volumen final de reacción 10µl. Una vez cargadas las reacciones en los pozos del plato de secuenciamiento, se procedió a sellar cuidadosamente con filme adhesivo el plato para luego colocarse en el termociclador, configurado para 35X ciclos de amplificación; con las siguientes condiciones de tiempo y temperatura: desnaturalización inicial de 1min a 96°C, desnaturalización por 10seg a 96°C, hibridación de 5seg a 50°C, elongación por 4min a 60°C y 4°C de conservación

Purificación de la reacción de secuenciamiento

Antes de entregar los platos con la reacción de secuenciamiento al Servicio de Secuenciamiento del ICGES, se procedió a purificar con el kit comercial de BigDye XTerminator™ (Applied Biosystems) para eliminar sales y restos de nucleótidos no incorporados.

Análisis de resultados

Los electroferogramas, resultado del Secuenciamiento de Sanger en el equipo ABI 3500XL Sequencer; se visualizaron con el programa Sequencher 4.1.4., para evaluar su calidad antes de exportarse al software UGENE. En el cual, con la herramienta de edición y ensamblaje, se procedió a editar y ensamblar cada una de las 100 las secuencias del estudio, tomando en cuenta un valor de calidad de la secuencia de 25.

Una vez editados electroferogramas, las secuencias obtenidas se alinearon contra cepas de referencia obtenidas desde el GeneBank, utilizando el algoritmo MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform). La longitud del alineamiento múltiple resultante fue de 792bp, con número máximo de refinamientos iterativos de 3 y una penalización por espacio de 1,53.

Análisis filogenético

Para conocer cual modelo de sustitución nucleotídica se ajustaba más al modelo evolutivo de las secuencias analizadas se empleó el software JModelTest 2 (Posada, 2008). Para la reconstrucción filogenética se empleó el programa Mr. Bayes v.3.2. con el cual se realizó una inferencia bayesiana (BI), que posteriormente se visualizó con el programa Figtree v1.4.2., empleando a *Leishmania siamensis* (JX195634.1) grupo externo (outgroup).

Análisis de haplotipos y su distribución geográfica

Los haplotipos se determinaron desde el alineamiento de secuencias editadas realizado en UGENE Alignment Editor. Luego con el software PopART v.1.7 (Population Analysis with Reticulate Trees)(Leigh & Bryant, 2015), se infirió la red de haplotipos (median-joining network), para *Leishmania panamensis*.

Para la georreferenciación se ingresaron las coordenadas de los sitios de procedencia de cada uno de los aislados y se analizaron con el software QGIS versión 3.18.

CAPÍTULO 3: PRINCIPALES HALLAZGOS

EVALUACIÓN DE LAS SECUENCIAS PARCIALES Y COMPLETAS DE CYTB

En el segmento genético de 948bp, encontramos que el (15%) de las secuencias evaluadas consisten en 145 SNP's a lo largo del fragmento, incluyendo 42 singletons y 103 sitios de parsimonia informativa, capaces de discriminar a los miembros del subgénero de *Leishmania Viannia* y el complejo de especies del complejo de *Leishmania mexicana* y distinguir los tres complejos de *Leishmania* del Nuevo Mundo (Tabla 6). Además, esta secuencia de cytb abarcó 35 sitios polimórficos específicos para las especies del subgénero *Viannia*, 15 SNP's que diferencian a *L. mexicana* de *L. amazonensis*, 50 SNPs que ayudan a discriminar a los miembros del complejo *L. mexicana* de los complejos del subgénero *Viannia*, y 24 singlestones que se encuentran tanto en *L. infantum* como en *L. donovani*.

La tabla 3 muestra las estimaciones de divergencia evolutiva entre grupos de secuencias que consisten en la versión preeditada de las secuencias de cytb de 9 grupos de especies de *Leishmania*. Se encontró una baja tasa de divergencia en las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, ya que la distancia genética total entre grupos de ellas fue de 0.01.

Sin embargo, encontramos suficientes SNPs a lo largo de las secuencias cytb de 948bp para discriminar las especies de este subgénero excepto para *L. peruviana* y *L. (V.) braziliensis* que tenían gran similitud en la secuencia de nucleótidos.

Por otro lado, encontramos una gran distancia genética que va de 0,11 a 0,13 entre las secuencias de cytb del subgénero *Viannia* y las secuencias pertenecientes al complejo *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* y *L. tarentolae*. Este hallazgo demuestra que el segmento del gen cytb seleccionado para este estudio resulta útil para distinguir las especies pertenecientes a los diferentes complejos de especies de *Leishmania* del nuevo mundo.

INFERENCIA FILOGENÉTICA

Se determinó que el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica que más se ajusta a las secuencias de *cytb* es HKY (G + I) Hasegawa-Kishino-Yano. La inferencia bayesiana (BI), realizada a partir del alineamiento de las secuencias de la región del gen *cytb* analizadas, permitió separar y agrupar en clúster bien definidos, las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* y los complejos de especies *L. mexicana* y *L. donovani* pertenecientes al subgénero *Leishmania*. (Figura 3). Todas las muestras analizadas corresponden al subgénero *Viannia*. El 92% de las secuencias se agruparon con las secuencias de referencia de *L. (V.) panamensis*, ramificándose en dos grandes grupos que incluyen tres haplotipos (designados como A, B, C). El 8% restante de los aislados se identificaron como *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*/*L. (V.) peruviana* y *L. (V.) naiffi*, según el análisis filogenético (Figura 3). En cuanto a los aislamientos locales de *L. (V.) guyanensis*, uno de ellos se agrupó con el grupo de referencia de *L. (V.) guyanensis* y el resto de los aislamientos se agruparon en un subclado. La presencia de dos subclados diferentes de *L. (V.) guyanensis* tras el análisis filogenético, revela la circulación de al menos dos haplotipos diferentes de esta especie de *Leishmania* en Panamá. Los aislados locales de *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) naiffi* se agruparon con sus respectivos grupos de referencia conformados por las secuencias del gen *cytb* obtenidas del GenBank.

ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Se hallaron tres haplotipos *cytb* de *L. (V.) panamensis* circulando en las áreas estudiadas que se asignaron como haplotipo A, haplotipo B y haplotipo C como se muestra en la (Figura 5). Sólo dos mutaciones puntuales no sinónimas en las posiciones 357 y 669 de la secuencia completa del gen *cytb* de *L. (V.) panamensis* distinguieron estos haplotipos. Una de ellas en la posición 357 (C↔T) de transición, donde los haplotipos B y C mostraron la base nitrogenada citosina y el haplotipo A timina en su lugar. Además, en la posición 669 de la secuencia *cytb* encontramos una transición (A↔G). En esta posición nucleotídica, los haplotipos A y B mostraron la base guanina y el haplotipo C adenina en su lugar. Por lo tanto, dos mutaciones puntuales distinguen el haplotipo A del C y sólo una mutación puntual diferencia el haplotipo A del B y el haplotipo B del C. El número de haplotipos de *L. (V.) panamensis* encontrados por provincia se muestra en la tabla 5. Todos los aislamientos de *L. (V.) panamensis* (n=92) se utilizaron para identificar los haplotipos de las provincias situadas al oeste y al este del Canal de Panamá. Se encontraron tres haplotipos de *L. (V.) panamensis* en las regiones estudiadas (Figura 5). El haplotipo más frecuente (A) se encontró en 67 de las 92 secuencias de *L. (V.) panamensis cytb* y se presentó en casi todas las provincias evaluadas, excepto en Darién donde sólo se identificó el haplotipo B. Por el contrario, los haplotipos B y C parecen circular con menor frecuencia, ya que sólo se detectaron 25 y 2 secuencias de *cytb* de ambos haplotipos, respectivamente, se detectaron en este estudio. El haplotipo B se encontró en todas las provincias, excepto en Colón, y el haplotipo C sólo se observó en la provincia de Bocas del Toro. Sin embargo, debido a que se evaluó un bajo

número de aislados de Bocas del Toro (9) y Darién (7), no se descarta la circulación de otros haplotipos con frecuencias diferentes en las áreas evaluadas en este estudio.

En este estudio se encontraron dos haplotipos de *L. (V.) guyanensis* circulando en la provincia de Coclé y Panamá Oeste. Estos haplotipos mostraron una mayor diversidad que los haplotipos encontrados de *L. (V.) panamensis*, debido a que estos 2 presentaron 6 sitios polimórficos en la posición 119 (T↔C), 241 (G↔T), 313 (A↔T), 619 (G↔A), 686 (A↔G) y 860 (C↔T). Sólo un SNP en la posición 686 era no sinónimo y causaba la sustitución de aminoácidos de isoleucina a valina en la proteína cytb. Dado que sólo se detectaron cinco aislamientos de *L. (V.) guyanensis* en este estudio, no descartamos la probabilidad de que existan más haplotipos de *L. (V.) guyanensis* circulando otras zonas endémicas fuera de la región occidental entre Coclé y Panamá Oeste.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El gen que codifica para el citocromo B (cytb); está contenido en el genoma mitocondrial de muchas formas de vida (animales, plantas y protozoarios), es una subunidad catalítica central de una enzima presente en la cadena transporte de electrones (Asato *et al.*, 2009; Fotouhi-Ardakani *et al.*, 2016; Luyo-Acero *et al.*, 2004). Ha sido utilizado para el análisis filogenético en los miembros de la Clase Kinetoplastea (D'ávila-Levy *et al.*, 2015). Presentando una buena capacidad resolutive para la tipificación molecular de *Leishmania* spp., en aislados procedentes de múltiples regiones en el viejo y nuevo mundo (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013). Ofreciendo una buena sensibilidad para su uso con muestras clínicas y ambientales, al mismo tiempo su análisis resulta ser relativamente fácil (Van der Auwera & Dujardina, 2015).

La validación del análisis del fragmento de 948bp propuesto, en un mayor número de aislados, procedentes de diferentes regiones geográficas, incluyendo parásitos aislados de reservorios y vectores; aumentaría su confiabilidad.

Conforme se realizan más estudios de secuenciamiento, de marcadores moleculares específicos, así como también de genomas completos, las secuencias obtenidas se van depositando en las bases de datos públicas, lo que sin duda constituye una valiosa herramienta para poder comparar las secuencias procedentes de diversas latitudes (Asato *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2019; Luyo-Acero *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013).

El gen cytb, se empleó exitosamente en primera instancia para discriminar entre las especies de *Leishmania* del nuevo mundo y las especies del viejo mundo, aportando información valiosa para comprender su estructura poblacional (Yang *et al.*, 2013).

Después de la evaluación del fragmento de 948bp de *cytb*, en 360 secuencias completas y parciales de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo pertenecientes a diferentes complejos de especies, determinamos que el fragmento propuesto posee 145 SNP's principales; los cuales en conjunto son responsables de la divergencia genética observada entre las especies de *Leishmania Viannia* y las especies de los complejos *L. mexicana* y *L. donovani*, especialmente considerando que no se observaron diferencias de tamaño entre las secuencias completas de *cytb* de estas especies.

