



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA ORAL**

**DETECCIÓN DE ADN DE *Leishmania* EN SALIVA DE PACIENTES A
DIFERENTES PERIODOS POST TRATAMIENTO LEISHMANICIDA.**

**Br. Marinest Gabriela Añez Rojas
Tutor: Od. Msc. Leonel Castillo
Asesora: Dra. Agustina Rojas**

Mérida – Venezuela 2024



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA ORAL**

**DETECCIÓN DE ADN DE *Leishmania* EN SALIVA DE PACIENTES A
DIFERENTES PERIODOS POST TRATAMIENTO LEISHMANICIDA.**

Trabajo especial de Grado para optar al título de Odontólogo.

Br. Marinest Gabriela Añez Rojas

Tutor: Od. Msc. Leonel Castillo

Asesora: Dra. Agustina Rojas

Mérida – Venezuela 2024

DEDICATORIA

A mi esposo e hija por su amor y comprensión incondicional, por aceptar mis ausencias cuando eran inevitables sabiendo y aceptando que debía compartir mi tiempo entre mi hogar y estudios.

¡¡¡ Los amo!!!

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

A **Dios**, por iluminar mi camino, nunca dejarme caer y enseñarme que siempre hay una luz luego de la oscuridad.

A **ti mami**, por darme la vida, por tus infinitas oraciones, por darme fuerza, por tener la palabra precisa en el momento justo y curar el alma con tan sólo tu voz.

Al **Dr. Nestor Añez, mi padre**, por su amor a la ciencia; tanto que hasta contagia, al trabajo duro, a la honestidad y dejar tiempo para ser el mejor papá del mundo.

A **mis hermanos**, por creer en mi incluso cuando yo no lo hacía.

A **mis sobrinos**, por ser luz y alegría infinita en mi vida.

A **mi esposo**, por apoyarme siempre en primera fila.

A **mi hija**, por ser mi más grande inspiración, nunca olvides que las mujeres podemos lograr todo lo que nos proponemos, no importa el tiempo, si trabajas duro la satisfacción de lograr las cosas siempre llega.

Al **Msc. Nestor Añez Rojas**, por darme luz, apoyo, amor y comprensión en todo este proceso.

A **mi querido profesor Leonel Castillo**, por querer aprender a mi lado, ser fuente de discusión y transmitirme confianza en todo momento.

A la **Dra. Agustina Rojas**, por su asesoramiento y ayuda.

A la **Universidad de Los Andes, Facultad de Odontología**, por permitirme enriquecer mi formación humana y profesional.

Al **Centro de Investigaciones Parasitológicas J.F. Torrealba** de la Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes, por haberme abierto sus puertas y permitirme realizar la parte más importante de mi TEG.

Marinest.

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea americana (LCA) es una parasitosis causada por protozoarios de la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania* que afecta hospedadores vertebrados, incluyendo al hombre, transmitidos por la picadura de insectos hematófagos del género *Lutzomyia*. Estos organismos son parásitos obligados de células del sistema fagocítico mononuclear, transportados por vía linfática y/o sanguínea desde el lugar de las lesiones invadiendo piel, mucosa y fluidos corporales incluyendo saliva. En el presente trabajo de tesis se logró detectar la presencia de *Leishmania* o parte de su genoma, en saliva de pacientes después de aplicar tratamiento específico anti-*Leishmania* a distintos tiempos de cicatrización, utilizando la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR- por sus siglas en inglés). Esta investigación descriptiva-observacional, de diseño no experimental, se llevó a cabo en pacientes previamente diagnosticados en un laboratorio especializado y seleccionados para tal fin. Se estudiaron 10 pacientes con lesiones cicatrizadas previamente corroboradas por métodos parasitológicos (detección de formas del parásito en extendidos coloreados), inmunológicos (prueba de intradermorreacción) a quienes fueron tomadas muestras de saliva, a diferentes tiempos post cicatrización, lográndose obtener amplificación de ADN de *leishmania* en las muestras de saliva utilizando un PCR multiplex convencional, lo cual permitió detectar específicamente la especie que generó la infección.

Palabras Claves: ADN-*Leishmania*; Leishmaniasis cutánea; Saliva; PCR.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Definición y contextualización	3
1.2 Hipotesis.....	5
1.3 OBJETIVOS	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Justificación.....	6
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Antecedentes.	8
2.2 Bases Teóricas.....	15
2.2.1 Leishmaniasis.....	15
2.2.1.1 Formas clínicas de Leishmaniasis.....	16
2.2.1.2 Leishmaniasis Cutánea Americana	16
2.3 Diagnóstico	17
2.3.1 Aplicación de prueba de intradermo-reacción de Montenegro (IDR) ..17	
2.3.2 Prueba parasitológica: Detección microscópica de formas infectivas de <i>Leishmania</i>	18
2.4 Saliva.....	19
2.4.1 Composición de la saliva	19
2.4.2 Función de la saliva.....	21
2.4.3 <i>Leishmania</i> en saliva.....	23
2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24

2.5.1 Principio de la técnica	24
2.5.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	24
CAPITULO III.....	26
MARCO METODOLÓGICO.....	26
3.1. Tipo de investigación.....	26
3.2. Diseño de investigación.....	26
3.3. Población.....	26
3.4. Muestra.....	27
3.5. Técnica e instrumentos de recolección de datos.	27
3.6 Aspectos bioéticos.....	27
3.7 Presencia de cicatriz a diferentes periodos post tratamiento.....	28
3.8 Muestreo, detección e identificación de ADN de <i>Leishmania</i> en muestra de saliva de pacientes con leishmaniasis cutánea	29
3.9 Caracterización molecular de la especie de <i>Leishmania</i> detectada mediante ensayos de PCR.	30
3.10 Plan de análisis de los resultados	32
CAPITULO IV.....	33
4.1 RESULTADOS.....	33
4.1.1. Detección de ADN de <i>Leishmania braziliensis</i> en muestra de saliva de pacientes con leishmaniasis a diferentes periodos post tratamiento leishmanicida.....	33
4.2 DISCUSION	38
CAPITULO V.....	42
5.1 CONCLUSIONES	42
5.2 RECOMENDACIONES.....	42
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Leishmania sp.</i>	15
Figura 2. Evolución de lesión por Leishmaniasis Cutánea Americana	16
Figura 3. Resultado de prueba de Intradermo Reacción de Montenegro (IDR).....	17
Figura 4. Muestra de lesión cutánea	18
Figura 5. Esquema de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	25
Figura 6. Cicatrices de paciente al momento de la toma de muestra de saliva.....	28
Figura 7. Toma e identificación de muestra de saliva	30
Figura 8. Amplificación de ADN de <i>Leishmania braziliensis</i>	32
Figura 9. Demostración de la presencia de ADN de <i>Leishmania braziliensis</i> en muestras de saliva de pacientes a diferentes tiempos post-tratamiento leishmanicida	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo aplicado para PCR multiplex	31
Tabla 2. Comparación de pacientes positivos para ADN de <i>Leishmania braziliensis</i> con pacientes control negativo	35

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea americana (LCA) es una enfermedad metaxénica (transmitida por insectos) causada por protozoarios del género *Leishmania*, ampliamente distribuida en todo el continente americano, habiéndose registrado en pobladores rurales y semiurbanos desde México hasta Argentina. Los parásitos son transmitidos por la picadura de hembras de insectos hematófagos del género *Lutzomyia*, incriminados como vectores, en lugares donde existen las condiciones de riesgo. Algunas especies de estos insectos se alimentan sobre un amplio rango de hospedadores vertebrados, incluyendo cánidos, roedores y humanos, habiéndose registrado patrones de transmisión zoonóticos y antroponóticos.

