

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Máster:

**“Filogenética molecular para la identificación de *Leishmania* spp, mediante el análisis de secuencias de Citocromo b (Cytb) del ADN mitocondrial.”**

Realizado por:

**LUIS SANTIAGO HERNÁNDEZ AGUIRRE**

Director del proyecto:

**Dr. Juan Carlos Navarro Castro, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

Quito, 06 de Septiembre, 2023

## DECLARACION JURAMENTADA

Yo, LUIS SANTIAGO HERNÁNDEZ AGUIRRE, con cédula de identidad # 060347606-0, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual que correspondan relacionados a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA C.E.

060347606-0

## **DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“Filogenética molecular para la identificación de *Leishmania* spp, mediante el análisis de secuencias de Citocromo b (Cytb) del ADN mitocondrial.”**

Realizado por:

**LUIS SANTIAGO HERNÁNDEZ AGUIRRE**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

ha sido dirigido por el profesor

**JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', with a horizontal line underneath the name.

FIRMA

## **LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**GIANINA LIZETH SUAREZ RODRIGUEZ**

**JOSE RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS**

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante  
el tribunal examinador

FIRMA



FIRMA

Quito, 06 de septiembre de 2023

**DEDICATORIA**

*A mi madre Gladys,*

*A mi familia y seres queridos.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A mi familia, amigos y compañeros por el apoyo brindado.*

*A mis profesores de la maestría por permitirme aprender de ellos.*

*Al Dr. Juan Carlos Navarro por su guía en la elaboración de la investigación*

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

**SALUD GLOBAL  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Y con el financiamiento de

**Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación**

DII-UISEK-P011617\_2

Artículo de tesis

# Filogenética molecular para la identificación de *Leishmania spp.* mediante el análisis de secuencias de Citocromo b (Cytb) del ADN mitocondrial.

Luis-Santiago Hernández <sup>1</sup>, Juan-Carlos Navarro <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; [luis.hernandez@uisek.edu.ec](mailto:luis.hernandez@uisek.edu.ec); [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

<sup>2</sup> Universidad Internacional SEK, Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud; [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

\* Autor de Correspondencia: [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

**Resumen:** La leishmaniasis es un conjunto de infecciones parasitarias con amplia diversidad epidemiológica e importante relevancia clínica siendo endémica en varios países. Se ubica entre las enfermedades tropicales desatendidas más importantes y es considerada como un grave problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud, debido a la alta morbilidad y mortalidad que la caracterizan. La enfermedad es ocasionada por parásitos del género *Leishmania*, describiéndose alrededor de 20 especies patógenas para el hombre que han demostrado una alta prevalencia en muchos países de América Latina entre ellos el Ecuador, habiéndose reportado casos en todo su territorio, sin embargo se requieren mayores estudios que profundicen en aspectos ecoepidemiológicos, epidemiología molecular y relaciones filogenéticas de las especies que permitan la aplicación y desarrollo de estrategias de intervención y control. El entendimiento de las relaciones evolutivas entre estas especies y el medio donde evolucionan es esencial para la predicción de patrones de transmisión y la epidemiología de la leishmaniasis. Nuestra hipótesis plantea que existe una marcada estructura filogenética de las especies de *Leishmania* presentes en Ecuador con base en el análisis del Citocromo b lo cual refleja un patrón de distribución relacionado con la región andina y amazónica del continente. Se aplicó el método de optimización de parsimonia máxima (MP) mediante el programa MEGA-11 para el análisis filogenético de las secuencias del gen Citocromo b mitocondrial (cytb) de *Leishmania* obtenidas de GeneBank. La matriz obtenida demostró efectividad para identificar las secuencias de *Leishmania* analizadas con base a las características filogenéticas a nivel de especies y subespecies. El análisis filogenético evidenció que la clasificación y distribución de las especies de *Leishmania* que circulan en el Ecuador concuerda con lo informado en investigaciones previas presentando un patrón de distribución geográfica relacionado con la costa del Pacífico, la región andina y amazónica del continente.

**Palabras clave:** Leishmaniasis; Kinetoplastidos; Taxonomía; Filogenética; Filogeografía, Sinapomorfia; Parsimonia.

**Abstract:** Leishmaniasis is a group of parasitic infections with wide epidemiological diversity and important clinical relevance, being endemic in several countries. It is among the most important neglected tropical diseases and is considered a serious public health problem by the World Health Organization, due to the high morbidity and mortality that characterize it. The disease is caused by parasites of the genus *Leishmania*, describing about 20 species pathogenic to humans that have shown a high prevalence in many Latin American countries including Ecuador, having reported cases throughout its territory, however, further studies are required to deepen ecoepidemiological aspects, molecular epidemiology and phylogenetic relationships of the species that allow the application and development of intervention and control strategies. Understanding the evolutionary relationships between these species and the environment where they evolve is essential for the prediction of transmission patterns and the epidemiology of leishmaniasis. Our hypothesis is that there is a marked phylogenetic structure of *Leishmania* species present in Ecuador based on the analysis of Cytochrome b, which reflects a distribution pattern related to the Andean and Amazonian region of the continent. The maximum parsimony (MP) optimization method was applied using the MEGA-11 program for the phylogenetic analysis of *Leishmania* mitochondrial cytochrome b (cytb) gene sequences obtained from GeneBank. The matrix obtained showed effectiveness in identifying the *Leishmania* sequences analyzed based on phylogenetic characteristics at the species and subspecies level. The phylogenetic analysis showed that the classification and distribution of *Leishmania* species circulating in Ecuador is consistent with previous research, presenting a geographic distribution pattern related to the Pacific coast, the Andean and Amazonian regions of the continent.

**Keywords:** Leishmaniasis; Kinetoplastids; taxonomy; Phylogenetics; Phylogeography, Synapomorphy; Parsimony.

## 1. Introducción

La leishmaniasis comprende un grupo de infecciones parasitarias desatendidas con importancia clínica y amplia diversidad epidemiológica. Estas enfermedades son endémicas en varias regiones del mundo que presentan climas tropicales o subtropicales, incluyendo países de la cuenca mediterránea (Kato et al., 2016). La manifestación clínica de la leishmaniasis puede presentar sintomatología variable con fiebre, anemia, emaciación, hepatoesplenomegalia y supresión de la inmunidad, siendo la destrucción de tejidos con formación de úlceras cutáneas su característica más visible (Ghorbani & Farhoudi, 2017).

A nivel mundial, la leishmaniasis está ubicada entre las diez enfermedades tropicales desatendidas con presencia en 98 países y alrededor de 12 millones de personas infectadas, con un promedio de 1,6 millones de casos nuevos por año (Mouttaki et al., 2014). Se encuentra dentro de las enfermedades tropicales más importantes, debido a la alta morbilidad y mortalidad que la caracterizan, siendo considerada por la Organización Mundial de la Salud como un grave problema de salud pública a nivel mundial (Basmaciyan & Casanova, 2019). De igual manera forma parte del grupo de enfermedades desatendidas que afectan principalmente a las poblaciones más pobres de zonas rurales con un limitado acceso a servicios de salud (Lopez-Oceja et al., 2016). Su presencia está directamente relacionada a la pobreza, pero es influenciada en su epidemiología por factores sociales, ambientales y climáticos (WHO, 2022).

En América Latina existe una gran prevalencia de esta patología, por motivo de la variedad de climas tropicales y subtropicales que posee el continente, condiciones que favorecen el ciclo de vida del insecto vector de la transmisión (Lopez-Oceja et al., 2016). En países como Venezuela, Brasil, Colombia, Perú y Ecuador, se evidencia una alta prevalencia de leishmaniasis que la posiciona entre los principales problemas de salud pública. También es importante señalar que la tasa de incidencia ha incrementado en estos países por el desplazamiento poblacional y factores migratorios, que han generado la invasión del hábitat natural del vector y del ciclo de transmisión enzoótica (Davila et al., 2021).