En 2004, Luyo-Acero y colaboradores realizan el primer informe sobre la variación del gen *cytb* (completo 1080bp) en *Leishmania*, luego de evaluar 15 cepas (las más frecuentemente implicadas en la Leishmaniasis humana en el nuevo y viejo mundo). Ellos encontraron 245 sitios polimórficos en un fragmento de 1080bp aproximadamente. Además de una concordancia del 90% con la clasificación de complejos de especies propuestos por Lainson y Shaw en 1987 (Luyo-Acero *et al.*, 2004). En un estudio adicional de estos autores, se evaluaron 30 cepas adicionales; lograron agrupar en 5 Clados a las especies causantes de Leishmaniasis humana y en 2 Clados aparte a especies no patógenas al humano. Destacando la utilidad del gen *cytb* para el análisis filogenético (Asato *et al.*, 2009).

Nuestros resultados sugieren que el segmento de 948 pb contiene el 60% de los sitios polimórficos descritos en el primer informe sobre el gen *cytb*, lo que representa suficiente divergencia en secuencias para discriminar las especies de los complejos de *Leishmania* del Nuevo Mundo.

Además, su utilidad está respaldada por la disponibilidad de un conjunto más amplio de secuencias de *Leishmania* y la presencia de una cantidad considerable de SNP's con

suficiente señal filogenética para discriminar las especies de *Leishmania*, al igual que ha sido informado en otros lugares utilizando secuencias completas del gen *cytb* (Asato *et al.*, 2009). En la figura 3 (ver Fig.3), se observan como los singletons y los sitios de parsimonia informativa, contenidos a lo largo del segmento *cytb* de 948bp evaluado, permitió agrupar a las especies del subgénero *Viannia*; al tiempo que separó a las especies de los complejos *L. donovani* y *L. mexicana*. No obstante, nuestra estrategia no separó a *L. donovani* de *L. infantum*, ni a *L. (V.) braziliensis* de *L. peruviana*. Concordando con los hallazgos descritos por Luyo y colaboradores, quienes emplearon la secuencia completa (1080bp) del gen *cytb* para el análisis filogenético (Luyo-Acero *et al.*, 2004). El estatus de especie de *L. peruviana* dentro del complejo *L. (V.) braziliensis* es un tema de discusión (Van der Auwera & Dujardina, 2015). Sin embargo, un análisis genómico comparativo de ambas especies encontró diferencias interespecíficas de SNP/Indel y variaciones en el número de copias de los cromosomas, lo que apoya la idea de que son especies estrechamente relacionadas pero distintas (Valdivia *et al.*, 2015). Al igual que los enfoques basados en el gen HSP70 (A. M. Montalvo *et al.*, 2012) o la Tipificación multilocus (Tsukayama *et al.*, 2009) son capaces de diferenciar ambas especies, utilizar alguna de herramientas antes mencionadas con el *cytb*, será útil para confirmar la circulación de estas especies e identificar otras. Los métodos basados en la PCR y la secuenciación de genes HSP70, mini exón e ITS, son una alternativa que permiten poder diferenciar los complejos de *L. donovani* (Auwera *et al.*, 2014); lo que se podría combinar con el análisis del gen *cytb*, como herramienta complementaria en lugares donde la leishmaniasis tegumentaria y visceral se solapan. No obstante, en ocasiones es necesario contar con marcadores adicionales que posean un mejor poder discriminatorio para

aclarar cualquier discordancia nuclear-mitocondrial, un hecho que ya se ha suscitado antes en la tipificación de *Leishmania* (Kato *et al.*, 2019). Cabe mencionar que nuestro enfoque de PCR fue diseñado para realizar la tipificación de *Leishmania* a partir de una cantidad conocida de ADN genómico y no conocemos la sensibilidad de esta metodología en muestras clínicas debido a que el gen *cytb* está en el maxicírculo del cinetoplasto y solo cuenta con 20-50 copias (Espinosa *et al.*, 2018).

Leishmania panamensis fue la especie predominantemente aislada en todas las regiones geográficas estudiadas en Panamá (Figura 4). Estudios realizados en Panamá apoyan la amplia distribución y prevalencia de casos humanos de LC causados principalmente por *L. (V.) panamensis* (Howard A. Christensen *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2009a, 2021). Al tiempo que, esta especie de parásito se ha encontrado infectando naturalmente a todos los vectores antropófilos (Christensen *et al.*, 1983). A su vez es considerada, responsable de las altas tasas de infección encontradas en el perezoso didáctilo de Hoffmann (*Choloepus hoffmanni*) (González *et al.*, 2012; A. Herrero & Christensen, 1976); siendo este un importante reservorio silvestre, con amplia distribución en zonas endémicas de Leishmaniasis en Panamá.

El resto de los aislamientos de este estudio pertenecen a *L. (V.) guyanensis* (5), *L. (V.) braziliensis* (2) y *L. (V.) naiffi* (1). Estas especies han sido recientemente reportando circulando con baja frecuencia en el país (Miranda *et al.*, 2021; Sosa *et al.*, 2019). El hecho de que circulen otras especies de este parásito tiene importantes implicaciones epidemiológicas. La presencia de diferentes especies en zonas con alta transmisibilidad podría favorecer la hibridación de especies, lo cual impacta el manejo clínico de los

pacientes, pues favorece la aparición de formas clínicas atípicas. En Ecuador por ejemplo un estudio reportó por primera vez que *Leishmania (V.) panamensis* estaba circulando en ese país y era la especie responsable de formas atípicas de la enfermedad (erisipeloide, recidiva cutis y la leishmaniasis diseminada) en niños de 3 zonas geográficas (costa del Pacífico, andina y amazónica) analizadas (Calvopina *et al.*, 2005).

En Panamá, es necesario que más iniciativas estén encaminadas a vigilar y determinar la distribución geográfica de las especies; para comprender así la dinámica de transmisión y la frecuencia de circulación de nuevas especies y/o posibles variantes genéticas de interés. Esta información desde el punto de vista clínico es muy valiosa; debido a que la prognosis de esta enfermedad y el éxito de su tratamiento depende en gran medida de la especie o variante de especie infectante y del estado inmunológico del paciente. En este contexto, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* se han asociado a la Leishmaniasis cutánea localizada, Leishmaniasis cutánea diseminada y lesiones en las mucosas (Goto & Lauletta Lindoso, 2012). En el caso de *L. (V.) naiffi* no se ha observado ninguna asociación entre esta especie y la Leishmaniasis mucosa. Sin embargo, ocasiona lesiones cutáneas únicas, pequeñas y localizadas en las manos, los brazos o las piernas (Naiff *et al.*, 1991). Por otro lado, se han aislado cepas *L. (V.) braziliensis* de a partir de lesiones atípicas, las cuales han mostrado ser drogo resistentes (Rugani *et al.*, 2019). Algo muy similar ocurre con las variantes mutantes de *L. (V.) guyanensis* resistentes a los antimoniales pentavalentes (Borges *et al.*, 2018), la opción de tratamiento de primera línea para el tratamiento de la LC en Panamá. Curiosamente, ya se ha observado una mala respuesta al tratamiento con antimoniales o pentamidina en pacientes infectados por *L. (V.) naiffi* (Fagundes-Silva *et al.*, 2015).

Consecuentemente, la circulación simpátrica de diferentes especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* en nuestro país, deberá estudiarse de forma exhaustiva, ya que podría brindar información importante en cuanto a la patogénesis y el manejo del paciente.

Se encontraron tres haplotipos de *L. (V.) panamensis* circulando en las áreas de estudio (Figura 5). En el 2016, Ramírez y colaboradores realizaron un estudio utilizando la secuencia parcial del *cytb* para realizar barcoding (codificación). En el cual se analizaron 201 secuencias de *L. (V.) panamensis cytb*; mostrando una gran variabilidad apoyada por la existencia de 80 SNP's en el fragmento de *cytb* analizado (Ramírez *et al.*, 2016).

En el caso del fragmento de 948bp evaluado en este estudio, sólo se identificaron 3 SNP's a lo largo de la secuencia de *L. (V.) panamensis cytb* siendo estas responsables de la asignación de haplotipos. Esto podría reflejar una baja diversidad genética de *L. (V.) panamensis* debido a la expansión y adecuación de pocas variantes, tanto en vectores antropófilos como en humanos. Concordando con un estudio piloto realizado en Marruecos utilizando ITS1 como marcador sugiere que la sobrerrepresentación de un haplotipo sobre el resto en un foco endémico podría ser el resultado de esta aptitud (El Hamouchi *et al.*, 2019).

Los resultados siguieron diferencias en la abundancia y la frecuencia de los haplotipos de *L. (V.) panamensis* en los lugares estudiados. El haplotipo A predominó en los sitios estudiados ya que se encontró en casi todas las provincias evaluadas, excepto en Darién. Por el contrario, el haplotipo B mostró una alta frecuencia en las provincias de Bocas del Toro y Darién, y sólo se encontraron dos secuencias de *cytb* pertenecientes al haplotipo C en Bocas del Toro. Según parece, existe una asociación entre la diversidad genética y el origen geográfico de *L. (V.) panamensis*. De modo que el haplotipo A podría estar implicado en la mayoría de los

ciclos de transmisión de la Leishmaniasis en Panamá, junto con las especies locales antropofílicas de *Lutzomyia* y el reservorio natural *Choleopus hoffmani*. Mientras que los haplotipos B y C podrían estar asociados a ciclos sinantrópicos de transmisión, en zonas selváticas, donde los asentamientos humanos en zonas rodeadas de selva tropical crean la interfaz hombre-bosque.

Para confirmar este hallazgo, se necesitan más estudios que consideren todos los componentes de los ciclos de transmisión en los que *L. (V.) panamensis* está presente. Existe la posibilidad que debido al bajo número de aislados evaluados en algunas provincias, esto provocara un sesgo en la muestra, que lo nos impida sugerir el predominio global del haplotipo A o incluso descartar la circulación de otros haplotipos.

En cuanto al ciclo de transmisión de *L. (V.) guyanensis* se ha asociado principalmente a la presencia de seres humanos en las regiones forestales. En este entorno selvático, animales como los perezosos, los osos hormigueros, los marsupiales y los roedores son los responsables de mantener las poblaciones de parásitos (Lainson *et al.*, 1981; Roque & Jansen, 2014). Se encontraron dos haplotipos de *L. (V.) guyanensis* circulando en comunidades ubicadas a través de la cordillera central de Panamá específicamente en Coclé y las regiones montañosas de Panamá Oeste. Estas regiones se consideran ambientes húmedos/lluviosos con una alta proporción de cobertura forestal y donde la LC muestra una alta incidencia (Yamada *et al.*, 2016). En estas regiones, al igual que en otras regiones endémicas del país se ha conservado una parte del ambiente forestal original, con abundancia de vectores antropofílicos y la presencia de varios reservorios de *Leishmania* (Christensen *et al.*, 1983; Rigg *et al.*, 2019), con una alta tasa de con una alta tasa de infección humana. Por lo tanto,

es factible que en este escenario eco epidemiológico se haya establecido un ciclo zoonótico en el que diferentes linajes de *L. (V.) guyanensis*. En este contexto, nuestros resultados sugieren la circulación de dos variantes de *L. (V.) guyanensis* que de alguna manera podrían estar asociadas a ciclos de transmisión de LC en las provincias de Coclé y Panamá Oeste.