La leishmaniasis no es una sencilla entidad nosológica, ya que comprende una variedad de síndromes debido, fundamentalmente, a la diversidad de parásitos que afectan diferentes poblaciones, cada una relacionada con sus característicos vectores y reservorios animales. El espectro clínico de la leishmaniasis es tan amplio que su rango se extiende desde infecciones asintomáticas o subclínicas hasta casos de alta severidad. Asimismo, la leishmaniasis cutánea (LC) puede ser detectada por lesiones confinadas en la piel de individuos infectados y la leishmaniasis mucocutánea (LMC) causando destrucciones del tabique nasal o de la región nasofaríngea¹⁻².

En la región neotropical la LC es causada principalmente por las especies *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* transmitida por varias especies flebotominas. En Venezuela la LC es endémica en la mayoría de las regiones que conforman la eco- geografía del país, siendo las áreas más afectadas o endémicas las poblaciones ubicadas en las alturas andinas, donde la casuística supera con creces cualquier otra región del país². La amplia distribución de *Leishmania* en el cuerpo del

hospedador humano a través de la red linfática y la circulación sanguínea, permite al parásito invadir diferentes áreas de la piel, mucosa y los diferentes fluidos corporales incluyendo orina, espermatozoides, secreción faríngea y saliva. Comprendiendo la complejidad del problema y la necesidad de clarificar ciertos eventos recientemente publicados en la literatura científica, relacionados con la capacidad de invasión de *Leishmania* a la cavidad bucal³⁻⁶.

En el presente trabajo se pretende detectar la presencia de *Leishmania* en saliva de pacientes que han sufrido leishmaniasis cutánea y recibido tratamiento leishmanicida, lo cual aunque produce la cicatrización de la lesión ulcerosa, no es garantía de la desaparición de parásitos persistentes en cualquier parte de la economía donde la respuesta inmune no llega con eficiencia liberadora de la infección, la cual puede persistir por tiempo variable, post tratamiento, como ocurre en otros organismos de la familia *Trypanosomatidae* a la cual pertenecen organismos del género *Leishmania*, aquí estudiado y planteado reiteradamente por investigadores venezolanos pertenecientes a nuestra institución universitaria⁷⁻¹².

Por tal razón, el presente proyecto tuvo como objetivo fundamental detectar ADN de *Leishmania* en el fluido salival mediante el uso de técnicas producto de la nueva biotecnología utilizando el ensayo de PCR en muestras de pacientes identificados con la infección y post tratamiento específico leishmanicida. Este estudio se llevó a cabo bajo el asesoramiento de investigadores del Centro de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba” de la Facultad de Ciencias y la cátedra de Anestesiología y Cirugía Estomatológica “Dr. Juan O. Briceño” de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Definición y contextualización

La LC es la más común de las leishmaniasis, causa cerca de un millón de casos por año, llegando a producir complicaciones tales que incapacitan al hospedador humano para realizar sus tareas habituales o provocar desfiguraciones difíciles de controlar si no se atienden en su debido tiempo¹³.

El ciclo biológico de las leishmanias causantes de leishmaniasis cutánea, comienza una vez ocurrido su depósito en el cuerpo del individuo picado por un insecto vector previamente infectado, introduciendo durante el acto de alimentación con la sangre del hospedador, formas infectivas del parásito. Tales formas son tomadas por las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, células dendríticas, entre otras) para ser presentadas como antígeno al ganglio linfático más cercano. Desde ese momento, la distribución de las leishmanias en el cuerpo del hospedador sigue la red linfática, invadiendo tejidos y fluidos a lo largo de todo el cuerpo del individuo, resultando mayor acción del parásito en los puntos de concentración del mismo¹.

Aun cuando la mayoría de las lesiones son evidenciadas en el hospedador, por lo que generalmente las lesiones de individuos infectados con leishmaniasis son asociadas a úlceras cutáneas, no es raro que tales parásitos alcancen durante su distribución fluidos como orina, secreciones faríngeas, lágrimas, esperma y saliva o permanezcan en el cuerpo del hospedador sin provocar sintomatología

permaneciendo por largos periodos sin provocar lesiones aparentes como infecciones inaparentes, ocultas o asintomáticas³.

Así mismo, la leishmaniasis cutánea americana (LCA) es considerada una enfermedad desatendida que afecta gran parte de la población latinoamericana en general, siendo Venezuela reconocida como país endémico, debido a que la infección se encuentra esparcida por todo el territorio nacional, ubicándose como áreas más afectadas la geografía andina, incluyendo los estados Táchira, Trujillo y Mérida².

Por tal razón, la problemática causada por esta parasitosis en el país, refleja un sistema complejo al analizarse desde el punto de vista clínico, observando desde un perfil de casos asintomáticos o subclínicos, sin lesiones aparentes no detectables al examen físico, hasta lesiones de amplia magnitud causantes de ulceraciones de tamaño y gravedad tal que algunas veces discapacitan al paciente portador de la infección. Es por ello, que estas dos situaciones presentes plantean la necesidad de concebir esta enfermedad como un problema de salud pública que requiere atención constante e inmediata para evitar extensión de la misma y su transformación en caos para la población, que rebase la capacidad de control por parte del sistema de salud nacional y regional¹⁴.

La situación epidemiológica mostrada, aunada a la complejidad clínica, obliga a buscar métodos diagnósticos certeros que puedan aplicarse de manera rutinaria en los centros de salud en las áreas endémicas. Desafortunadamente, la capacidad diagnóstica para la leishmaniasis en el país esta reducida a algunos centros especializados, ya que el sistema de salud nacional no cuenta con una red constituida con un personal capacitado para tales fines, debido a que los centros de diagnóstico existentes se encuentran en las grandes ciudades o en zonas alejadas de los sitios donde la frecuencia de casos es mayor. Mas aún, cuando

existen esos centros carecen de elementos diagnósticos necesarios o de la experticia de su personal para realizarlos ¹⁵.

La complejidad clínica, obliga a buscar métodos diagnósticos certeros además de los parasitológicos que incluyen técnicas microscópicas, cultivos, métodos inmunológicos basadas en detección de anticuerpos y técnicas moleculares como los ensayos de PCR, demostrando ser uno de los más utilizados para aplicarse sin inconvenientes en los centros de salud en las áreas endémicas ^{5,16}.

Esta parte de la problemática refleja la situación real sobre el desconocimiento de la proporción de individuos infectados por *Leishmania* en el territorio nacional, donde las cifras aportadas como prevalencia son un subregistro de la situación actual. Comprendiendo la complejidad del problema y la necesidad de clarificar ciertos eventos recientemente publicados en la literatura científica, relacionados con la capacidad de invasión de *Leishmania* a la cavidad bucal, de pacientes con leishmaniasis cutánea ^{4,6,15}.

Al considerar la infección causada por este parásito y su repercusión en la salud del paciente que presenta lesiones cutáneas, es necesario tener en cuenta la capacidad de distribución de este organismo en los diferentes tejidos del hospedador humano ^{6,15}.

1.2 Hipotesis

La detección de ADN de *Leishmania* en saliva de pacientes que han sufrido leishmaniasis cutánea y recibido tratamiento leishmanicida, demuestra la persistencia del parásito, a diferentes períodos post tratamiento.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Detectar la presencia de ADN de *Leishmania* en muestras de saliva de pacientes, utilizando ensayos de PCR, a diferentes periodos post tratamiento.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar pacientes con infección por *Leishmania* en distintos períodos post tratamiento leishmanicida.
- Clasificar los pacientes post tratamiento por tiempo transcurrido de cicatrización.
- Identificar, utilizando ensayos de PCR, la presencia de *Leishmania* causante de la infección en los pacientes admitidos al estudio.