En las Américas, la leishmaniasis cutánea es endémica en 18 países, con un promedio de aproximadamente 54.000 casos por año siendo la forma más frecuente en la Región y alrededor del 90% de los casos se encuentran asociados con 15 especies de *Leishmania* como agentes causales. Las formas clínicas cutáneas, como la diseminada es principalmente causada por *L. (V.) braziliensis* y la cutánea difusa producida por *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana*, siendo más difíciles de tratar y con recaídas frecuentes. El promedio de casos en la distribución se concentra en el Área Andina con el 43% de los casos, en Brasil con el 37%, en Centroamérica con 18%, con el resto en el Cono Sur, Caribe No Latino y México. De los países endémicos, alrededor del 76% de los casos ocurren en Brasil, Colombia, Nicaragua, y Perú. La forma mucosa, causada con mayor frecuencia por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, y *L. (V.) guyanensis*, representa aproximadamente el 4% de los casos de leishmaniasis cutánea en las Américas y es una forma clínica grave por causar importantes mutilaciones y discapacidades si no se diagnostica y trata a tiempo. La leishmaniasis visceral causada por *L. infantum* es endémica en 13 países de las Américas, con un promedio alrededor de 3.500 casos por año, aunque el 96% de los casos se notifican en Brasil. La proporción de los casos de coinfección VIH-leishmaniasis visceral han ido en aumento a lo largo de los años, alcanzando el 11% en 2019, el porcentaje más alto desde 2012 (Akhoundi et al., 2016; WHO, 2022).

En Ecuador, la leishmaniasis se ha reportado en 21 provincias del país, en las zonas subtropicales de la costa del Pacífico, las zonas tropicales amazónicas y las zonas alto andinas (Kato et al., 2016). La leishmaniasis se considera como una enfermedad endémica en territorio ecuatoriano, de acuerdo con el informe mensual realizado por la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública en el año 2021, se reportaron 1251 casos confirmados, de los cuales 1217 casos (97,2%) corresponden a leishmaniasis cutánea (LC) y 34 (2,7%) casos de leishmaniasis mucocutánea (LMC) que corresponden a siete especies del género *Leishmania* (MSP, 2022).

Las formas de leishmaniasis cutánea y visceral son las más frecuentes en humanos (Kaye et al, 2020). El período de incubación para la leishmaniasis cutánea abarca de una semana a varios meses y está caracterizada por la formación de una lesión primaria única con tendencia a la ulceración en el sitio de picadura del vector. La forma visceral va desde dos a cuatro meses, siendo el resultado de la diseminación de macrófagos infectados a través del sistema reticuloendotelial, con un daño subsiguiente de la médula ósea, el bazo y el hígado, siendo letal si no se recibe el tratamiento de manera inmediata (Ching Chacón et al., 2022). La especie de *Leishmania* condicionará las características clínicas, distribución y frecuencia de la enfermedad. Los factores ambientales y socioeconómicos influirán en los factores individuales del hospedador/reservorio vertebrado y la presencia del vector (Dias-Lopes et al., 2021).

El diagnóstico de la enfermedad puede ser presuntivo o definitivo y, dependerá de las características clínicas asociadas a la patología (Ching Chacón et al., 2022). El diagnóstico puede presentar una alta dificultad, especialmente en zonas endémicas con circulación de varias especies de *Leishmania* que pueden causar lesiones de apariencia muy similar y con presencia de otras enfermedades cutáneas con síntomas clínicos parecidos. Aún en la actualidad, el diagnóstico parasitológico es considerado como el estándar y, cuyo fundamento consiste en la identificación directa de amastigotes en frotis microscópicos y/o cultivo de promastigotes de tejidos infectados. Aunque estas técnicas presentan una elevada especificidad, su sensibilidad es muy baja y demandan demasiado tiempo. Cuando se aíslan promastigotes, se deben usar técnicas adicionales para la caracterización de especies como el análisis de electroforesis de enzimas multilocus consideradas el estándar actual, pero requiere el cultivo masivo de los parásitos. La sensibilidad de todos los métodos de diagnóstico es muy variable, ya que depende del procedimiento de muestreo y las habilidades técnicas del personal que realiza las pruebas (Mouttaki et al., 2014; Sundar & Singh, 2018).

Varias especies de *Leishmania* pueden ocasionar estas enfermedades mediante una vía de transmisión zoonótica por la picadura de mosquitos hembra de los géneros *Phlebotomus* presentes en Europa, Asia y África o del género

*Lutzomyia* originario de América. Los hospedadores y reservorios son animales mamíferos. La transmisión al hombre u otro animal va a depender de la especie de *Leishmania* (Fernández Martínez et al., 2019).

Los parásitos del género *Leishmania* pertenecen al Reino Protista, Clase Kinetoplastea, Subclase Metakinoplastina, Orden Trypanosomatida, Familia Trypanosomatidae, Subfamilia Leishmaniinae y Género *Leishmania* (Akhoundi et al., 2016). La familia Trypanosomatidae comprende un grupo diverso y amplio de parásitos protozoarios pertenecientes a la clase de orden superior Kinetoplástida. Los kinetoplástidos son protozoos flagelados conformados por eucariotas parásitos monofiléticos obligados con un único flagelo y biflagelados de vida libre, caracterizados por presentar una masa única y densa de círculos de ADN extranucleares ensamblados en una estructura en forma de disco conocida como kinetoplasto. Las especies uniflageladas de la familia Trypanosomatidae son las más estudiadas dentro del grupo de kinetoplástidos, en consecuencia, a su importancia médica y a las graves amenazas que representan para la salud pública como agentes causales de enfermedades tropicales desatendidas (NTD, por sus siglas en inglés). La clasificación de los tripanosomátidos ha recibido mayor atención que la de otros kinetoplástidos (Kaufner et al., 2020).

La transmisión de *Leishmania* ocurre en la interfase parásito-vector-hospedador y su éxito depende de un proceso multifactorial dinámico influenciado por los tres. El parásito se introduce en el flebótomo vector a través de su alimentación hematofágica proveniente de un vertebrado infectado. En el flebótomo, los parásitos se desarrollan pasando de fase de amastigotes a promastigotes metacíclicos infecciosos dentro del tracto digestivo. En este punto, el flebótomo es infeccioso y puede transmitir los parásitos. Posteriormente, al alimentarse de otro vertebrado, el parásito es inyectado al torrente sanguíneo, donde en su forma de promastigote infectará nuevos macrófagos y se transformará nuevamente en amastigote. Estudios han demostrado que los factores como la saliva del flebótomo y el gen secretor de promastigotes (PSG), son una parte integral de la transmisión vectorial que facilitan la supervivencia y el establecimiento del parásito en el hospedador. La respuesta inmune del hospedador a la picadura de un flebótomo también contribuye al éxito de la transmisión (Ching Chacón et al., 2022; Serafim et al., 2021; Kaye et al, 2020).

Se han descrito aproximadamente 53 especies de *Leishmania* sin considerar los sinónimos e incluyendo los cinco subgéneros y complejos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *L.enriettii* complex y *Paraleishmania*; de estas, se sabe que 31 especies son parásitos de los mamíferos y 20 especies son patógenas para los seres humanos. (Akhoundi et al., 2016) siendo las principales: *L. (L.) major*, *L. (L.) major-like*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) killikiand*, *L. (L.) aethiopica* que corresponden al complejo de *L.(L.) tropica*; *L. (L.) donovani*, *L. (L.) archibaldi*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi* igual a *L. (L.) infantum* pertenecientes al complejo *L.(L.) donovani*; *L. (L.) amazonensis*, *L.(L.) garnhami*, *L.(L.) mexicana* y *L.(L.) pifanoi* correspondientes al complejo *L.(L.) mexicana*; finalmente *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) shawi* dentro del complejo *L.(V.) braziliensis* (Asato et al., 2009).

El entendimiento de las relaciones evolutivas entre las especies de *Leishmania*, con los vectores y los hospedadores es crucial para la predicción de los patrones de transmisión de *Leishmania*, la epidemiología de la leishmaniasis y el desarrollo de estrategias de intervención y control. Para lograr tal comprensión, se requerirá mejor información sobre la distribución mundial de los parásitos de *Leishmania* en relación con sus vectores y huéspedes intermediarios (Akhoundi et al., 2016).