Esta especie de *Leishmania* presenta una gran plasticidad genética debido a un alto nivel de recombinación sexual en los vectores, complementada con una expansión Clonal en los hospederos naturales que son los principales responsables de su difusión en las regiones endémicas (Rougeron *et al.*, 2017). Así, los ciclos silvestres actualmente establecidos en Coclé y Panamá Oeste combinados con una alta abundancia y diversidad de vectores y reservorios del parásito, reúnen todas las características necesarias para la emergencia y diseminación de diferentes genotipos de *L. (V.) guyanensis*. Sin embargo, se requieren datos entomológicos y zoológicos para apoyar esta hipótesis.

Mediante el fingerprinting de la huella ribosómica, Rotureau y colaboradores observaron dos linajes diferentes no simpátricos de *L. (V.) guyanensis* en la Guayana Francesa asociados a regiones caracterizadas por de selva primaria densa con sitios de excavación de oro (Rotureau *et al.*, 2006). En nuestro país la explotación minera de cobre realizada a cielo abierto en las provincias de Coclé y Colón han provocado importantes cambios ambientales, como el aumento de los asentamientos humanos y la exposición de los seres humanos a la radiación solar. Los ciclos zoonóticos ya establecidos de los parásitos de la *Leishmania*. Por lo tanto, las infecciones humanas con diferentes genotipos de *L. (V.) guyanensis* que ya circulan en estas zonas son plausibles y podrían convertirse en un problema de salud pública en estas regiones de Panamá.

Se cree que los antecedentes genéticos de las especies de *Leishmania* son uno de los principales factores que influyen en los resultados clínicos de la leishmaniasis. Por lo tanto, es importante asociar los efectos clínicos existentes con las variantes genéticas de *Leishmania* spp. que circulan en diferentes escenarios epidemiológicos utilizando marcadores moleculares adecuados. Existen datos limitados sobre la variación genética de *Leishmania* spp. basados en la secuenciación del gen *cytb*. Un estudio realizado en el sur de Irán reveló que las lesiones cutáneas típicas y lesiones cutáneas típicas y atípicas eran causadas por diferentes variantes de *Leishmania major* (Mohammadpour *et al.*, 2019).

Los enfoques basados en la secuenciación del gen *cytb* se han utilizado principalmente para identificar las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo sin hacer una asociación con los resultados clínicos.

Dado que el objetivo principal del estudio era evaluar el potencial de la secuencia del gen *cytb*, para discriminar las especies y variantes de *Leishmania*, no se intentó establecer una relación entre las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes panameños y los haplotipos encontrados aquí. Sin embargo, no descartamos que esta asociación pueda existir, ya que un enfoque basado en el gen HSP70 encontró una fuerte correlación entre la variante genética de *L. (V.) braziliensis* y diferentes manifestaciones clínicas.

En conjunto, nuestros resultados destacan la presencia de diferentes especies de *Leishmania Viannia* y variantes genéticas de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* que circulan en el país. La exuberancia de características Clínicas observadas en el país podría ser el resultado de infecciones con estas especies o sus variantes. Para evaluar las posibles. Para evaluar las posibles asociaciones entre las variantes genéticas y la expresión Clínica de la enfermedad,

es necesario utilizar marcadores moleculares adecuados. Las variaciones de secuencia del gen *cytb* ya se han relacionado con diferentes resultados clínicos de la LC. Por lo tanto, un enfoque similar al presentado en este artículo basado en el gen *cytb* que muestra suficientes SNP's para identificar las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y sus variantes una buena opción para la identificación de especies de *Leishmania* en los países latinoamericanos afectados por la Leishmaniasis.

CONCLUSIONES

- El fragmento del cytb evaluado demostró suficientes polimorfismos para discriminar entre de las especies subgénero *Viannia* y detectar sub-variantes en poblaciones de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*.
- Se corrobora que *L. (V.) panamensis* es el principal agente causal de leishmaniasis tegumentaria en Panamá. Además, se determinó que dentro de estructura poblacional de *L. (V.) panamensis* se distinguen 3 haplotipos (A, B y C) los cuales presentan diferencias en su frecuencia y distribución respectivamente.
- El haplotipo A, se predominó en la mayoría de las provincias evaluadas, excepto en Darién. Mientras que el haplotipo B mostró una alta frecuencia en las provincias de Bocas del Toro y Darién. Por otro lado, del haplotipo C sólo se encontraron dos secuencias de cytb en la provincia de Bocas del Toro.
- Se encontraron otras especies del subgénero en baja frecuencia: *L. (V.) guyanensis* (5), *L. (V.) braziliensis* (2) y *L. (V.) naiffi* (1).
- Para *L. (V.) guyanensis* se identificaron 2 haplotipos circulando en comunidades ubicadas a través de la cordillera central de Panamá específicamente en Coclé y las regiones montañosas de Panamá Oeste.

RECOMENDACIONES

Recomendamos el uso de la estrategia molecular de PCR del fragmento de 948bp del gen citocromo b acoplada al secuenciamiento, para la determinación de especies dentro del subgénero *Viannia*, debido a que abarca una región con suficientes polimorfismos SNP's y es capaz discriminar entre especies al tiempo que provee información útil para inferir variabilidad intraespecífica, en aislados procedente una misma región geográfica.

Un estudio con un mayor número de aislados de otras regiones del país aportaría información relevante para comprender como se ve influenciada a la variabilidad genética del parásito por los cambios espacio temporales y la alteración de los ciclos de transmisión, debido a la acción antropogénica y el cambio climático. Y como esta variabilidad genética estaría relacionada con la incidencia de la leishmaniasis tegumentaria de Panamá.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
2. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1-40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
3. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
4. Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6(May), 1-15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
5. Armúa-fernández, M. T. (2019). Leishmaniosis: breve puesta al día. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 29-36. <https://doi.org/10.29155/vet.55.211.5>
6. Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y. ichi, Kato, H., Marco, J. D., Mimori, T., Gomez, E. A. L., Hashiguchi, Y., & Uezato, H. (2009). Phylogenic analysis of the genus Leishmania by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology*, 121(4), 352-361. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.013>
7. Auwera, G. Van Der, Ravel, C., Verweij, J. J., Bart, A., Schoñian, G., & Felger, I. (2014). Evaluation of four single-locus markers for leishmania species discrimination by

- sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1098-1104.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13>
8. Borges, A. F., Gomes, R. S., & Ribeiro-Dias, F. (2018). Leishmania (Viannia) guyanensis in tegumentary leishmaniasis. *Pathogens and Disease*, 76(4).
<https://doi.org/10.1093/femspd/fty025>
 9. Calvopina, M., Gomez, E. A., Uezato, H., Kato, H., Nonaka, S., & Hashiguchi, Y. (2005). Atypical clinical variants in new world cutaneous leishmaniasis: Disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to Leishmania (V.) panamensis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 281-284.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.281>
 10. Calzada, J. E., Saldaña, A., González, K., Rigg, C., Pineda, V., Santamaría, A. M., Rodríguez, I., Gottdenker, N. L., Laurenti, M. D., & Chaves, L. F. (2015). Cutaneous Leishmaniasis in dogs: Is high seroprevalence indicative of a reservoir role? *Parasitology*, 142(9), 1202-1214. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000475>
 11. Chaves, L. F., Calzada, J. E., Valderrama, A., & Saldaña, A. (2014). Cutaneous Leishmaniasis and Sand Fly Fluctuations Are Associated with El Niño in Panamá. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003210>
 12. Christensen, H. A., Herrer, A., & Telford, S. R. (1972). Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern panama: II: Entomological investigations. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 66(1), 55-66. <https://doi.org/10.1080/00034983.1972.11686797>
 13. Christensen, H., Fairchild, G., Herrer, A., Johnson, C. M., Young, D., & de Vásquez, A. M. (1983). The ecology of cutaneous leishmaniasis in the republic of Panama. *Journal of*

- Medical Entomology*, 20(5), 463-484. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.463>
14. Christensen, H., Johnson, C., & de Vázquez, A. M. (1984). Leishmaniasis Cutanea en Panama. *Revista Médica de Panamá*, 9, 182-187.
 15. Christensen, Howard A., De Vasquez, A. M., & Petersen, J. L. (1999). Short report: Epidemiologic studies on cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(1), 54-57. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.54>
 16. Christensen, Howard A., Fairchild, G. B., Herrer, A., Johnson, C. M., Young, D. G., & de Vázquez, A. M. (1983). The ecology of cutaneous leishmaniasis in the republic of Panama. *Journal of Medical Entomology*, 20(5), 463-484. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.463>
 17. D'avila-Levy, C. M., Boucinha, C., Kostygov, A., Santos, H. L. C., Morelli, K. A., Grybchuk-Ieremenko, A., Duval, L., Votýpka, J., Yurchenko, V., Grellier, P., & Lukeš, J. (2015). Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(8), 956-965. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150253>
 18. Darling, S. T. (1910). Autochthonous oriental sore in panama. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 4(2), 60-63. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(10\)90145-4](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(10)90145-4)
 19. El Hamouchi, A., Ajaoud, M., Arroub, H., Charrel, R., & Lemrani, M. (2019). Genetic diversity of *Leishmania tropica* in Morocco: does the dominance of one haplotype signify its fitness in both predominantly anthropophilic *Phlebotomus sergenti* and human beings?

- Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 373-380.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13031>
20. Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4), 430-442.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
21. Fagundes-Silva, G. A., Sierra Romero, G. A., Cupolillo, E., Gadelha Yamashita, E. P., Gomes-Silva, A., De Oliveira Guerra, J. A., Da-Cruz, A. M., Romero, G. A. S., Cupolillo, E., Yamashita, E. P. G., Gomes-Silva, A., Guerra, J. A. D. O., Da-Cruz, A. M., Sierra Romero, G. A., Cupolillo, E., Gadelha Yamashita, E. P., Gomes-Silva, A., De Oliveira Guerra, J. A., Da-Cruz, A. M., ... Da-Cruz, A. M. (2015). *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*: Rare enough to be neglected? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(6), 797-800.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760150128>
22. Filho D, V., FA, J., MV, L., & Filho D, Vedobello;FA, Jorge; MV, Lonardoni; U, T. (2010). Leishmaniasis (Cutánea y Visceral). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, II(10), 1-13.
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf%0A%0A%0A%0A%0A%0A>
23. Fotouhi-Ardakani, R., Dabiri, S., Ajdari, S., Alimohammadian, M. H., AlaeNovin, E., Taleshi, N., & Parvizi, P. (2016). Assessment of nuclear and mitochondrial genes in precise identification and analysis of genetic polymorphisms for the evaluation of *Leishmania* parasites. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 33-41.