1.4 Justificación

Dada la importancia de la leishmaniasis como problema de salud pública, se pretende ensayar una técnica producto de la nueva biotecnología para detectar la presencia de *Leishmania*, o parte de su genoma (ADN) en muestras de saliva de pacientes que han sufrido leishmaniasis cutánea, infección causada por *Leishmania braziliensis* especie que circula mayoritariamente en esta parte de la geografía regional. Asimismo, se muestra la preocupación desde el punto de vista de la práctica odontológica, asomándose su utilidad potencial en estudios clínicos

y epidemiológicos por la sensibilidad y especificidad del método para detectar la presencia de la infección en individuos con lesiones activas, casos subclínicos, es decir, con infección oculta o inaparente y, particularmente considerando la capacidad de persistencia del parásito en el hospedador, evadiendo la acción del sistema inmunitario, visualizándose en el estudio la pertinencia social del mismo. Otro aspecto de relevancia en la presente propuesta, es la potencialidad del resultado, el cual podría permitir no solo detectar la presencia de *Leishmania*, como agente etiológico de una enfermedad endémica en la región, sino también advertir al profesional de la odontología sobre el inminente peligro de una posible infección si se ignora la posibilidad de estar actuando profesionalmente en la cavidad bucal de un posible portador de *Leishmania*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes.

Garnham 1987¹ nos enseña en su libro las bases de esta parasitosis y asegura que, la leishmaniasis es una enfermedad transmitida por insectos causada por protozoarios del género *Leishmania*. Esta infección se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del globo terráqueo, habiéndose registrado en pobladores de cerca de 100 países de África, Asia, América y Europa, estimándose que entre 900.000 a 1.500.000 individuos se infectan cada año, aunque sólo una fracción de ellos desarrollan la enfermedad y alrededor de 25.000 personas mueren como consecuencia de la infección. Los parásitos son transmitidos por la picadura de hembras de especies de insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, incriminados como vectores en los llamados viejo y nuevo mundo, respectivamente. Algunas especies de estos insectos poseen un amplio rango de hospedadores vertebrados sobre los cuales se alimentan, incluyendo cánidos, roedores y humanos, habiéndose registrado patrones de transmisión zoonóticos y antroponóticos¹.

La leishmaniasis no es, de ninguna manera, una sencilla entidad nosológica, ya que comprende una variedad de síndromes debido, fundamentalmente, a la diversidad de parásitos que afectan diferentes poblaciones, cada una relacionada con sus característicos vectores y reservorios animales. El espectro clínico de la leishmaniasis es tan amplio que su rango se extiende desde infecciones asintomáticas o subclínicas hasta casos de alta severidad, causante de una gran mortalidad. Asimismo, sus lesiones pueden ser detectadas: I.- Confinadas en la piel de individuos infectados, en la leishmaniasis cutánea (LC); II.- Causando destrucciones del tabique nasal o de la región nasofaríngea, en la forma de

leishmaniasis mucocutánea (LMC), y III.- Presentándose en la forma de leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar, invadiendo órganos del sistema fagocítico mononuclear (SFM) como el hígado, el bazo, la médula ósea y ganglios linfáticos y que, en ausencia de terapia específica, más de las veces termina en inminente muerte¹.

La problemática causada por la leishmaniasis es considerada no solamente compleja, sino también de distribución global. Hasta hace aproximadamente un siglo, la leishmaniasis fue considerada realmente importante sólo en India, China, el oriente medio, el sur de Europa y parte de Suramérica. Sin embargo, en el presente siglo XXI se reconoce como problema de salud pública en todo el mundo con excepción de la Antártida. Tal distribución geográfica podría ser atribuida a la presencia de las eficientemente adaptadas especies de flebotominos vectores y a susceptibles animales vertebrados que actúan como reservorios de la infección. En estos últimos, las leishmanias se alojan y reproducen intracelularmente, invadiendo el citoplasma de las células que conforman el sistema fagocítico mononuclear (SFM) del correspondiente hospedador vertebrado¹.

Lainson & Shaw 1998¹⁷, en su estudio reconocen aproximadamente 20 especies de *Leishmania* descritas e incriminadas como patógenas para humanos y animales. Aunque todas las especies son morfológicamente similares, pueden causar formas clínicas diferentes incluyendo leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) dependiendo del tipo de células fagocíticas invadidas. En LC, los parásitos infectan macrófagos presentes en la piel, mientras que en LV otras células del SFM son invadidas transportando los parásitos hasta órganos como el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos¹⁷.

Steverding, en 2017¹³, asegura que la más común de las leishmaniasis es la LC causando cerca de un millón de casos por año, mientras que la LV provoca

aproximadamente 500.000 casos por año, siendo la forma más severa causando más de 90% de casos fatales en individuos infectados sin tratamiento específico¹³.

Añez *et al.*, 1988, 2018; Costa *et al.*, 2009; Weigle & Saravia, 1996^{18,15,19-20} coinciden en sus estudios realizados en diferentes tiempos que la leishmaniasis cutánea americana (LCA), es una enfermedad tropical de las consideradas como dolencias olvidadas, estando entre las mayores amenazas en la población humana que vive en áreas donde esta parasitosis es endémica. Esta forma de leishmaniasis es la más comúnmente encontrada esparcida por todo el mundo y se estima la aparición de un millón de casos anualmente. El amplio espectro clínico asociado con la gran cantidad de especies de insectos vectores responsable de la transmisión del parásito hace de la LCA una compleja y altamente riesgosa enfermedad, la cual oscila desde infección subclínica, oculta o inaparente hasta impresionantes lesiones en la piel o mucosas, poniendo en riesgo la actividad del hospedador humano y su calidad de vida^{18,15,19-20}.

Sendino *et al.*, 1990; Altes *et al.*, 1991; Mabrahtu *et al.*, 1993; Fahal *et al.*, 1995., Hill, 1998²¹⁻²⁵, también coinciden en sus estudios en que la amplia distribución de *Leishmania* causando LCA a través de la red de nódulos linfáticos y circulación sanguínea, permite al parásito invadir diferentes tejidos u órganos del cuerpo humano incluyendo piel, mucosa además de varios fluidos del cuerpo humano como orina, esperma, secreción faríngea y saliva²¹⁻²⁵.

Mohammad *et al.*, 2016²⁶ sugieren que, la detección temprana de enfermedades no sólo es vital para reducir la gravedad de la enfermedad y prevenir complicaciones, sino que también es fundamental para aumentar la tasa de éxito de la terapia. La saliva ha sido estudiada extensamente como una herramienta de diagnóstico potencial durante la última década debido a su facilidad y accesibilidad no invasiva, junto con su abundancia de biomarcadores, como

material genético y proteínas. Esta revisión actualizará al médico sobre los avances recientes en biomarcadores salivales para diagnosticar enfermedades autoinmunes (síndrome de Sjögren, fibrosis quística), enfermedades cardiovasculares, diabetes, VIH, cáncer oral, caries y enfermedades periodontales. Teniendo en cuenta su exactitud, eficacia, facilidad de uso y rentabilidad, las pruebas de diagnóstico salival estarán disponibles en los consultorios dentales siendo herramientas de diagnóstico salival sensibles y específicas que logren el establecimiento de pautas definidas y los resultados después de pruebas rigurosas permitirán diagnósticos que se utilizarán como pruebas en el sillón para varias enfermedades orales y sistémicas en un futuro²⁶.

Siriyasatien et al., 2016., Phumee et al., 2013^{16,27}; de la misma manera coinciden en sus estudios diciendo que la detección de ADN de *Leishmania* en leucocitos de la sangre de paciente con LCA permite explicar la emergencia de casos subclínicos, lesiones recurrentes y/o aparición de lesiones mucosas^{16,27}.