En el Ecuador, se han reportado casos con las formas clínicas de LC y LMC, sin embargo, la investigación sobre la variabilidad genética de la *Leishmania* en el país es limitada. Utilizando el gen mitocondrial del Citocromo b (Cytb) para determinar la distribución geográfica de las especies de *Leishmania*, se identificaron los agentes causales de leishmaniasis. Los resultados indican que *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis* están ampliamente distribuidas en las áreas subtropicales de la costa del Pacífico y tropical amazónica, respectivamente. Los datos obtenidos también sugieren que los casos de LC causados por *L. (V.) braziliensis* están aumentando en las áreas de la costa del Pacífico. Se confirmaron las distribuciones de *L. (V.) naiffi* y *L. (V.) lainsoni*, ambas identificadas recientemente en la Amazonía ecuatoriana, y se identificó *L.(L.) mexicana* en un área andina, también se ha reportado la presencia de *L.(V.)guyanensis/panamensis*, *L. (L.) amazonensis*, y *L. (L.) major* en algunas regiones del territorio ecuatoriano (Kato et al. 2016; Gómez et al., 2018). Sin embargo, en estos estudios no se profundizó en aspectos ecoepidemiológicos, epidemiología molecular, ni relaciones filogenéticas de las especies.

La elaboración de una matriz de identificación filogenética de la diversidad de especies, utilizando el gen del cytb como marcador genómico para la identificación molecular disponible en NCBI (GenBank) nos permitirá una correcta identificación y el análisis epidemiológico molecular de las especies de *Leishmania* y las formas clínicas de LC y LMC endémicas del país, generará información que se podrá utilizar para el planteamiento de estrategias y políticas sanitarias eficientes y adecuadas, aplicación de tratamientos farmacológicos efectivos para las variedades de *Leishmania*, además de implementar programas de vigilancia epidemiológica efectivos en beneficio de la comunidad más vulnerable dado que el complejo factor geográfico que delimita su existencia, la desigualdad social que padecen, la pobreza económica que actúa como limitante de una reacción rápida ante la aparición de la leishmaniasis y las falencias culturales que en materia preventiva evidencian generalmente los habitantes que la componen. Por lo tanto,

la identificación correcta de las especies de estos parásitos en áreas endémicas será importante tanto para el tratamiento adecuado, el pronóstico y evolución de la enfermedad, así como desarrollo de nuevas estrategias farmacoterapéuticas.

La hipótesis planteada indica que existe una marcada estructura filogenética de las especies de *Leishmania* con base en *cytb* del ADNmt correlacionada con su identificación taxonómica fenotípica y patrones ecoepidemiológicos, mientras que las especies presentes en Ecuador muestran un patrón de distribución relacionado con la región andina y amazónica del continente.

El objetivo de nuestro estudio se enfocó en inferir las estructuras filogenéticas y filogeográficas de especies de *Leishmania* presentes en Ecuador empleando secuencias del gen *cytb* del ADN mitocondrial (mt) para determinar correlaciones taxonómicas, epidemiológicas, evolutivas y geográficas. De esta forma generar una plataforma confiable de identificación molecular que deberá ser validada con muestras de campo y cultivos de laboratorio.

## 2. Materiales y Métodos.

### 2.1 Citocromo b mitocondrial (*cytb*) como marcador genético para análisis e identificación de *Leishmanias*

Se seleccionó el gen de Citocromo B mitocondrial (*cytb*), gen que interviene en el ciclo de respiración celular. La *cytb* es la principal subunidad catalítica redox de Quinol que participa en el proceso de transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. Se considera uno de los genes más funcionales y frecuentes para estudios filogenéticos, forenses, de biodiversidad e identificación de especies de *Leishmania*, ya que proporciona una reconstrucción precisa de la filogenia en los niveles de Superorden, Orden y Familia (Lopez-Oceja et al., 2016; Mohammadpour et al., 2019; Dávila et al., 2021).

### 2.2 Muestreo y construcción de datos y matrices de secuencias

Se utilizó la base de datos del National Center for Bioinformatic Information (NCBI) o GeneBank para la búsqueda y muestreo de las secuencias del gen de Citocromo b mitocondrial (*cytb*) disponibles para las especies representativas de *Leishmania*. Se seleccionaron entre 1 a 5 secuencias por especie acorde a la disponibilidad en GeneBank con un tamaño entre 500 a 1100 pb para 29 especies de *Leishmania* con importancia clínica y epidemiológica para el hombre. Las secuencias seleccionadas provienen de América, Europa y Asia. Se incluyeron dos especies del género de *Endotrypanum* como grupos hermanos de referencia de acuerdo a REF. Dos especies/secuencias de *Trypanosoma* (*T. cruzi* y *T. rangeli*) como grupos externos de comparación para el enraizamiento del análisis filogenético fueron incluidas en la matriz. Todas las secuencias se descargaron en formato FASTA para el análisis posterior.

Un total de 96 secuencias del gen de Citocromo b mitocondrial (*cytb*) se seleccionaron para el presente estudio. La información detallada de las secuencias seleccionadas se encuentra en el Anexo 1.

### 2.3 Alineamiento de secuencias

El alineamiento de las secuencias del *cytb* mitocondrial tanto de las especies de *Leishmania*, *Endotrypanum* como de los grupos externos *Trypanosoma* se llevó a cabo con el software MEGA-11, con la finalidad de construir una matriz de homología posicional de las secuencias con un tamaño de 96 secuencias x 714 pb. Se ejecutó un alineamiento múltiple aplicando el algoritmo de CLUSTAL-W con un gap opening penalty de 15.00 y un gap extensión penalty de 10.00 buscando obtener una matriz de mayor homología. Se realizaron cortes de 30 bases al inicio y 28 bases al final del alineamiento para evitar ruidos por la longitud diferencial de las secuencias del GeneBank.

### 2.4 Análisis Filogenético

Los análisis filogenéticos fueron realizados usando el programa MEGA. Se utilizó el método de optimización de parsimonia máxima (MP), con 1000 réplicas de adición al azar y el algoritmo TBR de recorte y reconexión de ramas para obtener los árboles óptimos de islas de árboles y se calcularon los índices de sinapomorfias y homoplasias presentes como el Índice de Consistencia (IC) e Índice de Retención (IR). A posteriori se realizaron 1000 pseudoréplicas de remuestreo de la matriz mediante bootstrapping (Felsenstein 1985) y por cada 10 réplicas de adición al azar, para evaluar la robustez o apoyo de cada nodo, clado, grupos y taxa. Los valores con base en un 100% de valor de bootstrapping se muestran en la base de las ramas. (Figura 1).

### 3. Resultados

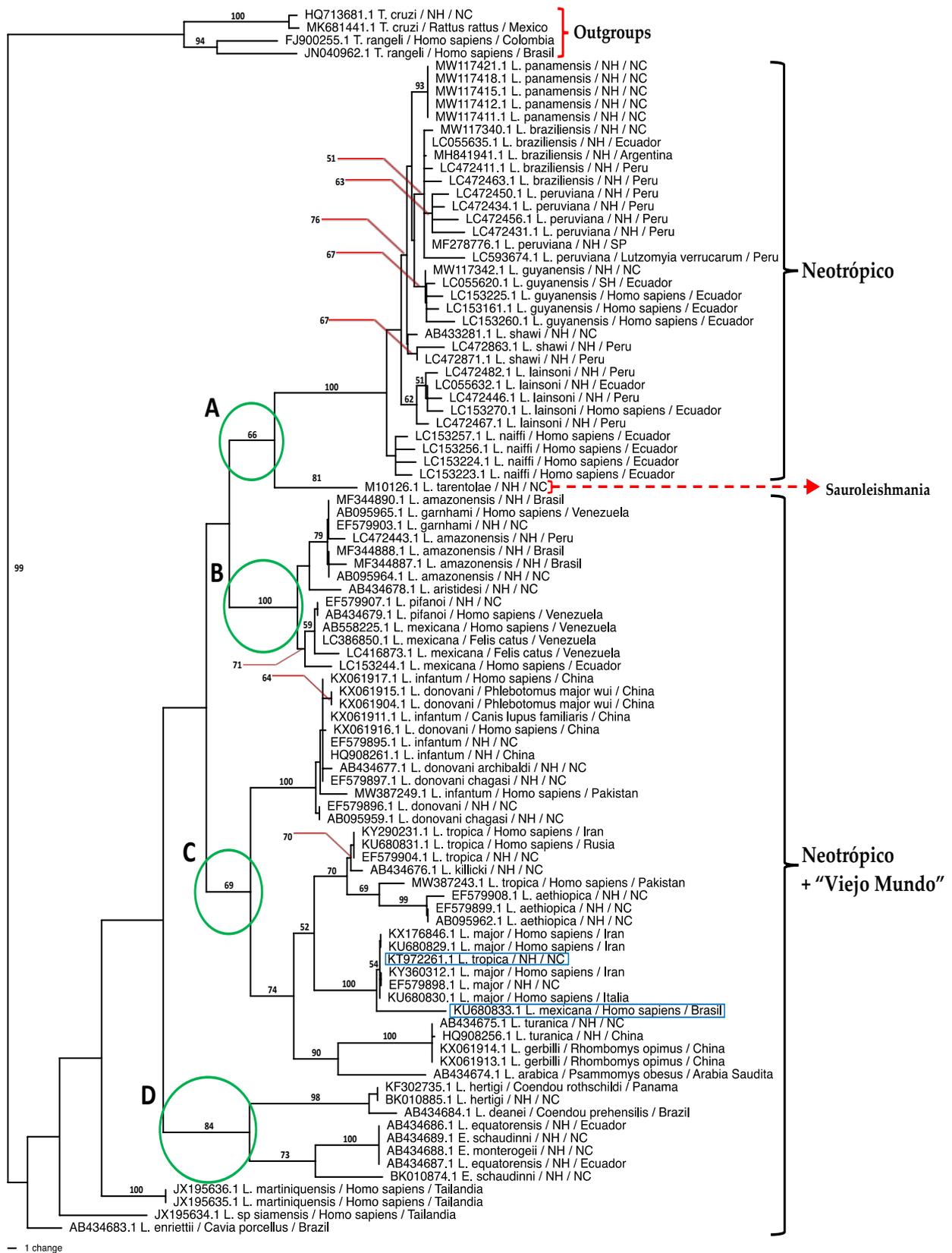
#### 3.1. Análisis Filogenético e identificación molecular de *Leishmania* spp.