- <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.011>
24. Freites, C. O., Gundacker, N. D., Pascale, J. M., Saldaña, A., Diaz-Suarez, R., Jimenez, G., Sosa, N., García, E., Jimenez, A., & Suarez, J. A. (2018). First case of diffuse leishmaniasis associated with leishmania panamensis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(11), 1-3. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy281>
 25. González, K., Calzada, J. E., Saldaña, A., Rigg, C. A., Alvarado, G., Rodríguez-Herrera, B., Kitron, U. D., Adler, G. H., Gottdenker, N. L., Chaves, L. F., & Baldi, M. (2012). Survey of wild mammal hosts of cutaneous leishmaniasis parasites in Panamá and Costa Rica. *Tropical Medicine and Health*, 43(1), 75-78. <https://doi.org/10.2149/tmh.2014-30>
 26. Goto, H., & Lauletta Lindoso, J. A. (2012). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 293-307. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>
 27. Herrer, A., & Christensen, H. A. (1976). Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25(1), 54-58. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1976.25.54>
 28. Herrer, A., Christensen, H. A., & Beumer, R. J. (1973). Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22(5), 585-591. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1973.22.585>
 29. Herrer, Aristides, & Telford, S. R. (1966). Leishmania braziliensis Isolated from Sloths in Panama. *Science*, 164, 1419-1420.
 30. Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., & Wasserman, H. (2018). La leishmaniosis cutánea en Costa Rica: prevención,

- diagnóstico y tratamiento. *Acta Médica Costarricense*, 60(3), 103-114.
31. Kato, H., Gomez, E. A., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Mimori, T., Uezato, H., & Hashiguchi, Y. (2016). Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844>
 32. Kato, H., Gomez, E. A., Seki, C., Furumoto, H., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Calvopiña, M., Velez, L., Kubo, M., Tabbabi, A., Yamamoto, D. S., & Hashiguchi, Y. (2019). 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 Neglected Tropical Diseases*, 13(5), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007403>
 33. Lainson, R., Shaw, J. J., Ready, P. D., Miles, M. A., & Pova, M. (1981). Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of Leishmania species from sandflies, wild mammals and man in North Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), 530-536. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90192-9)
 34. Luyo-Acero, G. E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., Gomez-Landires, E., Hashiguchi, Y., & Nonaka, S. (2004). Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus Leishmania and their phylogeny. *Parasitology*, 128(5), 483-491. <https://doi.org/10.1017/S0031182004004792>

35. Mcgwire, B. S., & Satoskar, A. (2014). Leishmaniasis : clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, 107(June), 7-14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
36. Miranda, A., Carrasco, R., Paz, H., Pascale, J. M., Samudio, F., Saldaña, A., Santamaría, G., Mendoza, Y., & Calzada, J. E. (2009a). Molecular epidemiology of American tegumentary Leishmaniasis in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 565-571. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0265>
37. Miranda, A., Carrasco, R., Paz, H., Pascale, J. M., Samudio, F., Saldaña, A., Santamaría, G., Mendoza, Y., & Calzada, J. E. (2009b). Molecular epidemiology of American tegumentary Leishmaniasis in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 565-571. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0265>
38. Miranda, A., González, K., Samudio, F., Pineda, V., Calzada, J., Capitan-Barrios, Z., Jiménez, A., Castillo, J., Mendoza, Y., Suárez, J., Ortiz, B., Méndez, J., Pascale, J., Grögl, M., Sosa, N., & Saldaña, A. (2021). Molecular Identification of Parasites Causing Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(4), 1326-1334. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1336>
39. Miranda, A., Samudio, F., González, K., Saldaña, A., Brandão, A., & Calzada, J. E. (2016). Calmodulin polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for leishmania identification and typing. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 383-387. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0709>
40. Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J. C., & Van Der Auwera, G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania

- species identification. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(7), 1453-1461. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
41. Moreira, O. C., Yadon, Z. E., & Cupolillo, E. (2018). The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Tropica*, 184, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020>
42. Naiff, R. D., Freitas, R. A., Naiff, M. F., Arias, J. R., Barrett, T. V., Momen, H., & Grimaldi Júnior, G. (1991). Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(3), 317-321. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000300006>
43. OPS/OMS. (2017). Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas 2017-2022. En <Http://Www2.Paho.Org>. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34147>
44. OPS/OMS, O. P. de la S. (2019). *Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis*. www.paho.org
45. OPS/OMS, O. P. de la S. (2020). Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. En *Informe Leishmaniasis* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1086/428736>
46. OPS, OMS, MINSA, ICGES, & CSS. (2016a). «*Guía Para El Abordaje Integral De La Leishmaniasis En Panamá, 2015*» (Número 28150).
47. OPS, OMS, MINSA, ICGES, & CSS. (2016b). «*Guía Para El Abordaje Integral De La Leishmaniasis En Panamá, 2015*» (Número 28150).
48. Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., & González, C.

- (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 6(June), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep28266>
49. Rigg, C. A., Calzada, J. E., Saldaña, A., Perea, M., Chaves, L. F., & Valderrama, A. (2019a). Leishmania spp. infection rate and feeding patterns of sand flies (diptera: Psychodidae) from a hyperendemic cutaneous leishmaniasis community in Panamá. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(4), 798-807. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0628>
50. Rigg, C. A., Calzada, J. E., Saldaña, A., Perea, M., Chaves, L. F., & Valderrama, A. (2019b). Leishmania spp. infection rate and feeding patterns of sand flies (diptera: Psychodidae) from a hyperendemic cutaneous leishmaniasis community in Panamá. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(4), 798-807. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0628>
51. Ríos Yuil, J. M., Sousa, O., Yuil, J. M. R., Sousa, O., Ríos Yuil, J. M., & Sousa, O. (2010). Inmunología en la infección por Leishmania. Conceptos actuales. *Rev. med. cient.*, 23(1), 19-31. http://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/232/pdf_5%0A
52. Rojas Cabrera, E., Guzmán Rivero, M., Verduguez Orellana, A., & Montano Villarroel, N. (2012). Utilidad de la prueba de Montenegro (IDRM) como herramienta para la vigilancia epidemiológica de Leishmaniasis cutánea en áreas de Bolivia donde coexiste la infección por Leishmania spp y T. cruzi. *Gaceta Médica Boliviana*, 35(2), 55-58.
53. Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wildlife Wild and synanthropic reservoirs of

- Leishmania species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
54. Rotureau, B., Ravel, C., Nacher, M., Couppie, P., Curtet, I., Dedet, J., & Carme, B. (2006). Molecular Epidemiology of Leishmania (Viannia) guyanensis in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 468-473. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.468>
55. Rougeron, V., De Meeûs, T., & Bañuls, A. L. (2017). Reproduction in Leishmania: A focus on genetic exchange. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 50, 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.013>
56. Rugani, J. N., Gontijo, C. M. F., Frézard, F., Soares, R. P., & Do Monte-Neto, R. L. (2019). Antimony resistance in leishmania (Viannia) braziliensis clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114(7), 1-9. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190111>
57. Shimabukuro, P., Andrade, A., & Galati, E. (2017). Checklist of American sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): Genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, 2017(660), 67-106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
58. Sosa, N., Pascale, J. M., Jiménez, A. I., Norwood, J. A., Kreishman-detrick, M., Weina, P. J., Lawrence, K., Mccarthy, W. F., Adams, R., Scott, C., Ransom, J., Tang, D., Groggl, M., Id, S., Miguel, J., Id, P., Jime, A. I., Norwood, J. A., Kreishman-detrick, M., ... Groggl, M. (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007253.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007253>
59. Soto, J. (2019). Situación actual y perspectivas en el tratamiento de las leishmaniasis tegumentarias en América. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 39(2), 237-240.
60. Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, 7(9). <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
61. Tsukayama, P., Lucas, C., & Bacon, D. J. (2009). Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World Leishmania. *International Journal for Parasitology*, 39(3), 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.004>
62. Valderrama, A., Tavares, M. G., & Filho, J. D. A. (2011). Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8), 1024-1031. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800021>
63. Valdivia, H. O., Reis-Cunha, J. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Baptista, R. P., Baldeviano, G. C., Gerbasi, R. V., Dobson, D. E., Pratlong, F., Bastien, P., Lescano, A. G., Beverley, S. M., & Bartholomeu, D. C. (2015). Comparative genomic analysis of Leishmania (Viannia) peruviana and Leishmania (Viannia) braziliensis. *BMC Genomics*, 16(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1928-z>
64. Van der Auwera, G., & Dujardina, J. C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 265-294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
65. Vásquez Huerta, L., Ruelas Llerena, N., & Córdova Benzaquen, E. (2011). Patrones de

- coloración en la inmunofluorescencia indirecta y su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria y enfermedad de Chagas. *Acta Médica Peruana*, 28(1), 19-22.
66. Vélez, I., Agudelo, S., Robledo, S., Jaramillo, L., Segura, I., Soccol, V., & Restrepo, S. (1994). Diffuse cutaneous leishmaniasis with mucosal involvement in Colombia, caused by an enzymatic variant of *Leishmania panamensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), 199. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90294-1)
67. WHO-PAHO. (2019). Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. *Informe Leishmaniasis*, 4, 3-7. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51739/leishreport8_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
68. WHO-PAHO. (2020). Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas. Núm. 9, diciembre del 2020. *Informe Leishmaniasis*, 4, 3-7. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>
69. Yadon, Z. E., Moreira, O. C., Pereira, L. D. O. R., & Cupolillo, E. (2017). *Taller internacional de estandarización de un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga parasitaria en el manejo de la leishmaniasis cutánea en las Américas*.
70. Yamada, K., Valderrama, A., Gottdenker, N., Cerezo, L., Minakawa, N., Saldaña, A., Calzada, J. E., & Chaves, L. F. (2016). Macroecological patterns of American Cutaneous Leishmaniasis transmission across the health areas of Panamá (1980–2012). *Parasite*

Epidemiology and Control, 1(2), 42-55. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.03.003>

71. Yang, B. Bin, Chen, D. L., Chen, J. P., Liao, L., Hu, X. S., & Xu, J. N. (2013). Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: Different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. *Parasites and Vectors*, 6(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-32>