Netranapha Pandey et al., 2018²⁸ en su estudio hablan de la leishmaniasis como una enfermedad tropical desatendida que causa infecciones oportunistas entre los pacientes con VIH/SIDA. La forma fatal de esta enfermedad es la leishmaniasis visceral (LV). El ADN de *Leishmania* se puede detectar en la saliva, por lo que la recolección no es invasiva y requiere poca experiencia. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad y especificidad de *Leishmania* en muestras emparejadas de saliva y capa leucocitaria de 305 pacientes tailandeses con VIH/SIDA en el Hospital Trang, provincia de Trang, sur de Tailandia. Para la infección asintomática por *Leishmania* en pacientes tailandeses con VIH/SIDA, la sensibilidad y la especificidad de la PCR-ITS1 anidada en la capa leucocitaria fueron del 73,9 y del 100 %, respectivamente. Sin embargo, la sensibilidad en saliva fue del 26,1% y la especificidad del 100%. Mediante el uso de Nested-PCR-ITS1, las muestras de saliva y capa leucocitaria mostraron una concordancia positiva en solo el 52,0 % de los pacientes. Los resultados de las

pruebas de saliva con nested-PCR-ITS1 mostraron una concordancia positiva con la prueba de aglutinación directa (TAD) en el 46,5 % de los pacientes. Solo el 12,1 % de las muestras mostró una concordancia positiva para la infección por *Leishmania* entre las tres pruebas: saliva, capa leucocitaria y resultados de TAD. Mediante la secuencia de nucleótidos, se identificaron al menos tres especies de infección por *Leishmania* en la saliva, es decir, *L. siamensis* (n = 28), *L. martiniquensis* (n = 9) y *L. donovani complex* (n = 1). Como resultado, la capa leucocitaria todavía parece ser una mejor muestra para diagnosticar una infección asintomática de LV en personas con VIH. Sin embargo, el uso en conjunto de la capa leucocitaria y la saliva como muestras clínicas aumentaría la sensibilidad de la detección de *Leishmania*²⁸.

Guevara *et al.*, 1993, 1994., Añez *et al.*, 2000^{14,29-30}, tienen previos reportes mostrando evidencias de circulación de ADN de *Leishmania* en muestras de sangre de pacientes años después de haber cicatrizado lesiones o después de un evento traumático a diferentes períodos post tratamiento, sugiere una larga permanencia de la infección por *Leishmania* como también pudiera sugerir la capacidad para evadir algunos protocolos terapéuticos^{14,29-30}.

Pereira Lima *et al.*, 2010³¹ reportan que la detección de ADN de *Leishmania* en saliva a partir de pacientes infectados con diferentes especies de parásitos y con condiciones clínicas diferentes, han sido reportadas desde diversas regiones del mundo. Esto incluye lesiones cutáneas en individuos inmunocompetentes sin presentar lesiones mucosas en la cavidad oral y pacientes inmunocomprometidos con infecciones por VIH, SIDA usando en la mayoría de los casos ensayos de PCR como método diagnóstico; en este respecto expresan particular experiencia en relación con el complejo *Leishmania*-saliva y la posibilidad de desarrollar métodos para su diagnóstico, sugieren que la saliva se ha convertido en un recurso importante para evaluar las condiciones fisiológicas y patológicas en humanos. El uso de saliva tiene muchas ventajas, incluido el método simple y no

invasivo de recolección y su almacenamiento fácil y económico. Con la incorporación de técnicas modernas y equipos de instrumentación química, ha habido un aumento en su uso para investigaciones de laboratorio, aplicable para análisis básicos y clínicos en los campos de la medicina y la odontología. El valor de estos métodos para el diagnóstico de enfermedades orales y sistémicas ha sido objeto de estudio por parte de varios investigadores con el objetivo de incrementar su uso junto con exámenes complementarios³¹.

Cantos-Barreda *et al* 2017³², sostiene en su estudio que la detección de anticuerpos séricos anti-*Leishmania* por técnicas cuantitativas o cualitativas ha sido el método más utilizado para diagnosticar la Leishmaniasis Canina (CanL); siendo la saliva otra alternativa a la sangre porque es fácil de recolectar, indoloro y no invasivo en comparación con el suero. En este estudio, dos resoluciones de tiempo ensayos inmunofluorométricos (TR-IFMA) para la cuantificación de anticuerpos IgG2 e IgA anti-*Leishmania* en saliva fueron desarrollados y validados y su capacidad para distinguir perros seronegativos para *Leishmania* de perros seropositivos fue evaluado. El estudio analítico se realizó mediante la evaluación de la precisión, sensibilidad y exactitud del ensayo. Además, se analizó el suero de 48 perros (21 seropositivos para *Leishmania* y 27 seronegativos para *Leishmania*) mediante TR-IFMA. Los ensayos fueron precisos, con coeficientes de variación intraensayo e interensayo inferiores al 11 %. Los anticuerpos IgG2 anti-*Leishmania* en saliva fueron significativamente más altos en el grupo seropositivo en comparación con los seronegativos ($p < 0,0001$), mientras que no hubo diferencias significativas para anti-*Leishmania* IgA se observaron anticuerpos entre ambos grupos. Además, TR-IFMA para la cuantificación de anti-*Leishmania*. Los anticuerpos IgG2 en saliva mostraron mayores diferencias entre perros seropositivos y seronegativos que los perros seropositivos. En conclusión, los TR-IFMA desarrollados pueden usarse para cuantificar la resistencia a la *leishmania*. Anticuerpos IgG2 e IgA en saliva canina con una adecuada precisión, sensibilidad analítica y exactitud. La cuantificación

de anticuerpos IgG2 anti-*Leishmania* en saliva podría utilizarse potencialmente para evaluar la respuesta humoral en CanL³².

Felinto de Brito M., *et al.* 2018⁴. Demostró que el uso de métodos no invasivos ha sido principalmente para la detección del ADN del parásito, en el diagnóstico. Sin embargo, no se han aislado especímenes de *Leishmania* a partir de saliva. En este artículo, presentamos el primer aislamiento de *Leishmania braziliensis* de la saliva de humanos con leishmaniasis cutánea sin lesiones en la mucosa. Los aislados se obtuvieron a partir de fluido salival inoculado en hámsteres y se analizaron mediante electroforesis enzimática. Se identificaron siete muestras de 43 pacientes sospechosos de padecer la enfermedad para su cultivo in vivo. Estos resultados sugieren que la saliva es una muestra clínica que permite el aislamiento de *Leishmania* sp⁴.

Corvalan *et al.*, 2011⁵ realizaron un estudio que tuvo como finalidad reportar la amplificación del ADN de *Leishmania braziliensis*, utilizando reacción en cadena de la polimerasa, obtenida de la saliva de pacientes con leishmaniasis cutánea americana quienes no presentaron ninguna lesión en la mucosa bucal. La amplificación produjo fragmentos de 103 pb, un tamaño estimado empleando iniciadores de *Leishmania braziliensis* (b1 y b2). Los presentes resultados revelaron, por primera vez, que la amplificación in vitro de ADN de *Leishmania* utilizando muestras del fluido salival de un paciente con leishmaniasis cutánea americana. Sin embargo, se requieren más estudios con un mayor número de participantes para evaluar la utilidad de la saliva como muestra no invasiva para PCR. El desarrollo de dicha técnica no invasiva es necesario para el diagnóstico de muchas enfermedades en el futuro, especialmente infecciosas y parasitarias⁵.

Añez *et al.*, 2023⁶ proponen que la precisión mostrada, no invasiva, segura, fácil, económica, sumada a su sensibilidad y especificidad, hacen que la herramienta

de diagnóstico de saliva basada en PCR sea útil para detectar e identificar específicamente el ADN de *Leishmania* con fines clínicos y epidemiológicos. El diagnóstico basado en PCR utilizado fue capaz de detectar e identificar específicamente *L. braziliensis* en saliva, independientemente de la edad, el sexo, el número de lesiones y el tiempo de evolución de la úlcera de los pacientes⁶.

2.2 Bases Teóricas.

2.2.1 Leishmaniasis

La Leishmaniasis cutánea es una enfermedad desatendida que afecta gran parte de la población latinoamericana, en general, y la venezolana, en particular, detectándose localidades endémicas esparcidas por todo el territorio nacional, siendo las áreas más afectadas las correspondientes a la geografía andina, donde los estados Táchira, Trujillo y Mérida lideran las estadísticas sobre prevalencia en el país².