Se obtuvo una matriz alineada de 96 secuencias con 714 caracteres totales (pares de bases) del gen *cytb* mitocondrial (96 x 714), Del total de los caracteres obtenidos, 254 fueron informativos para parsimonia, 382 fueron constantes (sin variación) y 78 fueron variables. La longitud del árbol más parsimonioso fue igual a 992 pasos. El índice de consistencia (IC) fue de 0,50; mientras que el índice de retención (IR) fue de 0,88 para todos los sitios informativos de parsimonia. Aunque la consistencia del árbol es baja, la retención es muy buena, ya que implicaría un 88 % de sinapomorfias verdaderas. El porcentaje de apoyo de grupos monofiléticos por Bootstrap se muestra junto a las ramas (Figura A1).

En la Figura A1, los grupos externos *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* fueron enraizados en la parte superior del árbol en el clado más externo. Las especies de *Leishmania* forman un clado monofilético interno del árbol con un 99 % de bootstrap y se agrupan en tres categorías considerando la región de origen. El Grupo Neotrópico se formó por dos ramas (A y B) que incluyeron todas las *Leishmanias* originarias de la ecozona terrestre que abarca el continente Americano, en la rama externa A con un 66 % de bootstrap se ubicaron *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (V.) naiffi*, en la rama interna B con 100 % de bootstrap se agruparon *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) aristidesi*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) donovani chagasi* y *L. (L.) donovani archibaldi*. En el caso de la secuencia M10126.1 de *L. tarentolae*, se ubico entre las ramas A y B del grupo Neotrópico y se encuentra más próxima a las especies de *Leishmania* de la rama A, apoyada por un bootstrap de 81 % de lo cual se puede inferir que esta emparentada con dichas especies y el aislado proviene de América.

En el Grupo “Viejo Mundo” se ubicaron dentro de la rama interna C apoyada con un bootstrap de 69 %, las especies de *Leishmania* provenientes de países pertenecientes a Asia y Europa entre ellas *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) killicki*, *L. (L.) turanica*, *L. (L.) gerbilli* y *L. (L.) arabica*. La secuencia EF579897.1 identificada como *L. donovani chagasi* por Foulet et al., 2007 se alineó entre las especies de *Leishmania* asociadas al Viejo Mundo, pero se puede establecer que la muestra analizada es procedente de Brazil y no corresponde a *L. donovani chagasi*. La secuencia KU680833.1 identificada como *L. mexicana* se alineó próxima al clado de *L. major* del grupo del Viejo Mundo.

El Grupo “*Leishmania*” + *Endotrypanum* lo formó la rama interna D apoyada por un bootstrap de 84 % donde se agruparon otras especies del continente americano como *L. (L.) hertigi*, *L. (L.) deanei*, *L. (L.) equatorensis* e incluye también a *Endotrypanum monterogeii* y *Endotrypanum schaudinni*; *L. (L.) martiniquensis*, *L. (L.) p. siamensis* provenientes de Asia y *L. (L.) enriettii* originaria de Brazil se ubicaron en las ramas más externas del árbol y también forman parte de este grupo. Cabe mencionar que dentro de los 3 grupos, se encontraron especies de *Leishmanias* cuyo país de origen (NC) y hospedador (NH) no pudieron ser identificados.



**Figura A1.** Árbol filogenético obtenido del análisis de 96 secuencias del gen *cytb* inferido mediante el método de Máxima Parsimonia (MP) para la identificación de especies de *Leishmania*. Los valores de apoyo estadístico de cada clado se determinaron aplicando Bootstrap de 1.000 pseudoréplicas. Grupos externos (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) están enraizados en la parte basal del árbol. Se clasificaron las especies de *Leishmania* y *Endotrypanum* en relación al país de origen en 3 grupos (**Neotrópico**: América; **"Viejo Mundo"**: Asia y Europa; **"Leishmania" (?) + Endotrypanum**). El árbol filogenético fue generado usando el Software MEGA-11.

En la Figura A2, el árbol de Máxima Parsimonia fue obtenido del consenso de mayoría de 14 árboles parsimoniosos con 100 % para todos los clados, el clado más externo ubicado en el extremo superior del árbol se formó por los grupos externos de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, se observó que las especies de *Leishmania* se agruparon en 11 clados principales; El clado V correspondió al Complejo Viannia (V) cuyas especies se asocian a la infección por Leishmaniasis mucocutánea (LMC) en humanos y que agrupó al subclado más externo V1 donde se encontró *L. (V.) naiffi*; El subclado más próximo a V1 fue V2 que correspondió a *L. (V.) lainsoni*; En el subclado V3 se encontró *L. (V.) shawi*; El subclado V4 agrupó a las especies de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) peruviana* emparentadas entre sí y el subclado V5 fue representado por *L. (V.) panamensis*. Se observó también que *L. tarentolae*, una especie identificada como *Sauroleishmania* cuyos hospedadores son varias clases de reptiles, se encontró muy emparentada con las especies del Complejo Viannia.

El Complejo Mexicana (Mx) asociado a la infección por Leishmaniasis Cutánea (LC) en humanos correspondió al clado Mx que incluyó el subclado Mx1 donde se encontraron *L. (L.) mexicana*, próximo al subclado Mx2 de *L. (L.) pifanoi* y el subclado Mx3 de *L. (L.) aristidesi*. Finalmente, el subclado más interno correspondió a Mx4 que agrupó a *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) garnhami*. El Complejo Viannia y el Complejo Mexicana, incluida la *Sauroleishmania L. tarentolae* conforman las especies de *Leishmania* del Grupo Neotrópico (América).