FIGURAS

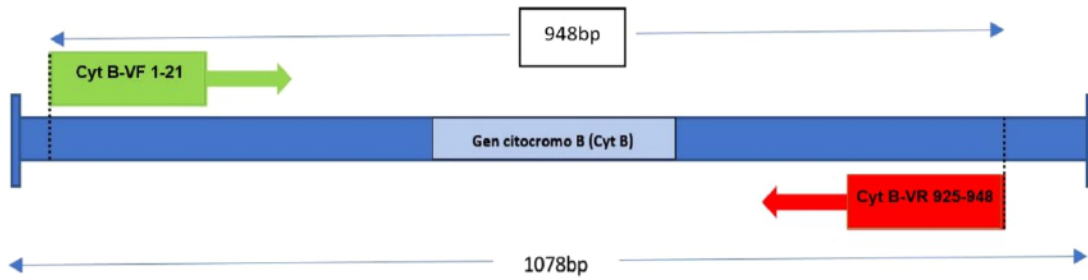


Figura 1. Sitio de anidamiento de cebadores y longitud del fragmento de interés cytb

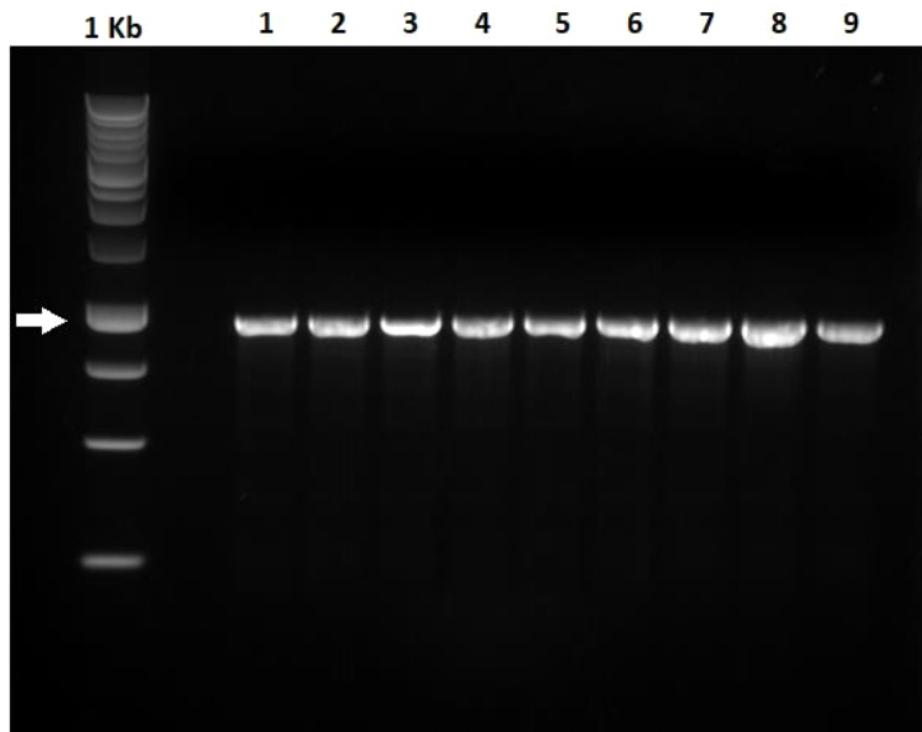


Figura 2. Amplificación de cytb fragmento de 948bp

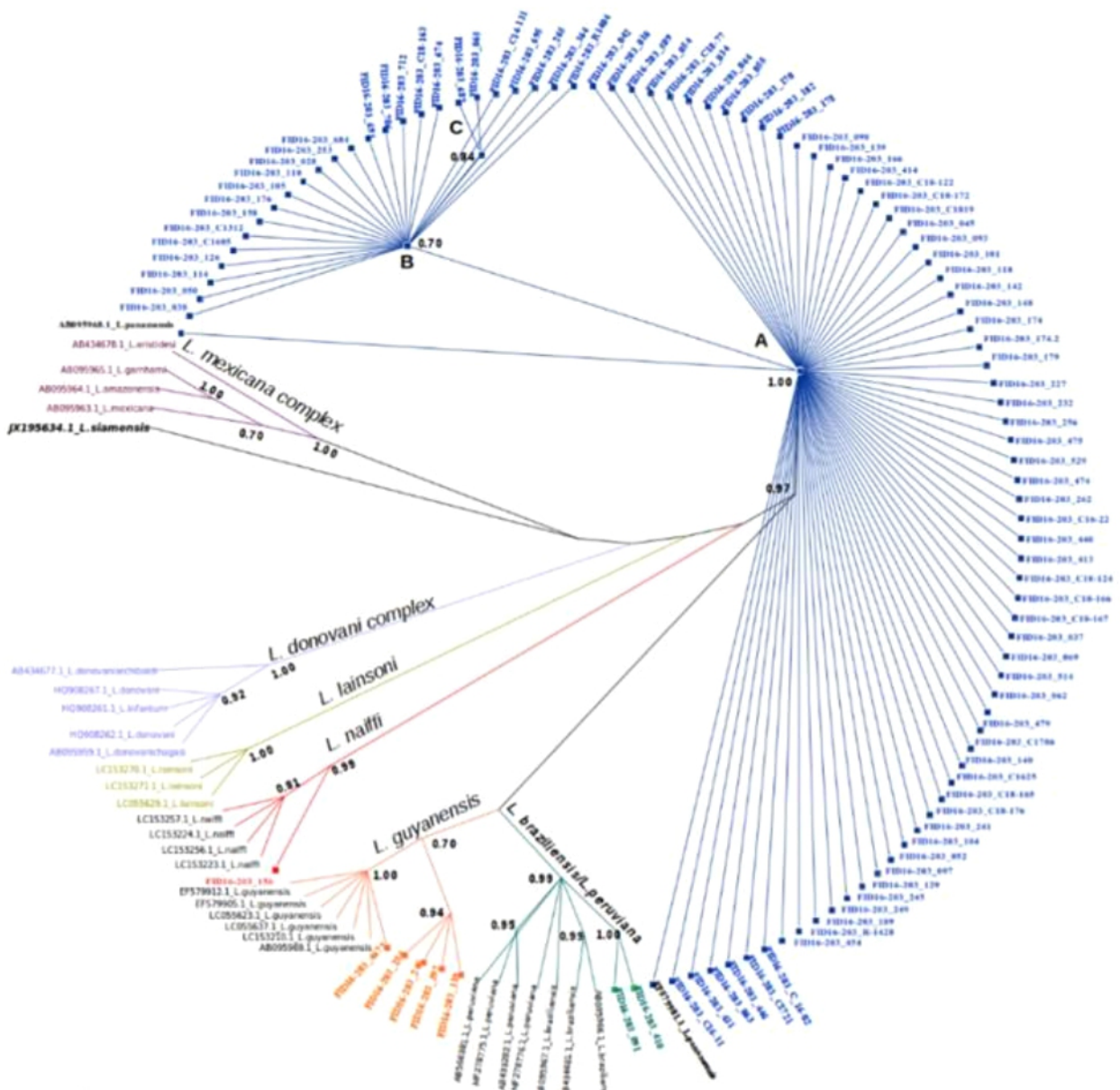


Figura 3. Árbol filogenético inferido del análisis bayesiano del gen *cytb* usando Mr. Bayes v. 3.2. Los números en el nodo representan probabilidades posteriores bayesianas; Se utilizó *Leishmania siamensis* JX195634.1 como exogrupo. Diferentes colores de etiquetas en *L. panamensis* (azul), *L. guyanensis* (naranja), *L. braziliensis* (verde) y 41. Los grupos filogenéticos de *L. naiffi* (rojo) representan aislados de estas especies que se encuentran aquí. Las letras A, B y C en 42 el árbol representa haplotipos de *L. panamensis*.



Figura 4. Mapa de Distribución de especies del Subgénero *Viannia* encontradas por la secuenciación de *cytb*

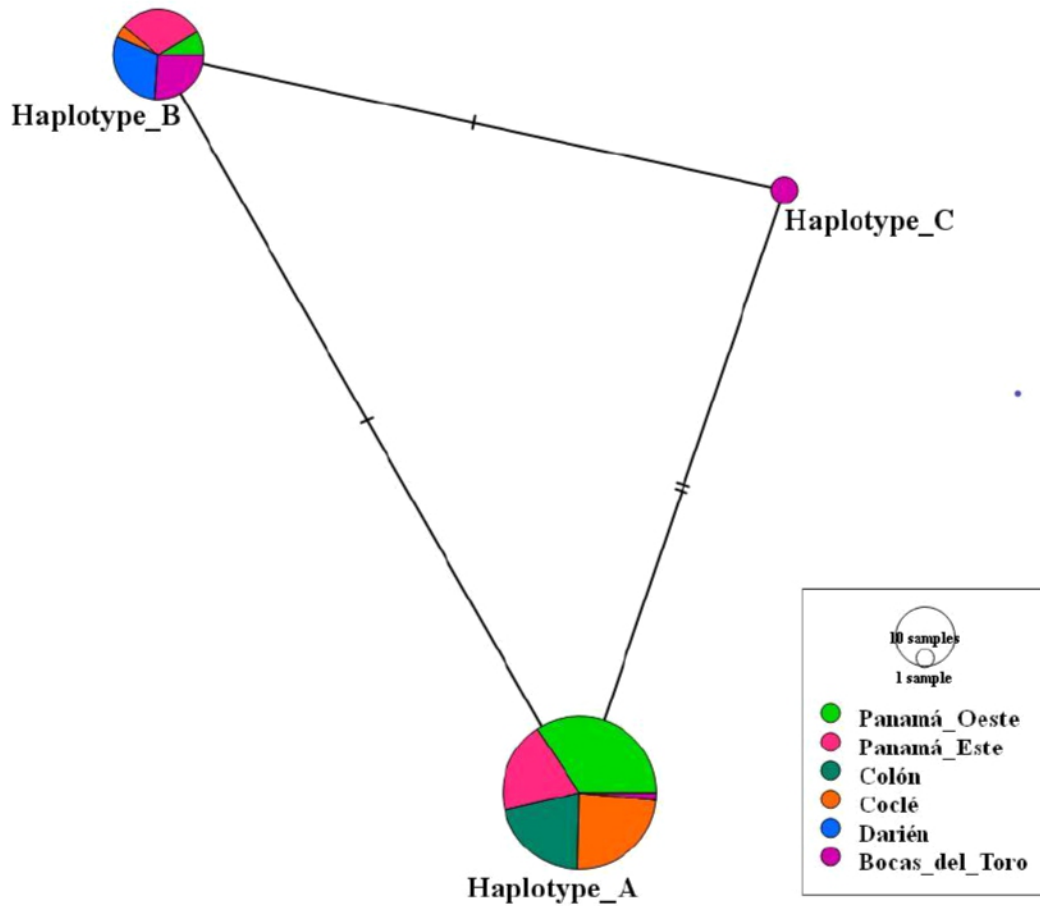


Figura 5. Red de haplotipos inferida por un método de unión mediana utilizando secuencias de citocromo b de *Leishmania panamensis*.