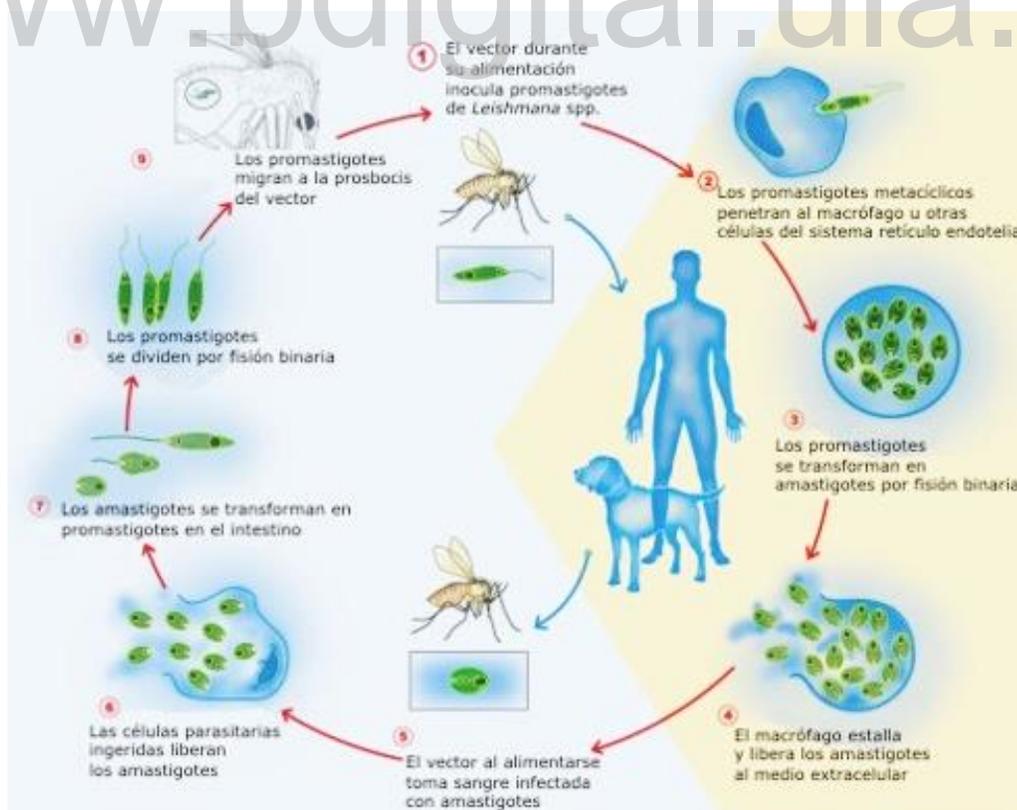


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* sp.
Tomado de Montalvo et al., 2012⁴².

2.2.1.1 Formas clínicas de Leishmaniasis

En la actualidad se reconocen aproximadamente 20 especies de *Leishmania* descritas e incriminadas como patógenas para humanos y animales. Aunque todas las especies son morfológicamente similares, pueden causar formas clínicas diferentes incluyendo, leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) dependiendo del tipo de tejidos invadidos. En LC, los parásitos infectan macrófagos presentes en la piel, mientras que en LV otras células del sistema fagocítico mononuclear (SFM) son invadidas transportando los parásitos hasta órganos como el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. La más común de las leishmaniasis es la LC causando cerca de un millón de casos por año, mientras que la LV provoca aproximadamente 500.000 casos por año, siendo la forma más severa causando más de 90% de casos fatales en individuos infectados sin tratamiento específico¹⁷.

2.2.1.2 Leishmaniasis Cutánea Americana

La leishmaniasis cutánea americana (LCA), es una enfermedad tropical de las consideradas como dolencias olvidadas y está entre las mayores amenazas en la población humana que vive en áreas donde esta parasitosis es endémica. Esta forma clínica de leishmaniasis es la más comúnmente encontrada esparcida por todo el mundo y se estima un registro de un millón de casos anualmente. El amplio espectro clínico asociado con la gran cantidad de especies de insectos vectores responsable de la transmisión del parásito hace de la LCA una compleja y riesgosa enfermedad, la cual oscila desde infección subclínica, o inaparente hasta impresionantes lesiones en la piel o mucosas, poniendo en riesgo la actividad del hospedador humano y su calidad de vida^{13,23}.



Figura 2. Evolución de lesión por leishmaniasis cutánea americana sometida a tratamiento
Fuente: Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba", U.L.A.

2.3 Diagnóstico

2.3.1 Aplicación de prueba de intradermo-reacción de Montenegro (IDR)

Esta prueba se realiza aplicando intradérmicamente, en la parte interior del antebrazo, 0,1ml de un compuesto biológico, conocido como leishmanina, elaborado con promastigotes de *Leishmania*, inactivados y mantenidos en un conservante. Con este método, se suele detectar la reacción de la respuesta celular del organismo humano, indicando previo contacto con el parásito causante del cuadro inicial observado. La intradermo-reacción, fue medida entre las 48–72 horas luego de su aplicación, considerándose como reactiva, o positiva, una induración igual o mayor a 5x5mm de diámetro, lo cual fue elemento indicativo para proceder al próximo elemento diagnóstico probatorio.



Figura 3. Resultado de la prueba de IDR en un paciente positivo para infección por *Leishmania*.

Fuente: Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba" U.L.A.

2.3.2 Prueba parasitológica: Detección microscópica de formas infectivas de *Leishmania*.

La detección microscópica de las formas tisulares de *Leishmania*, reconocidas como amastigotes, en muestra tomadas de las lesiones o úlceras cutáneas fueron obtenidas siguiendo el siguiente proceso: Una vez tomada la muestra de la úlcera cutánea mediante aspiración con micro agujas, por aposición de láminas portaobjetos de vidrio sobre la lesión expuesta y pequeñas biopsias de 1mm de tamaño, las muestras fueron esparcidas en láminas portaobjetos de vidrio hasta formar un extendido fino del material colectado. Cada lámina fue secada suficientemente para luego fijarla con metanol por 3 minutos, seguidamente coloreada con colorante de Giemsa al 10% en buffer fosfato pH 7,2 por 1 hora. Posteriormente, cada lámina procesada fue observada en microscopio Axioskop-Zeiss en interfase con cámara Motic-680, asociada a computador Pentium-1000 a un aumento de 1000X, en este proceso fue registrada la presencia de amastigotes de *Leishmania*, corroborándose el diagnóstico previo por prueba IDR de Montenegro.



Figura 4. Muestra de lesión cutánea conteniendo macrófagos cargados con amastigotes de *Leishmania*.

Fuente: Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba" U.L.A.

2.4 Saliva

La saliva es un líquido que humedece la cavidad bucal y es secretado por las glándulas salivales. Dentro de sus propiedades fundamentales se encuentran la protección de la mucosa bucal y dientes, crea defensas a través de las lisozimas, cooperación en la digestión, regulación del pH por su función de tampón al evitar las lesiones producidas por el exceso de bases y ácidos y la limpieza de la boca a través de los movimientos masticatorios, que se pueden efectuar por la humectación de la saliva. Una disfunción salival como la misma reducción en la cantidad de secreción o los cambios en las concentraciones químicas como parte de las propiedades de la saliva son responsables de una gran cantidad de problemas bucales que pueden tener un impacto directo en el estado general de la salud del paciente, se refiere únicamente al fluido hipotónico secretado por las glándulas salivales³³.

2.4.1 Composición de la saliva

La mayoría de las proteínas en la saliva son producidas por las glándulas salivales, pero existen grandes diferencias entre las glándulas en cuanto a qué proteínas sintetizan. Algunas proteínas son universales para todas las glándulas, como el componente secretor, que es el transportador de Inmunoglobulina A (IgA-principal anticuerpo de la saliva), las mucinas (productos de los genes Muc5b y Muc7) son comunes en las glándulas submandibulares y sublinguales, así como la mayoría de las glándulas menores, pero no son expresadas por la parótida y las glándulas serosas. Las proteínas ricas en prolina (PRP) básicas parecen ser exclusivas de las glándulas parótidas, mientras que los PRP ácidos aparecen en las glándulas submandibulares y parótidas. Los PRP son altamente polimórficas y, aunque están codificados por solo seis genes, existen más de 50 proteínas diferentes, principalmente debido a reordenamientos genéticos, pero también debido a algún procesamiento posterior a la secreción.