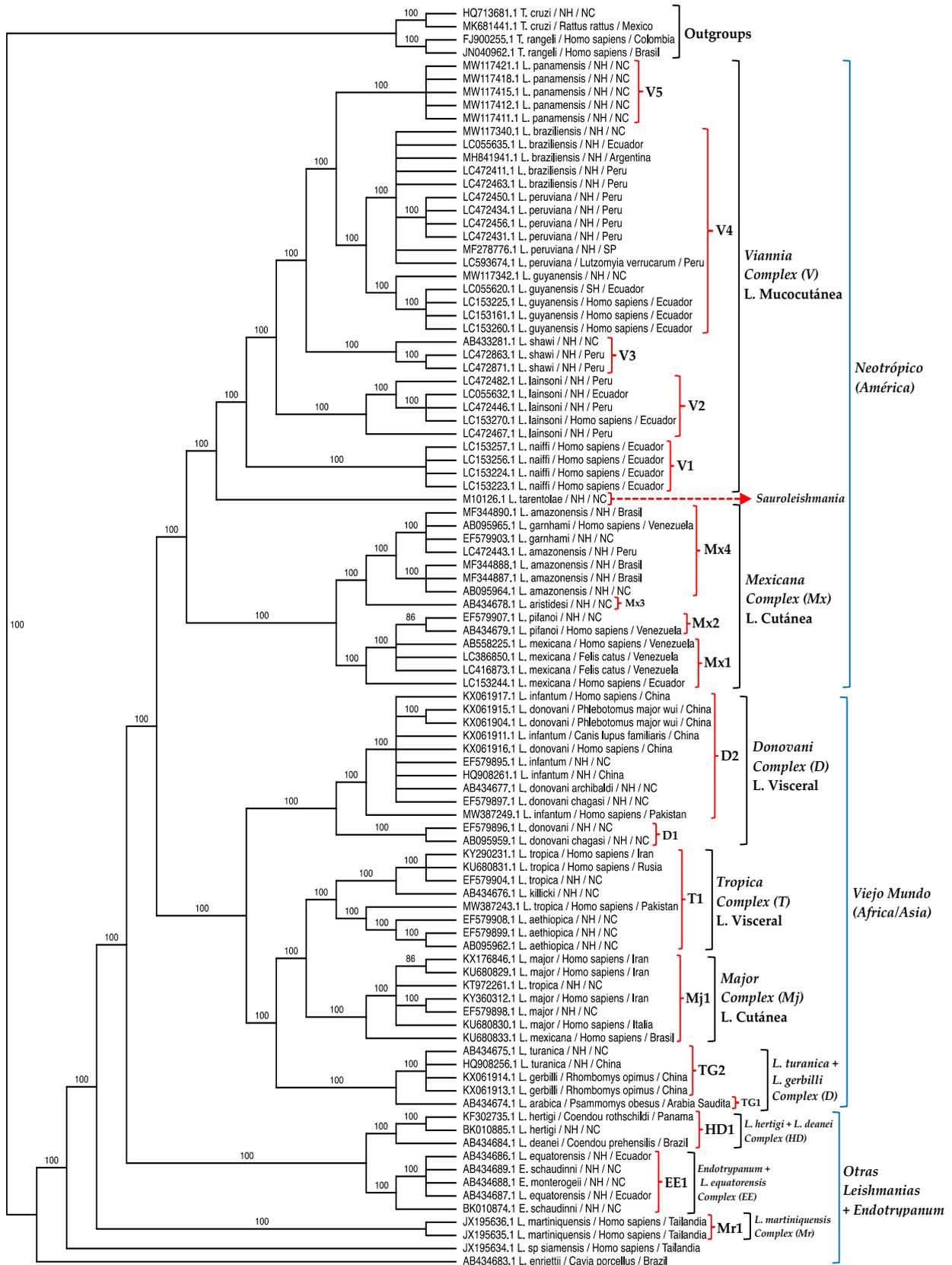
Las especies de *Leishmania* responsables de la infección con Leishmaniasis Visceral (LV) en humanos se agruparon en los clados D y T. El clado D correspondió al Complejo Donovanian (D); Este clado se formó por 2 subclados, el más externo D1 que lo conformaron una secuencia de *L. (L.) donovani* y *L. (L.) donovani/chagasi*, el subclado interno D2 incluyó las secuencias de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*. El clado T incluyó las especies del Complejo Tropica (T) al que correspondieron *L. (L.) tropica*, *L. (L.) killicki* y *L. (L.) aethiopica*.

El Complejo Mayor (Mj) asociado con la infección por Leishmaniasis Cutánea (LC) en humanos fue identificado por el clado Mj1 donde se encontró *L. (L.) major*, pero cabe señalar que dentro de este grupo se incluyeron la secuencia KT97226.1 y KU680833.1 identificadas como *L. (L.) tropica* y *L. (L.) mexicana* respectivamente, es posible que estas 2 secuencias correspondan a una identificación errada dentro del estudio realizado por Asato et al., 2009.

Se estableció el Complejo *L. turanica* + *L. gerbilli* (TG), formado por el subclado externo TG1 que incluyó solo a *L. (L.) arabica* y el subclado interno TG2 donde se ubicaron *L. (L.) turanica* y *L. (L.) gerbilli*. Los Complejos Donovanian (D), Tropica (T), Mayor (Mj) y *L. turanica* + *L. gerbilli* (TG) componen el Grupo Viejo Mundo que incluye a las especies de *Leishmania* originarias de África/Asia y Europa.

El Grupo definido como Otras *Leishmania* + *Endotrypanum* que incluyó las especies provenientes de América y Asia se conformó por el Complejo *L. hertigi* + *L. deanei* (HD) formado por el subclado HD1 que incluyó las especies *L. (L.) hertigi* y *L. (L.) deanei* originarias de países americanos. Las especies de *Endotrypanum monterogeii* y *Endotrypanum schaudinni* se ubicaron dentro del subclado EE1 conjuntamente con *L. (L.) equatorensis* originarias de Ecuador para formar el Complejo *Endotrypanum* + *L. equatorensis* (EE). El Complejo *L. martiniquensis* (Mr) se formó por el subclado Mr1 que agrupó a las secuencias de *L. (L.) martiniquensis* originarias de Tailandia. Finalmente, las 2 ramas más externas que se formaron en la base del árbol correspondieron a la secuencia de *L. (L.) p. siamensis* proveniente de Tailandia y *L. (L.) enriettii* de Brazil, que constituyeron dos clados independientes.

Majority-rule consensus tree



**Figura A2.** Árbol filogenético de consenso de mayoría obtenido del análisis de 96 secuencias del gen *cytb* inferido mediante el método de Máxima Parsimonia (MP) para la identificación de especies de *Leishmania*. Grupos externos (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) están enraizados en la parte superior del árbol. Posición subsecuente de cada especie de *Leishmania* y *Endotrypanum* en relación con el Complejo al que pertenecen, el tipo de Leishmaniasis que ocasionan y la Región de origen. El árbol filogenético fue generado usando el Software MEGA-11.

#### 4. Discusión

El estudio realizado por Asato et al., 2008 sugiere que el análisis filogenético del género *Leishmania* empleando el gen Cyt b es suficiente para diferenciar entre especies y subespecies de este género, ya que permite establecer sus relaciones filogenéticas. Por lo tanto mediante nuestro estudio se pretende evaluar más específicamente las relaciones filogenéticas entre especies y subespecies con el empleo del Cytb, un gen que posibilita la individualización e identificación a nivel de especie y complejos de alrededor de 13 especies de leishmanias patógenas para humanos que representan los agentes causales más comunes de leishmaniasis en el Nuevo Mundo y el Viejo Mundo (Foulet et al., 2007).

De la inferencia filogenética usando el gen Cyt b, las 96 secuencias analizadas claramente se agruparon dentro de los dos árboles de MP en 3 categorías acordes al origen geográfico de las secuencias (Figura A1, Figura A2), el 50 % de las secuencias pertenecientes al Complejo Viannia (V) y Complejo Mexicana (Mx) y consideradas como patógenos responsables de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea se agruparon dentro del grupo Neotrópico en concordancia con lo reportado por Kato et al., 2016, Kato et al., 2019 y Dávila et al., 2021, sin embargo en este grupo también se incluyó la secuencia M10126.1 de *L. tarentolae* que conforma el género sauroleishmania, De acuerdo con Akhouni et al., 2016, las leishmanias que infectan a los lagartos estaban presentes en los flebotomos primitivos durante el período Mesozoico y los mamíferos infectados fueron separados por el movimiento de las placas continentales durante esa era geológica, por lo cual sauroleishmania se desarrolló solo en el Viejo Mundo, ya que los flebotomos vectores para estos parásitos están estrictamente presentes en el Viejo Mundo, pero nuestro estudio sugiere la discrepancia de la ubicación de *L. tarentolae* la cual formó un grupo monofilético bien soportado estando muy emparentada con las especies del Complejo Viannia en concordancia con lo indicado por Luyo-Acero et al., 2004 y Asato et al., 2008, además *L. tarentolae* y las especies del Complejo Viannia pertenecen al linaje filogenético Euleishmania (Akhouni et al., 2016) lo cual fortalece la relación filogenética entre estos grupos obtenida como resultado de nuestro estudio.