Los círculos representan diferentes haplotipos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; los colores indican los orígenes geográficos. Las marcas de sombreado corresponden a sustituciones de nucleótidos.

TABLAS

Tabla 1. Secuencias cytb parciales recuperadas de GenBank para describir sitios polimórficos que discriminan los complejos de *Leishmania*.

Longitud	Número de Acceso GenBank	Especie <i>Leishmania</i>	Aislado	País de procedencia
872bp	EF579900.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	LEM2252	Brasil
817bp	LC153268.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	15-10DA1	Ecuador
817bp	LC153255.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	14-2CBM2	Ecuador
817bp	LC153229.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-9CBM1	Ecuador
817bp	LC153194.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	12PVM15	Ecuador
857bp	MF278774.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/PE/84/LC 53	Perú
730bp	MF344881.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_099	Brasil
730bp	MF344880.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_062	Brasil
730bp	MF344879.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_255	Brasil
730bp	MF344878.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_244	Brasil
730bp	MF344877.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_165	Brasil
730bp	MF344876.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_154	Brasil
730bp	MF344875.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	EM_078	Brasil
817bp	LC055635.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13AM5	Ecuador
817bp	LC055633.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13AM1	Ecuador
817bp	MH841942.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	AB2	Argentina

817bp	MH841941.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>AB1</i>	<i>Argentina</i>
713bp	LC472875.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2PI3</i>	<i>Perú</i>
706bp	LC472870.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2AA4</i>	<i>Perú</i>
754bp	LC472868.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2AA2</i>	<i>Perú</i>
795bp	LC472866.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-1MD-L301</i>	<i>Perú</i>
773bp	LC472865.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>17-11HU1</i>	<i>Perú</i>
696bp	LC472864.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>17-11MD13</i>	<i>Perú</i>
697bp	LC472861.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2PP9</i>	<i>Perú</i>
714bp	LC472860.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2PP8</i>	<i>Perú</i>
714bp	LC472855.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2PP3</i>	<i>Perú</i>
716bp	LC472854.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2PP2</i>	<i>Perú</i>
714bp	LC472847.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>12-2San3</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472485.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-12MD-CL2</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472484.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-12MD-CL1</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472481.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-1MD79</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472483.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-1MD68</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472480.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-1MD-L287</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472479.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>16-1MD-L271</i>	<i>Perú</i>
817bp	LC472478.1	<i>Leishmania</i>	<i>16-1MD-L282</i>	<i>Perú</i>

		<i>braziliensis</i>		
817bp	LC472477.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L265	Perú
817bp	LC472476.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L283	Perú
817bp	LC472475.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L284	Perú
817bp	LC472474.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L275	Perú
817bp	LC472473.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L286	Perú
817bp	LC472472.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L260	Perú
817bp	LC472471.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L289	Perú
817bp	LC472470.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L249	Perú
817bp	LC472469.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L291	Perú
817bp	LC472468.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L293	Perú
817bp	LC472466.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L218	Perú
817bp	LC472465.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L208	Perú
817bp	LC472464.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L298	Perú
817bp	LC472463.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L294	Perú
817bp	LC472462.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L361	Perú
817bp	LC472461.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L302	Perú
817bp	LC472460.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L315	Perú
817bp	LC472459.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L308	Perú

817bp	LC472458.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L310	Perú
817bp	LC472457.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1MD-L311	Perú
817bp	LC472453.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1PI-E271	Perú
817bp	LC472444.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1CU-SF33	Perú
817bp	LC472445.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1AY-SF39	Perú
817bp	LC472441.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1AY-SF26	Perú
817bp	LC472440.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	16-1AY-SF25	Perú
817bp	LC472428.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD-S6	Perú
817bp	LC472427.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD-S5	Perú
817bp	LC472426.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD-S3	Perú
817bp	LC472425.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD-S2	Perú
817bp	LC472424.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11PU1	Perú
817bp	LC472423.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11CU3	Perú
817bp	LC472422.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11HU2	Perú
817bp	LC472421.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD18	Perú
817bp	LC472420.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD16	Perú
817bp	LC472419.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD15	Perú
817bp	LC472418.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD14	Perú
817bp	LC472417.1	<i>Leishmania</i>	17-11MD9	Perú

		<i>braziliensis</i>		
817bp	LC472416.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD8	Perú
817bp	LC472415.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD7	Perú
817bp	LC472414.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD6	Perú
817bp	LC472413.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD4	Perú
817bp	LC472412.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD3	Perú
817bp	LC472411.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	17-11MD2	Perú
817bp	LC153269.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	15-10DA2	Ecuador
817bp	LC153267.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	14-9PA-NM	Ecuador
817bp	LC153266.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	14-9ZU-MA	Ecuador
817bp	LC153259.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	14-2CBM9	Ecuador
426bp	LC153245.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	12AR2	Ecuador
643bp	LC153240.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	12.7-8EC619	Ecuador
817bp	LC153236.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-9LA3	Ecuador
817bp	LC153230.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-9CBM2	Ecuador
817bp	LC153232.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-9L002	Ecuador
817bp	LC153228.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-8EC6	Ecuador
817bp	LC153227.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-8EC5	Ecuador
817bp	LC153222.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-2EC11	Ecuador

817bp	LC153215.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13-2EC4	Ecuador
817bp	LC153196.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	12PVM20	Ecuador
817bp	LC153185.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	12PVM5	Ecuador
817bp	LC153167.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13CBM23	Ecuador
817bp	LC153160.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13CBM16	Ecuador
817bp	LC055634.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	13AM4	Ecuador
817bp	LC055627.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	15Or6	Ecuador
817bp	LC055622.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	15Or1	Ecuador
817bp	AB558237.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-1	Venezuela
817bp	AB558236.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-5	Venezuela
817bp	AB558235.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-6	Venezuela
817bp	AB558234.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-7	Venezuela
817bp	AB558233.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-10	Venezuela
817bp	AB558232.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-12	Venezuela
816bp	AB558231.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	Clone V-16	Venezuela
817bp	LC068832.1	<i>Leishmania braziliensis/</i> <i>Leishmania peruviana</i>	-	Perú
817bp	AB433282.1	<i>Leishmania peruviana</i>	LC39	-
908bp	MF278776.	<i>Leishmania</i>	MHOM/PE/87/PA	Perú

	1	<i>peruviana</i>	B2880	
899bp	MF278775.1	<i>Leishmania peruviana</i>	MHOM/PE/84/LC26	Perú
817bp	LC472456.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-FYe	Perú
711bp	LC472876.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2SII	Perú
817bp	LC472455.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-E273	Perú
817bp	LC472454.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-E272	Perú
817bp	LC472451.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-E268	Perú
817bp	LC472450.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-E266	Perú
817bp	LC472449.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-E263	Perú
817bp	LC472448.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-E261	Perú
817bp	LC472447.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1PI-B43	Perú
817bp	LC472442.1	<i>Leishmania peruviana</i>	16-1AY-SF30	Perú
817bp	LC472439.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal16	Perú
817bp	LC472438.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal14	Perú
817bp	LC472438.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal14	Perú
817bp	LC472437.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal12	Perú
817bp	LC472436.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal11	Perú
817bp	LC472435.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal10	Perú
817bp	LC472434.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal9	Perú

817bp	LC472433.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal8	Perú
817bp	LC472432.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal7	Perú
817bp	LC472431.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal3	Perú
817bp	LC472430.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal2	Perú
817bp	LC472429.1	<i>Leishmania peruviana</i>	12-2Sal1	Perú
817bp	AB566382.1	<i>Leishmania peruviana</i>	09-per	Perú
817bp	AB566381.1	<i>Leishmania peruviana</i>	08-per2	Perú
817bp	AB566380.1	<i>Leishmania peruviana</i>	08-per1	Perú
872bp	EF579905.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	LEM85	Perú
817bp	LC153252.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL11	Perú
817bp	LC153218.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-2EC7	Ecuador
817bp	LC153199.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM23	Ecuador
817bp	LC153193.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM14	Ecuador
817bp	LC153186.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM6	Ecuador
817bp	LC153180.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	Que	Ecuador
817bp	LC153162.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13CBM18	Ecuador
817bp	LC472486.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	16-12JU2	Ecuador
817bp	LC153277.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15-10VH111	Ecuador
817bp	LC153276.1	<i>Leishmania</i>	15-10VH110	Ecuador

		<i>guyanensis</i>		
817bp	LC153275.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15-10VH108	Ecuador
817bp	LC153274.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15-10VH105	Ecuador
817bp	LC153273.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15-10VH100	Ecuador
817bp	LC153272.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15-10VH27	Ecuador
817bp	LC153265.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM14	Ecuador
817bp	LC153264.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM16	Ecuador
817bp	LC153263.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM13	Ecuador
817bp	LC153262.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM12	Ecuador
817bp	LC153261.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM11	Ecuador
817bp	LC153260.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM10	Ecuador
817bp	LC153258.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	14-2CBM8	Ecuador
817bp	LC153254.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL13	Ecuador
817bp	LC153253.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL12	Ecuador
817bp	LC153251.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL10	Ecuador
817bp	LC153250.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL7	Ecuador
817bp	LC153249.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL5	Ecuador
817bp	LC153248.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL3	Ecuador
817bp	LC153247.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	MAL1	Ecuador

817bp	LC153219.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-2EC8	Ecuador
817bp	LC153217.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-2EC6	Ecuador
817bp	LC153216.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-2EC5	Ecuador
817bp	LC153214.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-2EC1	Ecuador
817bp	LC153213.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12NA2	Ecuador
817bp	LC153212.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12NA1	Ecuador
817bp	LC153211.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PEB2	Ecuador
817bp	LC153210.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12LB9	Ecuador
817bp	LC153209.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12LB7	Ecuador
817bp	LC153208.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12LB6	Ecuador
817bp	LC153207.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12LB5	Ecuador
817bp	LC153206.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12LB1	Ecuador
817bp	LC153205.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM32	Ecuador
817bp	LC153204.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM31	Ecuador
817bp	LC153203.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM30	Ecuador
817bp	LC153202.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM29	Ecuador
817bp	LC153201.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM27	Ecuador
817bp	LC153200.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM24	Ecuador
817bp	LC153198.1	<i>Leishmania</i>	12PVM22	Ecuador

		<i>guyanensis</i>		
817bp	LC153198.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM22	Ecuador
817bp	LC153197.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM21	Ecuador
817bp	LC153195.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM17	Ecuador
817bp	LC153192.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM13	Ecuador
817bp	LC153191.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM12	Ecuador
817bp	LC153190.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM11	Ecuador
817bp	LC153189.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM10	Ecuador
817bp	LC153188.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM9	Ecuador
817bp	LC153187.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM8	Ecuador
817bp	LC153184.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM4	Ecuador
817bp	LC153183.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM3	Ecuador
817bp	LC153181.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	12PVM1	Ecuador
817bp	LC153165.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13CBM21	Ecuador
817bp	LC153164.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13CBM20	Ecuador
817bp	LC153163.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13CBM19	Ecuador
817bp	LC153161.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13CBM17	Ecuador
817bp	LC055621.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15VH4	Ecuador
817bp	LC055620.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15VH3	Ecuador