El resultado de esto es una gran variedad de proteínas no sólo entre individuos sino también dentro del mismo individuo en diferentes momentos del día (por el aporte de diferentes glándulas). Podría relacionarse con las ubicaciones en la boca donde cada glándula deposita saliva. La glándula parótida produce la menor cantidad de saliva en reposo, pero la mayor parte durante los períodos de masticación, por lo que la entrega de saliva parotídea adyacente a los molares superiores podría ser importante para ayudar a masticar los alimentos. Por el contrario, ocurre en la salida submandibular y sublingual bajo la lengua.

La amilasa es la proteína más abundante en la saliva. En general, se piensa que está involucrada en la digestión inicial de los alimentos que contienen almidón. Sin embargo, esto parece poco probable porque su actividad se reduce en gran medida tan pronto como llega al ambiente ácido del estómago, la amilasa es muy eficiente para convertir muchos polisacáridos complejos no solubles en unidades solubles más pequeñas. Esto tiene dos ventajas: la disolución de las partículas de comida pegadas en los dientes y la reducción de la disponibilidad de sustratos para el crecimiento microbiano.

Muchas de las familias de proteínas en la saliva tienen secuencias de aminoácidos inusuales. Además, a los PRP ya mencionados, se encuentran proteínas ricas en histidina (conocidas como histatinas) y proteínas ricas en cisteínas (conocidas como cistatinas). Las histatinas parecen ser particularmente efectivas para controlar crecimiento fúngico en la boca. Sin embargo, la presencia de tantas histidinas con una estructura de anillo crea una fuerte afinidad por polifenoles que es similar a la forma en que la estructura del anillo de prolina ayuda en la unión de la prolina a los polifenoles.

El alto contenido de prolina de los PRP conduce a una estructura extendida que también se refleja en las mucinas que son ricas tanto en prolina como en serina. El aminoácido serina es el principal sitio para la glicosilación ligada, que puede

representar más del 50% de la estructura de la mucina. La glicosilación, y particularmente los ácidos siálicos terminales, son importantes para la unión bacteriana, que ayuda en la agregación y eliminación de bacterias de la boca³¹⁻³³.

2.4.2 Función de la saliva

Las propiedades de la saliva son modificadas por las glicoproteínas y los iones que la componen, los cuáles permiten que se realicen diversas funciones del fluido salival. El movimiento de la saliva es importante para la eliminación de bacterias, la amortiguación del pH, la higiene bucal y la salud en general. El agua es un fluido newtoniano porque la viscosidad no cambia con el aumento de la masticación. Por el contrario, la saliva, a pesar de estar compuesto en un 99% por agua, se describe como un fluido no newtoniano porque la viscosidad disminuye al aumentar este proceso. En la práctica, esto permite que la saliva se esparza fácilmente sobre las superficies bucales. Esta es una función importante de la saliva debido a que las superficies de la mucosa oral, son el principal sitio de interacción con los microorganismos presentes en la boca.

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular con una estructura alargada que contribuyen significativamente al comportamiento viscoelástico de la saliva, pueden auto agregarse para formar grandes estructuras, lo que lleva a la naturaleza viscosa de la saliva de toda la boca o la saliva submandibular/sublingual.

La saliva parotídea, que no contiene mucinas, pero aún tiene muchas glicoproteínas, tiene una viscosidad más cercana a la del agua. Sin embargo, la saliva parotídea todavía tiene fuertes cualidades viscoelásticas, entre las que se encuentran sus propiedades activas de superficie, que permiten la humectación de ambas hidrofóbicas y superficies hidrófilas, esto es particularmente importante debido a las diferentes propiedades de los alimentos. Todos estos

alimentos necesitan recubrirse con una capa de saliva para permitir la formación de un bolo y tragarse con seguridad.

La formación del bolo alimenticio es otra función importante de la saliva que en gran medida no se ha estudiado. También como las propiedades humectantes mencionadas anteriormente, la incorporación de saliva en los alimentos es importante para permitir que las partículas de comida se peguen. La descomposición física de los alimentos al masticarlos da como resultado partículas más pequeñas. Una vez que han sido suficientemente procesados, se forma un bolo por la acción de la lengua y debe estar lo suficientemente bien lubricado (por la saliva) para pasar a través de la garganta, al tocar los receptores en la garganta determinan si el bolo está listo para ser tragado.

La estaterina, otra proteína salival, parece ser una molécula muy importante para la saliva en términos de propiedades físicas, además de ser el componente más tensioactivo de la saliva. Las cualidades lubricantes o tribológicas de la saliva son fundamentales para muchas de sus funciones en el procesamiento de alimentos. Los componentes iónicos de la saliva, y en particular el calcio, también están influenciados por los componentes proteicos, dentro de la saliva. La saliva está sobresaturada de calcio con respecto a la hidroxiapatita, que es la principal componente mineral de los dientes. Esto es para evitar la disolución de los dientes cuando se exponen a fluidos orales, alimentos y ácidos dietéticos particulares. La mayor parte del calcio en la saliva es proteína unida a la estaterina, otras proteínas que contienen fósforo (como los PRP ácidos). Esto tiene el efecto beneficioso de prevenir la precipitación excesiva de calcio en los dientes, especialmente en los cubiertos de bacterias³³.

2.4.3 *Leishmania* en saliva

La amplia dispersión de *Leishmania* a través de la red de nódulos linfáticos y circulación sanguínea, permite al parásito invadir diferentes áreas de la piel, mucosa y fluidos corporales incluyendo orina, esperma, secreción faríngea y saliva³.

La detección del ADN de *Leishmania* en leucocitos de sangre de pacientes con LCA, explica casos emergentes, lesiones recurrentes y aparición de lesiones en mucosa. Adicionalmente, previos reportes evidencian la circulación de ADN de *Leishmania* en muestra de sangre de pacientes años después de la cura clínica, después de eventos traumáticos y post tratamiento anti *Leishmania*^{14,29-30,34}.

Recientemente, la detección de ADN de *Leishmania* en saliva de pacientes infectados con distintas especies y diferentes condiciones clínicas, han sido registrados en distintas partes del mundo. Estas incluyen, individuos inmunocompetentes sin lesiones mucosas y pacientes inmunocomprometidos infectados con VIH SIDA, utilizando ensayos de PCR^{4,15}.

En relación con estos estudios a nivel regional, se ha comenzado a utilizar la técnica de PCR para la detección e identificación de *Leishmania braziliensis* en pacientes referidos a un laboratorio de diagnóstico especializado, sugiriendo la aplicación de esta metodología en pacientes atendidos en consultorios de clínica odontológica, lo cual podría contribuir a la detección de muchos más casos de infección por *Leishmania* de lo que normalmente se estima. Tomando en consideración lo anterior en el presente trabajo, se propone una metodología similar en la cual además de detectar infecciones por *Leishmania* en pacientes odontológicos, se advierte sobre el riesgo de adquirir tal infección durante la práctica profesional¹⁰.

2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.5.1 Principio de la técnica

Conocida como PCR por sus iniciales en inglés (Polymerase Chain Reaction). Es una técnica de amplificación de una secuencia específica de ADN en el laboratorio considerada como un proceso de multiplicación exponencial capaz de generar suficiente producto para la visualización; con una sola molécula, este procedimiento es capaz de generar más de un billón de copias de sí misma luego de 30 ciclos de replicación exponencial. Es una técnica ampliamente utilizada en áreas de la biología molecular, microbiología, ciencias médicas y forenses, epidemiología, industria de alimentos, entre otros. Mediante esta técnica, se lleva a cabo una síntesis continua de ADN ³⁵.