Nuestros árboles revelaron que tanto *L. (L.) garnhami* y *L. (L.) aristidesi* se incluyeron dentro del Complejo Mexicana, *L. (L.) garnhami* se encuentra muy emparentada con *L. (L.) amazonensis*, especies reportadas como patógenas para los seres humanos (Asato et al., 2008), mientras que *L. (L.) aristidesi* se separa tempranamente de estas especies en concordancia con lo reportado en los árboles de Asato et al., 2008 y Leelayoova et al., 2013. La divergencia filogenética de *L. (L.) aristidesi*, especie que fue aislada de varios roedores originarios de Panamá, con las otras especies del Complejo Mexicana puede verse influenciada por factores genéticos que difieren entre patógenos humanos (Asato et al., 2008).

El 30 % de las secuencias que comprenden el Complejo Donovanii (D), Complejo Tropica (T) y complejo Mayor (Mj) se ubicaron en el grupo Viejo Mundo, las especies del Complejo Donovanii también se ubican en el linaje Euleishmania (Akhouni et al., 2016). En nuestro estudio dentro del grupo Viejo Mundo resalta la formación del Complejo *L. turanica* + *L. gerbilli* (TG) donde se encuentran *L. (L.) arabica*, *L. (L.) turanica* y *L. (L.) gerbilli* muy emparentadas con las especies de los complejos mencionados y principalmente cercanas al complejo Mayor, se ha informado que *L. (L.) turanica* y *L. (L.) arabica* son especies patógenas no humanas debido a que no se han reportado casos de infecciones en humanos (Asato et al., 2008). La inclusión de *L. (L.) gerbilli* dentro del Complejo TG sugiere que esta emparentada con estas especies posiblemente por el mamífero hospedador del patógeno siendo este un roedor denominado gran jerbo (*Rhombomys opimus*) originario de China en tanto que *L. (L.) turanica* se aisló en gerbos de Uzbekistan y *L. (L.) arabica* se identificó en el roedor *Psammomys obesus* de Arabia (Asato et al., 2008). La divergencia de estas especies con los otros complejos del grupo Viejo Mundo dentro de los árboles de MP diseñados implicaría su utilidad para aplicar un diagnóstico diferencial entre las especies de *Leishmania* patógenas para los humanos de las que no lo son.

Se evidencia también que las secuencias KT97226.1 y KU680833.1 identificadas como *L. (L.) tropica* y *L. (L.) mexicana* respectivamente en el estudio de Asato et al., 2008 en nuestros árboles de MP se ubicaron dentro del Complejo Mayor lo que sugiere una identificación errónea, ya que en el caso de *L. (L.) tropica* forma un clado separado del Complejo Mayor dentro del grupo Viejo Mundo en tanto que el clado de *L. (L.) mexicana* no tiene relación aparente con el Complejo Mayor y se ubica dentro del grupo Neotrópico. Dentro del Complejo Tropica se ubicó *L. (L.) killicki*, cercana al clado de *L. (L.) tropica* lo que sugiere que esta estrechamente relacionada con esta especie en concordancia con lo reportado por Asato et al., 2008.

El 12 % de las secuencias restantes empleadas en el estudio formaron el grupo denominado "*Leishmania*" + Endotrypanum dentro del cual se encuentra el Complejo *L. hertigi* + *L. deanei* (HD), Asato et al., 2008 en su estudio indican que las especies *L. hertigi* y *L. deanei* son distintos de todas las especies estudiadas de *Leishmania*, pero están estrechamente relacionados con el género *Endotrypanum* lo cual concuerda con nuestro estudio, sin embargo actualmente aun persiste la controversia sobre la inclusión de estas especies en el género *Leishmania*. En nuestro estudio tampoco se pudo diferenciar a *L. (L.) equatorensis* de las especies del género *Endotrypanum* (*Endotrypanum monterogei* y *Endotrypanum schaudinni*), todas estas secuencias formaron el Complejo *Endotrypanum* + *L.*

*equatorensis* (EE) lo que sugiere que *L. (L.) equatorensis* esta filogenéticamente emparentada con *Endotrypanum*, estos resultados concuerdan con lo informado por Asato et al., 2008 quien recomienda se profundice en los estudios sobre el género *Endotrypanum* por la insuficiente información existente mientras que Akhoundi et al., 2016 indica que en el género *Endotrypanum*, de los cultivos in vitro de los perezosos, sus promastigotes no se pueden distinguir de los promastigotes de *Leishmania* por lo cual constituye un clado diferente.

En el árbol de MP dentro del grupo “*Leishmania*” + *Endotrypanum* se formó el Complejo Martiniquensis (Mr) con las 2 secuencias incluidas para el análisis de *L. (L.) martiniquensis* provenientes de Tailandia depositadas en GenkBank, con base al análisis este clado se encuentra muy próximo a la rama monofilética bien definida formada por *L. (L.) p. siamensis*, además tanto *L. (L.) p. siamensis* y *L. (L.) enriettii* forman dos clados cercanos independientes emparentados entre si, reubicando la posición filogenética de *L. (L.) enriettii* al compararla con lo reportado en un árbol previo por Asato et al., 2008, este resultado concuerda con lo informado por Leelayoova et al., 2013 que manifestaron que estas especies podrían constituir otro subgénero no clasificado de *Leishmania*, en el caso de *L. (L.) enriettii*, dentro de nuestro estudio, esta especie se separa tempranamente del resto de los grupos en nuestros árboles de MP ubicándose muy cercano al género *Endotrypanum* debido al misterio que envolvía a su único hospedador mamífero identificado el cerdo, *Cavia porcellus* y sin reportarse infecciones en humanos (Asato et al., 2008). De acuerdo con lo reportado por Akhoundi et al., 2016, *L. (L.) enriettii* aislado de cobayos domésticos y *L. (L.) martiniquensis* descrito en enfermedades humanas constituyen un grupo monofilético bien soportado que probablemente represente un nuevo subgénero perteneciente al grupo *Euleishmania* y separándose claramente del grupo *Paraleishmania* en tanto que *L. (L.) p. siamensis* es un nombre sin validez taxonómica pero no pueden ser clasificados en ningún Complejo, en nuestro estudio la ubicación del taxon de *L. (L.) p. siamensis* proporciona información más amplia sobre la especie y su correlación con las otras especies del género *Leishmania*, sin embargo se requiere profundizar en estudios sobre esta especie para una mayor claridad en su filogenia.

El método usado para el análisis del gen Cytb, molécula que participa activamente en el proceso de transporte de electrones puede emplearse en el estudio filogenético del género *Leishmania* en calidad de marcador molecular de este patógeno (Dávila et al., 2021), adicionalmente, la matriz diseñada demostró ser exitosa para diferenciar entre las especies del Nuevo Mundo y Viejo Mundo y puede ser útil para separar las especies de *Leishmania* patógenas para el humano de las especies no patógenas, ya que difieren entre si en el estudio realizado

En el Ecuador se han realizado algunos estudios sobre la epidemiología de la leishmaniasis y la filogenética de las especies de *Leishmania* que la originan, estas especies de parásitos estudiados han provenido principalmente de las áreas andinas y selváticas del país, siendo las especies del Complejo Viannia: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*, cuya presencia predomina en la costa del Pacífico, *L. (V.) naiffi* y *L. (V.) lainsoni* son comunes en la zona amazónica y en el área Andina se ha identificado *L. (L.) mexicana* (Kato et al., 2016), el patrón de distribución de las especies de *Leishmania* en el Ecuador empleadas en nuestro estudio se relaciona con lo reportado en la región andina (Kato et al., 2019 y Dávila et al., 2021), sin embargo existen especies de *Leishmania* en el territorio ecuatoriano que aun necesitan ser investigadas. Dichas investigaciones complementarán el conocimiento previo sobre su taxonomía, la distribución geográfica, las características de la enfermedad, el diagnóstico clínico, los ciclos de distribución, los reservorios y vectores de propagación y la epidemiología de los tipos de leishmaniasis con la finalidad de fortalecer la vigilancia sanitaria.