817bp	LC055619.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15VH2	Ecuador
817bp	LC055618.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15VH1	Ecuador
817bp	LC055638.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13AM11	Ecuador
817bp	LC055637.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13AM8	Ecuador
817bp	LC055636.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13AM7	Ecuador
817bp	LC055631.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-8EC11	Ecuador
817bp	LC055630.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	13-8EC10	Ecuador
817bp	LC055628.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Or7	Ecuador
817bp	LC055626.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Or5	Ecuador
817bp	LC055625.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Or4	Ecuador
817bp	LC055624.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Or3	Ecuador
817bp	LC055623.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Or2	Ecuador
817bp	LC055617.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Ca3	Ecuador
817bp	LC055616.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	15Ca2	Ecuador
872bp	EF579901.1	<i>Leishmania panamensis</i>	LEM702	Panama
509bp	EU499931.1	<i>Leishmania panamensis</i>	Lpasam1	Colombia
509bp	EU499924.1	<i>Leishmania panamensis</i>	Lpacol	Colombia
817bp	LC472482.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	16-1MD87	Perú
714bp	LC472848.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2San4	Perú
713bp	LC472849.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2San5	Perú

713bp	LC472850.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2San6	Perú
713bp	LC472851.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2San7	Perú
713bp	LC472852.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2San10	Perú
715bp	LC472853.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2PP1	Perú
714bp	LC472856.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2PP4	Perú
714bp	LC472857.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2PP5	Perú
716bp	LC472858.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2PP6	Perú
713bp	LC472859.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2PP7	Perú
726bp	LC472867.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2AA1	Perú
711bp	LC472877.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2MS1	Perú
703bp	LC472878.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2MS2	Perú
695bp	LC472879.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	12-2MS3	Perú
817bp	AB433280.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	MHOM/BR/81/M6 426	Brasil
817bp	LC472467.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	16-1MD-L296	Perú
817bp	LC472446.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	16-1CU-LRRA759	Perú
817bp	LC153271.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	15-10CA2	Ecuador
817bp	LC153270.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	15-10CA1	Ecuador
817bp	LC055632.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	13-8EC14	Ecuador
817bp	LC055629.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	13-8EC7	Ecuador
817bp	AB433279.1	<i>Leishmania naiffi</i>	MDAS/BR/79/M5 533	Brasil
817bp	LC153257.1	<i>Leishmania naiffi</i>	2CBM5	Ecuador
817bp	LC153256.1	<i>Leishmania naiffi</i>	2CBM4	Ecuador
817bp	LC153224.1	<i>Leishmania naiffi</i>	8EC2	Ecuador
817bp	LC153223.1	<i>Leishmania naiffi</i>	8EC1	Ecuador
817bp	AB433281.1	<i>Leishmania shawi</i>	MHOM/BR/79/M1 5065	Brasil
872bp	EF579915.1	<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/MX/93/C RE47	México
872bp	EF579906.1	<i>Leishmania mexicana</i>	LEM695	Belice
817bp	LC416876.1	<i>Leishmania mexicana</i>	18LC0002S	Venezuela
817bp	LC416875.1	<i>Leishmania mexicana</i>	18Ven_Fel14	Venezuela
817bp	LC416874.1	<i>Leishmania</i>	18Ven_Fel13L	Venezuela

		<i>mexicana</i>		
817bp	LC416873.1	<i>Leishmania mexicana</i>	18Ven_Fel13R	Venezuela
817bp	LC416872.1	<i>Leishmania mexicana</i>	18Ven_Fel11	Venezuela
817bp	LC416871.1	<i>Leishmania mexicana</i>	18Ven_Fel10	Venezuela
817bp	LC416870.1	<i>Leishmania mexicana</i>	18Ven_Fel9	Venezuela
817bp	LC153244.1	<i>Leishmania mexicana</i>	12-7HU1	Ecuador
817bp	LC386854.1	<i>Leishmania mexicana</i>	17Ven_Can2	Venezuela
817bp	LC386853.1	<i>Leishmania mexicana</i>	17Ven_Fel8	Venezuela
817bp	LC386852.1	<i>Leishmania mexicana</i>	17Ven_Fel7	Venezuela
817bp	LC386851.1	<i>Leishmania mexicana</i>	17Ven_Fel6	Venezuela
817bp	LC386850.1	<i>Leishmania mexicana</i>	17Ven_Fel5	Venezuela
817bp	LC386849.1	<i>Leishmania mexicana</i>	17Ven_Fel4	Venezuela
817bp	AB558230.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-2	Venezuela
817bp	AB558229.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-3	Venezuela
817bp	AB558228.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-4	Venezuela
817bp	AB558227.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-9	Venezuela
817bp	AB558226.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-11	Venezuela
817bp	AB558225.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-13	Venezuela
817bp	AB558224.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-14	Venezuela

817bp	AB558223.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-15	Venezuela
817bp	AB558222.1	<i>Leishmania mexicana</i>	V-17	Venezuela
817bp	AB558221.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Hu2-5F	Venezuela
817bp	AB558220.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Hu1-11B	Venezuela
817bp	AB558219.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Hu1-7G	Venezuela
817bp	AB558218.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Huigra1	Venezuela
817bp	AB558217.1	<i>Leishmania mexicana</i>	DCL An	Venezuela
816bp	AB847156.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Cha-2G	Venezuela
817bp	AB847155.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Cha-7F	Ecuador
817bp	AB847154.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Chan-3A	Ecuador
817bp	AB847153.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Ala-16D	Ecuador
817bp	AB847152.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Ala-10F	Ecuador
817bp	AB847151.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Ala-6G	Ecuador
816bp	AB847150.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Ala-3G	Ecuador
816bp	AB847149.1	<i>Leishmania mexicana</i>	Ala-3A	Ecuador
872bp	EF579909.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	LMAMPRO/BR/72/M1841	Brasil
872bp	EF579902.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	LEM690 MHOM/BR/73/M2 269	Brasil
730bp	MF344895.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_246	Brasil

730bp	MF344894.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_400	Brasil
730bp	MF344893.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_394	Brasil
730bp	MF344892.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_274	Brasil
730bp	MF344891.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_273	Brasil
730bp	MF344890.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_272	Brasil
730bp	MF344889.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_269	Brasil
730bp	MF344888.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_266	Brasil
730bp	MF344889.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_269	Brasil
730bp	MF344888.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_266	Brasil
730bp	MF344887.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_253	Brasil
730bp	MF344886.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_176	Brasil
730bp	MF344885.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_130	Brasil
730bp	MF344884.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_087	Brasil
730bp	MF344883.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_053	Brasil
730bp	MF344882.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	EM_042	Brasil
817bp	LC472443.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	16-1JU-LRRA488	Perú
839bp	LC089019.1	<i>Leishmania infantum</i>	Leish38_cytb_EX	España
872bp	EF579913.1	<i>Leishmania infantum</i>	MCAN/GR/94/CR E69	Grecia
872bp	EF579895.1	<i>Leishmania</i>	MHOM/TN/80/IP	-

		<i>infantum</i>	<i>T1</i>	
800bp	KX061917. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>MHOM/CN/80/80 1</i>	<i>China</i>
797bp	KX061912. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>MCAN/CN/90/We nChuan</i>	<i>China</i>
825bp	KX061911. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>MCAN/CN/08/Cy</i>	<i>China</i>
730bp	MF344874. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_382</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344873. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_267</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344872. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_395</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344871. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_387</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344870. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_378</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344869. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_264</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344868. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_361</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344867. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_177</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344866. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_243</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344865. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_169</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344864. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_143</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344863. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_142</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344862. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_116</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344861. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_101</i>	<i>Brasil</i>
730bp	MF344860. 1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>EM_005</i>	<i>Brasil</i>

847bp	LC089019.1	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leish38_cytb_EX</i>	<i>España</i>
872bp	EF579911.1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/IN/80/DD</i> 8	<i>India</i>
872bp	EF579896.1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/IN/80/DD</i> 8	<i>India</i>
833bp	KX061916. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/CN/86/SC</i> 6	<i>China</i>
807bp	KX061915. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>IMJW/CN/92/KX</i> G-927	<i>China</i>
825bp	KX061906. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/CN/93/K</i> XG-XU	<i>China</i>
828bp	KX061905. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>IMJW/CN/87/KX</i> G-65	<i>China</i>
811bp	KX061904. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>IMJW/CN/91/KX</i> G-918	<i>China</i>
872bp	EF579897.1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/BR/74/PP</i> 75a	<i>Brasil</i>
702bp	AB725910.1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>D81</i>	<i>Bangladesh</i>
795bp	KX061908. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/CN/94/K</i> XG-LIU	<i>China</i>
767bp	KX061907. 1	<i>Leishmania donovani</i>	<i>MHOM/CN/90/90</i> 44	<i>China</i>

Tabla 2. Secuencias cytb completas recuperadas de GenBank para diseñar cebadores específicos de *Leishmania*.

Longitud	Adhesión a GenBank	Especie de Leishmania
1398pb	M10126.1	<i>Leishmania tarentolae</i>
1078pb	BK010875.1	<i>Leishmania panamensis</i>
1078pb	AB095968.1	<i>Leishmania panamensis</i>
1078pb	MK570510.1	<i>Leishmania panamensis</i>
1078pb	AB434682.1	<i>Leishmania braziliensis</i>
1078pb	AB434681.1	<i>Leishmania braziliensis</i>
1078pb	AB095967.1	<i>Leishmania braziliensis</i>
1078pb	AB095966.1	<i>Leishmania braziliensis</i>
1078pb	AB095969.1	<i>Leishmania guyanensis</i>
1078pb	BK010883.1	<i>Leishmania shawi</i>
1078pb	AB434680.1	<i>Leishmania shawi</i>
1079pb	AB095963.1	<i>Leishmania mexicana</i>
1078pb	AB095964.1	<i>Leishmania amazonensis</i>
1079pb	AB434679.1	<i>Leishmania pifanoi</i>
1079pb	AB095965.1	<i>Leishmania garnhami</i>
1078pb	AB434678.1	<i>Leishmania aristidesi</i>
1079PB	HQ908261.1	<i>Leishmania infantum</i>
1079pb	HQ908267.1	<i>Leishmania donovani</i>
1079pb	HQ908262.1	<i>Leishmania donovani</i>
1079pb	AB095957.1	<i>Leishmania donovani</i>
1079pb	AB095959.1	<i>Leishmania donovani chagasi</i>
1079pb	AB095958.1	<i>Leishmania donovani infantum</i>
1079pb	AB434677.1	<i>Leishmania donovani archivaldi</i>
1080pb	AB095961.1	<i>Leishmania major</i>
1080pb	AB095962.1	<i>Leishmania aethiopica</i>
1080pb	AB095960.1	<i>Leishmania tropica</i>
1080pb	HQ9082270.1	<i>Leishmania tropica</i>
1080pb	HQ9082270.1	<i>Leishmania tropica</i>
1080pb	HQ908257.1	<i>Leishmania tropica</i>