2.5.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), implica una síntesis continua de ADN *in vitro* combinando en un tubo de ensayo una muestra de ADN problema, oligonucleótidos específicos (*iniciadores o primers*), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), una polimerasa (enzima Taq polimerasa) en un tampón apropiado (buffer y MgCl₂) para la elongación de los oligonucleótidos por la polimerasa. Este proceso consta de 3 pasos, con temperaturas y tiempos diferentes repetidos sucesivamente que, le permiten a la polimerasa actuar en una sucesión de ciclos sin inactivarse, los cuales se describen a continuación y se pueden apreciar en la Figura 5.

1. *Desnaturalización*: En este paso el templado es sometido a altas temperaturas permitiendo la exposición de la secuencia de ADN blanco de amplificación.

2. *Alineamiento*: Durante esta etapa, la temperatura es disminuida con el fin de que los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) reconozcan y se apareen con sus secuencias complementarias presentes en el blanco de la reacción,

proporcionando un extremo hidroxilo 3' libre como sustrato para la enzima sintetizadora de ADN (ADN polimerasa).

3. *Extensión, síntesis o elongación*: En esta fase se formará una molécula de ADN por cada oligonucleótido apareado, cuya secuencia es idéntica a la del ADN blanco de amplificación (Fig.5).

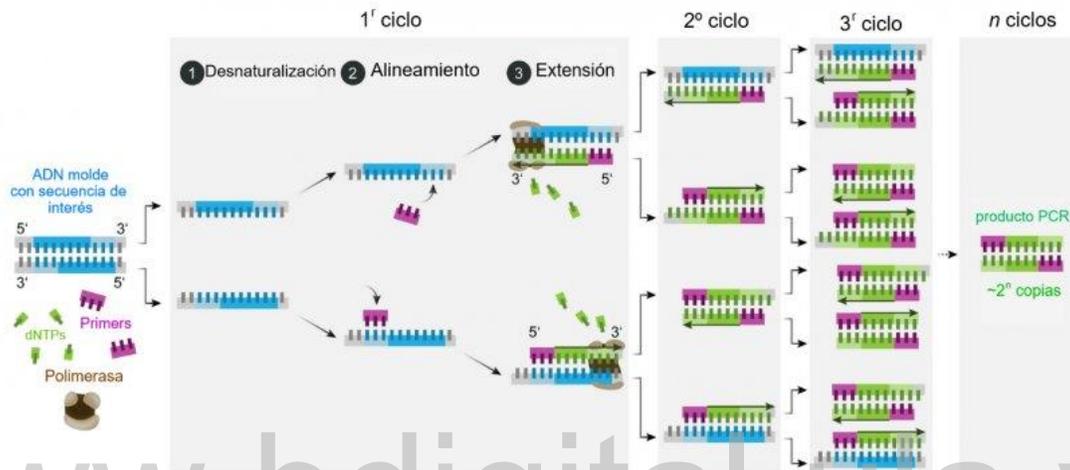


Figura 5. Esquema de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tomado de https://www.3tres3.com/latam/articulos/test-pcr-como-herramienta-de-agnostico-1-2-principios-basicos_14136/

La PCR como técnica molecular, posee características especiales que la hace útil en la identificación y diagnóstico debido a su especificidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad. Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de género; caracterización de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual de un organismo.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación

Según los criterios de Hernández et al ³⁶, esta investigación tiene un enfoque cuantitativo ya que pretende realizar la medición y análisis de datos numéricos obtenidos a través de la identificación ADN de *Leishmania* en saliva de pacientes infectados con leishmaniasis cutánea. A su vez, este estudio cuenta con un alcance descriptivo ya que fue determinada la presencia de ADN de *Leishmania* en pacientes post tratamiento leishmanicida.

3.2. Diseño de investigación

Diseño no experimental, longitudinal-prospectivo³⁶, ya que se evaluó la presencia de *Leishmania* en pacientes infectados a través de la toma de muestra de saliva y posterior análisis mediante la técnica de PCR con el fin de determinar la presencia del parásito post tratamiento leishmanicida (pacientes cicatrizados), el cual se realizó en el laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba”, Facultad de Ciencias U.L.A.

3.3. Población

Estuvo conformada por pacientes diagnosticados con leishmaniasis cutánea, luego de un respectivo muestreo donde fueron seleccionados pacientes inequívocamente positivos a tal patología, quienes acudieron al laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba” Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida - Venezuela.

3.4. Muestra

Fueron estudiados un total de 12 pacientes con lesiones cicatrizadas de leishmaniasis cutánea, tomándoles muestras de saliva post-tratamiento anti-*Leishmania*; a juicio de expertos y asesores de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba”, Facultad de Ciencia de la Universidad de Los Andes y como muestra control fueron tomados 5 pacientes que acudieron a la clínica de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes.

3.5. Técnica e instrumentos de recolección de datos.

Para cumplir con este requisito fueron utilizadas fichas de evaluación que constan de tres partes (Anexo 1):

- Datos personales del paciente, incluyendo nombre, edad, sexo y procedencia.
- Tiempo transcurrido post-tratamiento leishmanicida.
- Resultado de la técnica de PCR.

3.6 Aspectos bioéticos

El estudio cumplió con lo establecido en la declaración de Helsinki ³⁷, en una investigación médica, en la cual se exige que es deber del profesional proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano, por tal razón, los individuos que conformaron el estudio de fueron previamente informados de manera sencilla sobre los objetivos, los alcances, métodos y confiabilidad de la investigación y que voluntariamente aceptaron participar en el estudio.

Se respetó el derecho de los pacientes a proteger su identidad, así como la confidencialidad de la información que aporten los mismos. Para ello se utilizó un formato de consentimiento informado utilizado como rutina en el laboratorio donde se realizó el respectivo muestreo (Anexo 2).

Por lo anterior es importante recalcar que en esta investigación:

- No hubo conflictos de interés.
- Se realizó un protocolo adecuado al momento de la manipulación de las muestras.
- Se respetó la integridad de los resultados.
- Los aspectos éticos son inherentes a describir exhaustivamente el protocolo respetando los resultados para que puedan ser confiables y replicables de tal manera que no sean alterados a conveniencia del investigador.

3.7 Presencia de cicatriz a diferentes periodos post tratamiento

Posterior a la anamnesis del paciente y su valoración clínica, cada uno fue clasificado en los diferentes periodos post tratamiento, se confirmó la cicatrización de la lesión previamente tratada, registrándose el tiempo entre el alta clínico y la toma de muestra de saliva para la realización del presente estudio.



Figura 6. Cicatrices de paciente seleccionado para el estudio. La misma refleja el tamaño de las lesiones causadas por la infección por *Leishmania*.
Fuente: Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba" U.L.A.

3.8 Muestreo, detección e identificación de ADN de *Leishmania* en muestra de saliva de pacientes con leishmaniasis cutánea

Las muestras de saliva fueron colectadas de la siguiente manera, 1mL del fluido salival fue colectado en tubos de centrifuga estériles de 15mL y conservados a -20°C, hasta su uso. Como quedo dicho, para los fines del presente estudio, las muestras fueron colectadas y procesadas tiempo después del tratamiento, una vez la lesión fuera considerada como epitelializada o cicatrizada.

Para la extracción de ADN a partir de la muestra de fluido salival, se siguió el siguiente procedimiento: para un volumen de 100µL de muestra de saliva, fueron añadidos 250µL de buffer Digsol® y 5µL (20 mg/mL) de la enzima proteinasa K, agitadas con un Vortex durante 30segundos y luego incubada a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, en un microtubo de centrifuga de 1,5mL (Eppendorf®) fueron añadidos 300µL de acetato de amonio (4M) y agitado vigorosamente en Vortex por 30segundos, lo cual fue repetido durante 15minutos, luego centrifugado durante 15minutos a 14.000 RPM a 10°C, transfiriéndose el sobrenadante a un nuevo microtubo de centrifuga estéril. Seguidamente, al sobrenadante le fue agregado 1mL de etanol al 100%, homogenizado invirtiendo el tubo muy suavemente para precipitar el ADN, centrifugándolo por 15minutos a 14.000 RPM. Inmediatamente después, el sobrenadante fue vertido y sacado con pipeta agregándosele 1mL de etanol frio al 70%, procediéndose de nuevo a centrifugar los microtubos 15minutos a 14.000 RPM y descargando el etanol. El ADN de la muestra en el pellet resultante, fue secado en un concentrador Speed-Vac durante 15minutos y resuspendido en 100 mL buffer-TE (Tris-EDTA) y almacenado a -20°C, para futuros análisis, para la identificación de *Leishmania* en las muestras procesadas.