## 5. Conclusiones

La matriz diseñada mediante el empleo de secuencias del gen Cyt b de *Leishmania* analizadas filogenéticamente aplicando el análisis Máxima Parsimonia (MP), demostró ser efectiva para estudiar las estructuras filogenéticas, filogeográficas y el tropismo de las especies de *Leishmania* originarias de diversas zonas geográficas del planeta con la formación de clados fuertemente apoyados que generaron árboles en los cuales se evidenció una clara separación entre especies y subespecies de *Leishmania* agrupadas en Complejos bien definidos acorde a sus características ancestrales y derivadas que facilitarían la identificación molecular correcta y las correlaciones genotipo-fenotipo.

Nuestro estudio demostró la utilidad del gen Cyt b en calidad de marcador molecular para el análisis filogenético de *Leishmania*, ya que además de diferenciar entre especies, subespecies y Complejos, el gen Cyt b permitió distinguir entre especies originarias del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo en función de sus correlaciones evolutivas, geográficas y taxonómicas, adicionalmente el gen demostró ser útil para discriminar entre las especies de *Leishmania* patógenas y no patógenas para el hombre con lo cual la matriz puede ser empleada como apoyo en el diagnóstico clínico de Leishmaniasis y con lo cual nuestra clasificación se ve mejorada en comparación a la tradicional, sin embargo también se evidencia una parafilia entre *Leishmania* y *Endotrypanum* con lo cual demuestra la necesidad de una propuesta de modificación de clasificación de estos dos taxones como: a) un solo clado monofilético (*Leishmania*) o b) separar aquellas especies de *Leishmania* del clado basal e incluirlas como género *Endotrypanum*. Esto requerirá de un análisis de revisión a mayor profundidad de la historia taxonómica de ambos taxones y sus características fenotípicas de diversa índole (morfología, cultivos, hospedadores, ciclos, posibles vectores, etc).

Los árboles obtenidos evidenciaron que la clasificación y distribución de las especies de *Leishmania* analizadas en el estudio concuerda con lo informado en investigaciones previas, por lo cual se puede inferir que las especies de *Leishmania* que circulan en el Ecuador presentan un patrón de distribución geográfica que guarda relación con lo descrito para la costa del Pacífico, la región andina y amazónica del continente, ya que las principales especies reportadas en el país como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (L.) mexicana* asociadas a la leishmaniasis cutánea y mucocutánea, se ubicaron dentro del grupo Neotrópico o Nuevo Mundo, pero es necesario profundizar en las investigaciones sobre este patógeno en el Ecuador para tener una mejor visión de su distribución, correlación patógeno-vector-hospedador y factores de patogenicidad para un mejor diagnóstico y tratamiento en pro de mejorar la calidad de vida de la población afectada por *Leishmania*.

**Contribución de los Autores:** “Conceptualización, JCN. y LSH.; metodología, LSH.; software, JCN.; validación, JCN. y LSH.; análisis formal, JCN. y LSH.; recursos, JCN.; curaduría de data, LSH.; escritura—preparación del borrador o draft original, LSH.; escritura—revisión y edición, LSH. y JCN.; visualización final, JCN. y LSH.; supervisión, JCN.; administración y gestión de proyecto, JCN.; adquisición de fondos, JCN. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.”

**Financiamiento/Fondos:** Esta investigación fue financiada por el proyecto DII-UISEK-P011617\_2” (JCN, JRR).

**Conflictos de Interés:** Los autores declaran no tener conflicto de interés.

#### Referencias citadas:

1. Kaufer, A., Stark, D., & Ellis, J. (2020). A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 50, Issues 6–7, pp. 449–460). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.003>
2. 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844>
3. Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2017). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. *Drug design, development and therapy*, 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>
4. Fernández Martínez, B., Gómez Barroso, D., & Cano Portero, R. (2019). Instituto de Salud Carlos III LOS CASOS NOTIFICADOS A LA RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DESDE 2005 A 2017 Y RESULTADOS DE LA VIGILANCIA DE 2014 A 2017. 27, 15.
5. Sundar, S., & Singh, O. P. (2018). Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. In *Molecular Diagnosis and Therapy* (Vol. 22, Issue 4, pp. 443–457). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0343-y>
6. Dias-Lopes, G., Zabala-Peñañiel, A., de Albuquerque-Melo, B. C., Souza-Silva, F., Menaguali do Canto, L., Cysne-Finkelstein, L., & Alves, C. R. (2021). Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies. In *Acta Tropica* (Vol. 220). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105956>
7. Ching Chacón, A., Villalobos Romero, B., & Jiménez Vargas, M. F. (2022). Leishmaniasis: evaluación clínica y diagnóstico. *Revista Médica Sinergia*, 7(4), e781. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i4.781>
8. Kaye, P. M., Cruz, I., Picado, A., Van Boclaer, K., & Croft, S. L. (2020). Leishmaniasis immunopathology-impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *Seminars in immunopathology*, 42(3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00788-y>
9. Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Borragan, S., Jiménez-Moreno, S., & de Pancorbo, M. M. (2016). New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 23, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.001>
10. Mouttaki, T., Morales-Yuste, M., Merino-Espinosa, G., Chiheb, S., Fellah, H., Martin-Sanchez, J., & Riyad, M. (2014). Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-420>
11. Davila, M., Pineda, V., Calzada, J. E., Saldaña, A., & Samudio, F. (2021). Evaluation of cytochrome b sequence to identify *Leishmania* species and variants: The case of Panama. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1). <https://doi.org/10.1590/0074-02760200572>

12. 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. In PLoS Neglected Tropical Diseases (Vol. 10, Issue 3). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
13. Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. v., Dey, R., Kissinger, R., Valenzuela, J. G., Oliveira, F., & Kamhawi, S. (2021). Leishmaniasis: the act of transmission. In Trends in Parasitology (Vol. 37, Issue 11, pp. 976–987). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.003>
14. Basmacıyan, L., & Casanova, M. (2019). La mort cellulaire chez *Leishmania*. In Parasite (Paris, France) (Vol. 26, p. 71). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>
15. Gomez, E. A., Kato, H., Torres-Romero, E. X., Velez, L. N., Villegas, N. v., Martillo, V. P., Zambrano, F. C., Kubo, M., Hashiguchi, K., & Hashiguchi, Y. (2018). Leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in north-central Pacific region of Ecuador: A clinico-epidemiological feature. *Acta Tropica*, 185, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.016>
16. 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>
17. Mohammadpour, I., Hatam, G. R., Handjani, F., Bozorg-Ghalati, F., Pourkamal, D., & Motazedian, M. H. (2019). *Leishmania* cytochrome b gene sequence polymorphisms in southern Iran: Relationships with different cutaneous clinical manifestations. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3667-7>
18. Davila, M., Pineda, V., Calzada, J. E., Saldaña, A., & Samudio, F. (2021). Evaluation of cytochrome b sequence to identify *Leishmania* species and variants: The case of Panama. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1). <https://doi.org/10.1590/0074-02760200572>
19. Pan American Health Organization. Guideline for the treatment of leishmaniasis in the Americas. Second edition. Washington, DC: PAHO; 2022. Available from: <https://doi.org/10.37774/9789275125038>.
20. Ministerio de Salud Pública del Ecuador,. (s. f.). Gacetas Vectoriales 2022. MSP. Recuperado 20 de noviembre de 2022, de: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/11/Gaceta-SE-41.pdf>
21. Foulet, F., Botterel, F., Buffet, P., Morizot, G., Rivollet, D., Deniau, M., Pratlong, F., Costa, J. M., & Bretagne, S. (2007). Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2110–2115. <https://doi.org/10.1128/JCM.02555-06>
22. Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Hitakarun, A., Kato, H., Tan-Ariya, P., Siriyasatien, P., Osatakul, S., & Mungthin, M. (2013). Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-60>
23. 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>

## Anexo 1

**Tabla 1.** Lista de especies/secuencias empleadas en el análisis.

Nro.	CÓDIGO	ESPECIE	TAMAÑO (PB)	HOSPEDADOR	PAÍS	Tipo de leishmaniasis
1	EF579908.1	<i>Leishmania aethiopica</i>	872	NH	NC	LV
2	EF579899.1	<i>Leishmania aethiopica</i>	872	NH	NC	LV
3	AB095962.1	<i>Leishmania aethiopica</i>	1080	NH	NC	LV
4	MF344890.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	730	NH	Brazil	LC
5	MF344888.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	730	NH	Brazil	LC
6	MF344887.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	730	NH	Brazil	LC
7	LC472443.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	817	NH	Perú	LC
8	AB095964.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	1078	NH	NC	LC
9	AB434678.1	<i>Leishmania aristidesi</i>	1078	NH	NC	LC