Tabla 3. Estimaciones de la distancia evolutiva entre grupos de secuencias de cytb de *Leishmania*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>L. tarentolae</i>									
2. <i>L. (V.) panamensis</i>	0.10								
3. <i>L. (V.) braziliensis</i>	0.10	0.01							
4. <i>L. (V.) guyanensis</i>	0.10	0.01	0.01						
5. <i>L. shawi</i>	0.10	0.01	0.01	0.01					
6. <i>L. mexicana complex</i>	0.11	0.12	0.12	0.12	0.11				
7. <i>L. donovani complex</i>	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.10			
8. <i>L. major</i>	0.13	0.13	0.12	0.13	0.12	0.11	0.08		
9. <i>L. tropica complex</i>	0.13	0.13	0.12	0.13	0.12	0.10	0.08	0.07	

Tabla 4. Distribución de Haplotipos por zona geográfica y frecuencia acumulada

Provincia de Procedencia	Haplotipo A	Haplotipo B	Haplotipo C	Total, de haplotipos por provincia
Panamá oeste	23	2	0	25
Colón	14	0	0	14
Bocas del toro	1	6	2	9
Coclé	16	1	0	17
Panamá este	13	7	0	20
Darién	0	7	0	7
Total, de haplotipos	67	23	2	92

Tabla 5. Sitios informativos de singletons y parsimonia encontrados en las secuencias de cytb analizadas

Especies de <i>Leishmania</i>	Sitios de nucleótidos																						
	44	47	48	62	92	95	98	107	116	119	120	122	140	146	152	170	179	182	194	197	198	200	221
<i>L.panamensis</i>	G	A	A	C*	A	A	A	T	A	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A
<i>L.guyanensis</i>	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	Y	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A
<i>L.braziliensis</i>	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	T	A	G	T	T	K	A	A	A	A
<i>L.peruviana</i> ^{&}	-	-	-	-	A	A	A	T	A	A	T	A	A	T	A	G	T	T	G	A	A	A	A
<i>L.shawi</i> ^{&}	G	A	A-	T	A	A	A	T	A	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A
<i>L.naiffi</i> ^{&}	-	-	-	-	A	A	A	T	A	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A
<i>L.lainsoni</i>	-	-	-	-	A	W	A	T	A	A	C	A	A	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A
<i>L.mexicana</i>	A	A	G	T	A	T	T	A	A	A	C	T	A	A	G	A	T	T	A	T*	A	A	A
<i>L.amazonensis</i>	A	A	G	T	A	T	T	G	A	A	C	T	A	A	G	A	T	T	W	A	C	A	T
<i>L.infantum</i>	A	T	G	T	G*	A	A	G	G*	G*	T	A	A	A	A	A	C*	C*	A	A	C	A	T
	Sitios de nucleótidos																						
	224	228	236	240	242	246	248	260	269	278	281	287	290	302	306	308	309	318	323	329	338	339	344
<i>L.panamensis</i>	A	C	A	C	T	G	T	A	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	A	A
<i>L.guyanensis</i>	A	C	A	C	K	G	T	A	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	A	A
<i>L.braziliensis</i>	A	C	A	C	T	G	T	A	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	A	A
<i>L.peruviana</i>	A	C	A	C	T	G	T	A	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	A	A
<i>L.shawi</i>	A	T	A	C	T	G	T	G	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	A	A

<i>L.naiiffi</i>	A	T	A	C	T	G	W	A	A	A	A	T	T	T	G	T	A	A	T	A	A	G	A
<i>L.lainsoni</i>	A	T	A	C	T	G	Y	A	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	G	A
<i>L.mexicana</i>	T	T	C	T	A	A	T	G	R	Y	G	T	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	C
<i>L.amazonensis</i>	T	T	C	T	A	A	W	G	A	T	A	C*	T	G	G	A	G	G	A	T*	T	A	T
<i>L.infantum</i>	A	T	C	C	T	G	C	G	A	A	G	T	A*	A	G	S	G	G	A	A	A	A	A

Sitios de nucleótidos

	362	363	365	368	374	383	392	398	401	414	419	422	425	428	431	434	437	438	439	443	444	446	458
<i>L.panamensis</i>	A	C*	G	G*	A	G	A	A	T	T	T	T	G	A	G*	T	T	G	T	A	T	A	T
<i>L.guyanensis</i>	A	T	G	A	A	G	A	A	T	C*	T	T	G	A	T	T	T	G	T	A	C	A	T
<i>L.braziliensis</i>	A	T	G	A	A	G	A	A	T	T	T	T	G	A	T	T	T	G	T	A	Y	A	T
<i>L.peruviana</i>	A	T	G	A	A	G	A	A	T	T	T	T	G	A	T	T	T	G	T	A	T	A	T
<i>L.shawi</i>	A	T	G	A	A	G	A	A	T	T	T	T	G	A	T	T	T	G	T	A	T	A	T
<i>L.naiiffi</i>	A	T	G	A	A	G	A	A	T	T	T	T	A	A	T	T	T	G	T	G*	T	A	T
<i>L.lainsoni</i>	A	T	G	A	A	A	A	A	T	T	T	T	A	A	T	T	T	G	T	A	C	A	T
<i>L.mexicana</i>	T	T	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	A	T	T	A	Y	A	C	A	C	T	A
<i>L.amazonensis</i>	T	T	A	A	A	T	C	T	A	T	A	A	A	T	T	A	C	A	C	A	C	T	A
<i>L.infantum</i>	A	T	A	A	G*	G	T	A	A	T	A	C	C	A	T	T	T	A	C	A	C	T	T

Sitios de nucleótidos

	464	476	485	488	489	492	494	506	519	521	524	527	528	530	534	537	539	540	542	545	563	584	590
<i>L.panamensis</i>	A	A	T	T	T	C	T	T	C	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T
<i>L.guyanensis</i>	A	A	T	T	T	C	T	T	C	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T
<i>L.braziliensis</i>	A	A	T	T	T	C	T	T	C	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T

<i>L.peruviana</i>	A	A	T	T	T	C	T	T	C	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T
<i>L.shawi</i>	A	A	T	T	T	C	T	T	C	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T
<i>L.naiiffi</i>	A	A	T	T	T	C	T	T	T	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T
<i>L.lainsoni</i>	A	A	C*	T	T	C	T	T	T	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	T	C*	T	T
<i>L.mexicana</i>	T	T	T	A	C*	C	T	T	T	A	T	T	G	A	A	T	A	G	G	M	T	A	T
<i>L.amazonensis</i>	T	T	T	A	T	C	T	T	T	G	T	T	G	A	A	T	A	G	T	A	T	A	T
<i>L.infantum</i>	T	T	T	A	T	T*	A*	A*	T	A	A*	C*	G	A	A	C	T*	G	A	A	T	A	G*

Sitios de nucleótidos

	614	617	620	623	624	641	651	668	680	685	687	689	690	692	701	704	707	722	731	734	737	740	743
<i>L.panamensis</i>	T	T	G	A	T	A	A	G*	A	T	G	A	G	G	A	T	A	T	G	G	A	A	A
<i>L.guyanensis</i>	T	T	R	A	C	A	A	A	A	T	R	A	G	G	A	T	A	T	G	G	A	A	A
<i>L.braziliensis</i>	T	T	G	G	C	A	A	A	A	T	G	A	G	G	A	T	A	T	G	G	A	A	A
<i>L.peruviana</i>	T	T	G	G	C	A	A	A	A	T	G	A	G	G	A	T	A	T	G	G	A	A	A
<i>L.shawi</i>	T	T	G	A	T	A	A	A	A	T	G	A	G	G	A	T	A	T	G	A*	A	A	A
<i>L.naiiffi</i>	C*	T	G	A	T	A	A	A	A	T	G	A	G	G	A	T	A	T	G	G	A	A	A
<i>L.lainsoni</i>	T	C*	G	T	T	A	A	A	G	T	G	A	G	G	A	T	A	T	G	G	A	A	A
<i>L.mexicana</i>	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	G	W	A	A	T	T	T	T	A	G	T	G	T
<i>L.amazonensis</i>	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	A	A	T	C*	T	T	A	G	T	G	T
<i>L.infantum</i>	T	T	A	T	T	A	C*	A	G	T	G	G	A	T	T	T	A	A*	A	G	A	A	A

Sitios de nucleótidos

	746	749	752	764	773	777	779	782	788	800	806	818	827	833	846	848	860	861	866	875	881	896	911
<i>L.panamensis</i>	A	A	C	T	A	T	A	T	G	T	T	A	T	A	T	A	C	A	G	A	T	T	

<i>L.guyanensis</i>	A	A	C	T	A	T	A	T	G	T	T	A	T	A	T	A	A	Y	A	G	A	T	T
<i>L.braziliensis</i>	A	A	C	T	A	T	A	T	G	T	T	A	T	A	T	A	A	Y	A	G	A	T	T
<i>L.peruviana</i>	A	A	C	T	A	T	A	T	G	T	T	A	T	A	T	A	A	T	A	G	A	-	-
<i>L.shawi</i>	A	A	C	T	A	T	A	T	G	T	T	A	T	A	T	A	A	C	A	G	A	T	T
<i>L.naiffi</i>	A	G	T	T	A	T	A	T	A	T	T	A	T	A	T	A	A	T	A	G	A	T	T
<i>L.lainsoni</i>	A	A	T	T	A	T	A	T	A	T	T	A	T	A	T	A	A	Y	A	G	A	-	-
<i>L.mexicana</i>	T	A	T	C	A	C	G	A	G	T	C	A	A	A	C	A	T	T	G	A	G	T	A
<i>L.amazonensis</i>	T	G	T	A	A	T	G	T	G	T	C	A	A	A	T	G*	T	T	G	A	G	T	A
<i>L.infantum</i>	A	T	T	A	G*	C	C	A	A	C*	T	G*	T	G*	C	A	T	T	G	A	G	C*	T

Sitios de nucleótidos

	918	926	929	932	938	941	944
<i>L.panamensis</i>	C	G	G	A	T	T	T
<i>L.guyanensis</i>	C	G	G	A	T	T	T
<i>L.braziliensis</i>	C	G	G	A	T	T	T
<i>L.peruviana</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.shawi</i>	C	G	A	A	T	T	T
<i>L.naiffi</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.lainsoni</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.mexicana</i>	A	A	A	A	T	A	T
<i>L.amazonensis</i>	A	A	A	A	T	A	T
<i>L.infantum</i>	A	A	G	G*	C*	T	C*