10	MW117340.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	811	NH	NC	LMC
11	LC055635.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	817	NH	Ecuador	LMC
12	MH841941.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	817	NH	Argentina	LMC
13	LC472411.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	817	NH	Perú	LMC
14	LC472463.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	817	NH	Perú	LMC
15	KX061915.1	<i>Leishmania donovani</i>	807	<i>Phlebotomus major wui</i>	China	LV
16	KX061904.1	<i>Leishmania donovani</i>	811	<i>Phlebotomus major wui</i>	China	LV
17	KX061916.1	<i>Leishmania donovani</i>	833	<i>Homo sapiens</i>	China	LV
18	EF579896.1	<i>Leishmania donovani</i>	872	NH	NC	LV
19	AB095959.1	<i>Leishmania donovani chagasi</i>	1080	NH	NC	LV
20	EF579897.1	<i>Leishmania donovani chagasi</i>	872	NH	NC	LV
21	KX061914.1	<i>Leishmania gerbilli</i>	772	<i>Rhombomys opimus</i>	China	ND
22	KX061913.1	<i>Leishmania gerbilli</i>	819	<i>Rhombomys opimus</i>	China	ND
23	MW117342.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	811	NH	NC	LMC
24	LC055620.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	817	NH	Ecuador	LMC
25	LC153225.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
26	LC153161.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
27	LC153260.1	<i>Leishmania guyanensis</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
28	KX061917.1	<i>Leishmania infantum</i>	800	<i>Homo sapiens</i>	China	LV
29	MW387249.1	<i>Leishmania infantum</i>	803	<i>Homo sapiens</i>	Pakistan	LV
30	KX061911.1	<i>Leishmania infantum</i>	825	<i>Canis lupus familiaris</i>	China	LV
31	EF579895.1	<i>Leishmania infantum</i>	872	NH	NC	LV
32	HQ908261.1	<i>Leishmania infantum</i>	1079	NH	China	LV
33	AB434676.1	<i>Leishmania killicki</i>	1080	NH	NC	LV
34	LC472482.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	817	NH	Perú	LMC
35	LC055632.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	817	NH	Ecuador	LMC
36	LC472446.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	817	NH	Perú	LMC
37	LC153270.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
38	LC472467.1	<i>Leishmania lainsoni</i>	817	NH	Perú	LMC
39	KX176846.1	<i>Leishmania major</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Iran	LC
40	KY360312.1	<i>Leishmania major</i>	840	<i>Homo sapiens</i>	Iran	LC
41	KU680830.1	<i>Leishmania major</i>	866	<i>Homo sapiens</i>	Italia	LC
42	KU680829.1	<i>Leishmania major</i>	866	<i>Homo sapiens</i>	Iran	LC
43	EF579898.1	<i>Leishmania major</i>	872	NH	NC	LC
44	JX195636.1	<i>Leishmania martiniquensis</i>	816	<i>Homo sapiens</i>	Tailandia	LV
45	JX195635.1	<i>Leishmania martiniquensis</i>	816	<i>Homo sapiens</i>	Tailandia	LV
46	AB558225.1	<i>Leishmania mexicana</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	LC
47	LC386850.1	<i>Leishmania mexicana</i>	817	<i>Felis catus</i>	Venezuela	LC
48	LC416873.1	<i>Leishmania mexicana</i>	817	<i>Felis catus</i>	Venezuela	LC
49	LC153244.1	<i>Leishmania mexicana</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LC
50	KU680833.1	<i>Leishmania mexicana</i>	866	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	LC
51	LC153257.1	<i>Leishmania naiffi</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
52	LC153256.1	<i>Leishmania naiffi</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
53	LC153224.1	<i>Leishmania naiffi</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC

54	LC153223.1	<i>Leishmania naiffi</i>	817	<i>Homo sapiens</i>	Ecuador	LMC
55	MW117421.1	<i>Leishmania panamensis</i>	811	NH	NC	LMC
56	MW117418.1	<i>Leishmania panamensis</i>	811	NH	NC	LMC
57	MW117415.1	<i>Leishmania panamensis</i>	811	NH	NC	LMC
58	MW117412.1	<i>Leishmania panamensis</i>	811	NH	NC	LMC
59	MW117411.1	<i>Leishmania panamensis</i>	811	NH	NC	LMC
60	LC472450.1	<i>Leishmania peruviana</i>	817	NH	Perú	LMC
61	LC472434.1	<i>Leishmania peruviana</i>	817	NH	Perú	LMC
62	LC472456.1	<i>Leishmania peruviana</i>	817	NH	Perú	LMC
63	LC472431.1	<i>Leishmania peruviana</i>	817	NH	Perú	LMC
64	MF278776.1	<i>Leishmania peruviana</i>	908	NH	NC	LMC
65	AB433281.1	<i>Leishmania shawi</i>	817	NH	NC	LMC
66	LC472863.1	<i>Leishmania shawi</i>	712	NH	Perú	LMC
67	LC472871.1	<i>Leishmania shawi</i>	702	NH	Perú	LMC
68	JX195634.1	<i>Leishmania sp. Siamensis</i>	792	<i>Homo sapiens</i>	Tailandia	LC
69	KY290231.1	<i>Leishmania tropica</i>	807	<i>Homo sapiens</i>	Iran	LV
70	KT972261.1	<i>Leishmania tropica</i>	825	NH	NC	LV
71	MW387243.1	<i>Leishmania tropica</i>	866	<i>Homo sapiens</i>	Pakistan	LV
72	KU680831.1	<i>Leishmania tropica</i>	867	<i>Homo sapiens</i>	Rusia	LV
73	EF579904.1	<i>Leishmania tropica</i>	872	NH	NC	LV
74	HQ713681.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	517	NH	NC	-
75	MK681441.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	578	<i>Rattus rattus</i>	México	-
76	FJ900255.1	<i>Trypanosoma rangeli</i>	490	<i>Homo sapiens</i>	Colombia	-
77	JN040962.1	<i>Trypanosoma rangeli</i>	476	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	-
78	LC593674.1	<i>Leishmania peruviana</i>	817	<i>Lutzomyia verrucarum</i>	Perú	LMC
79	AB434674.1	<i>Leishmania arábica</i>	1080	<i>Psammomys obesus</i>	Arabia Saudita	ND
80	EF579907.1	<i>Leishmania pifanoi</i>	872	NH	NC	LC
81	AB434679.1	<i>Leishmania pifanoi</i>	1079	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	LC
82	AB434677.1	<i>Leishmania donovani archibaldi</i>	1079	NH	NC	LV
83	KF302735.1	<i>Leishmania hertigi</i>	279	<i>Coendou rothschildi</i>	Panamá	LC
84	EF579903.1	<i>Leishmania garnhami</i>	872	NH	NC	LC
85	AB095965.1	<i>Leishmania garnhami</i>	1079	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	LC
86	AB434683.1	<i>Leishmania enriettii</i>	1080	<i>Cavia porcellus</i>	Brazil	LC
87	AB434684.1	<i>Leishmania deanei</i>	1079	<i>Coendou prehensilis</i>	Brazil	LC
88	AB434686.1	<i>Leishmania equatorensis</i>	1080	NH	Ecuador	ND
89	AB434687.1	<i>Leishmania equatorensis</i>	1080	NH	Ecuador	ND
90	AB434675.1	<i>Leishmania turanica</i>	1080	NH	NC	LC
91	HQ908256.1	<i>Leishmania turanica</i>	1080	NH	NC	LC
92	AB434688.1	<i>Endotrypanum monterogeii</i>	1080	NH	NC	-
93	AB434689.1	<i>Endotrypanum schaudinni</i>	1080	NH	NC	-
94	BK010874.1	<i>Endotrypanum schaudinni</i>	1055	NH	NC	-
95	BK010885.1	<i>Leishmania hertigi</i>	1097	NH	NC	LC
96	M10126.1	<i>Leishmania tarentolae</i>	602	NH	NC	ND

NH: Hospedador no identificado, NC: País no identificado, LMC: Leishmaniasis Mucocutánea, LC: Leishmaniasis Cutánea, LV: Leishmaniasis Visceral.