Figura 7. Toma e identificación de muestra de saliva de paciente seleccionado para el estudio.

Fuente: Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba" U.L.A.

3.9 Caracterización molecular de la especie de *Leishmania* detectada mediante ensayos de PCR.

Con la finalidad de determinar la presencia e identificación del ADN de *Leishmania* en muestras tomadas de saliva en los pacientes seleccionados, fue llevado a cabo un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores (primers) obtenidos de secuencias de los genes del miniexón. Los primers y sus secuencias fueron los siguientes:

- **LU-5A** 5' TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC 3'
- **LB-3C**- 5' CGT SCC GAA CCC CGT GTC 3'
- **LM-3A**- 5' GCA CCG CAC CGG RCC AC 3'

Siguiendo la metodología de un PCR multiplex de un solo paso, registrado con éxito para caracterizar los complejos de *Leishmania braziliensis* (LB) y *Leishmania mexicana* (LM) que circulan en el subcontinente latinoamericano y estandarizado para las leishmanias que circulan en la región andino-venezolana, incluyendo las especies responsables de la mayoría de los casos detectados en el estado Mérida, en el centro diagnóstico donde se llevó a cabo el presente trabajo. Asimismo, se compara con un primer Universal para indicar que se trabaja en el rango de identificación del género *Leishmania*³⁸⁻³⁹. La mezcla de reacción se

dispensó utilizando un kit de Tag-Polimerasa master green y se agregó 2 μ L del ADN extraído de la saliva de paciente, a cada tubo de reacción. Posteriormente el PCR fue realizado en un termociclador C1000 touch de BIO-RAD, protocolo que se muestra en la Tabla 1.

Tabla N.- 1 Protocolo aplicado al termociclador para PCR multiplex

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 minutos	1
95	30 segundos	30
54	45 segundos	
72	30 segundos	
72	5 minutos	1
4	∞	1

Finalizada la reacción de PCR los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% de 20 pozos al que se agregó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), un control positivo, un control negativo, un control de reacción (H₂O) y el amplificado de las muestras de pacientes. El gel se corrió a 80 voltios durante 45 minutos.

Al terminar el proceso de corrida del gel de agarosa, se coloreó con bromuro de etidio (1mg/mL) durante 5 minutos, para decolorar se sumergió en agua destilada durante 30 minutos y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline). El producto amplificado debe tener un tamaño de 148pb, el registro fotográfico se realizó con una cámara digital Kodak-Edas 290.

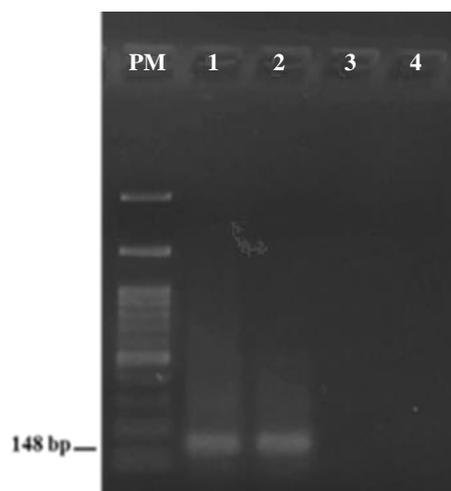


Figura 8. Amplificación de ADN de *Leishmania braziliensis*.

PM. Marcador de 100pb.

Línea 1. Muestra de saliva.

Línea 2. Control Positivo de biopsia de lesión por Leishmania.

Línea 3. Control Negativo.

Línea 4. Control interno de reacción (H2O).

www.bdigital.ula.ve

3.10 Plan de análisis de los resultados

Para el procesamiento de los resultados fue realizado un análisis descriptivo de los datos suministrados por las fichas de evaluación y las muestras que se procesaron mediante la técnica de PCR, en las cuales fue detectada la presencia de ADN-*Leishmania* en saliva de pacientes con leishmaniasis cutánea que habían recibido tratamiento leishmanicida y evidencia de cicatrizado a diferentes tiempos post tratamiento³⁵.

CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

Los pacientes incluidos en el presente trabajo fueron seleccionados de una cohorte de individuos que, habiendo sufrido de leishmaniasis en los últimos 20 años, fueron diagnosticados y específicamente tratados en el Centro de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba”, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. De ese grupo fue seleccionada una muestra con la finalidad de cumplir con el propósito expuesto y realizado durante el trabajo que aquí se propuso. No obstante, haber seleccionado los pacientes bajo estudio, a diferentes periodos post tratamiento, para cumplir con la detección de ADN de *Leishmania* en saliva utilizando ensayos de PCR, en cada uno de ellos fueron registrados los métodos diagnósticos utilizados en la fecha respectiva, una vez constatados en el historial de pacientes archivados en el referido centro. Asimismo, toda la información fue corroborada una vez que, cada uno de los pacientes involucrados en el estudio fue citado y entrevistado antes de la toma de muestra de saliva utilizada en el presente trabajo.

4.1.1. Detección de ADN de *Leishmania braziliensis* en muestra de saliva de pacientes con leishmaniasis a diferentes periodos post tratamiento leishmanicida

Un total de 17 individuos fueron muestreados durante la realización del presente trabajo, 12 (71%) de la casuística de leishmaniasis registrada en el laboratorio de Investigaciones Parasitológicas de la Facultad de Ciencias y 5 (29%) en pacientes muestreados en la cátedra de cirugía de la Facultad de Odontología. En el primer grupo fueron incluidos 9 pacientes (53%) cuyas muestras de saliva fueron colectadas a diferentes tiempos de haber sido tratados con un compuesto antimonial leishmanicida, presentando todos registros de cicatrización de la lesión original. Estos incluyen, 1 paciente con 1 mes post tratamiento, 3 con 12 meses de haber cicatrizado, 2 con más de 4 años (55 y 58 meses), otros 2 con 5,1

y 5,5 años y un último con 8 años de haber recibido tratamiento. Asimismo, se incluye muestras tomadas a 1 paciente con lesión activa, otro caso sin lesión, proveniente de una localidad donde la leishmaniasis es endémica, sin recibir tratamiento y, un caso como control negativo de área endémica. El muestreo de pacientes fue completado con 5 pacientes atendidos en la cátedra de cirugía, todos provenientes de localidades no endémicas de Mérida, cuyas muestras arrojaron resultados negativos para ADN de *Leishmania*, una vez fueran sometidas al mismo procedimiento que los correspondientes al centro diagnóstico específico para leishmaniasis con el fin de compararlos con los individuos tratados y cicatrizados. Detalles de los resultados obtenidos en las muestras mencionadas se presentan en la Tabla 2, en la cual se estima un tiempo post tratamiento promedio de 41 ± 31 meses y un rango de 1-96 meses, transcurridos antes del presente estudio.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2. Detección de ADN de *Leishmania braziliensis* en muestra de saliva de pacientes a diferente tiempo post tratamiento leishmanicida y observación comparativa entre muestras de individuos de áreas endémicas y no endémicas del estado Mérida.

Identificación paciente	Fecha toma muestra de saliva	Tiempo muestreo de saliva post-tratamiento	Característica de lesión	Resultado ensayo de PCR
JFT-MA-23	20.04.2024	1 mes	Cicatrizado	+
JFT-RG-22	15.02.2024	1 año	Cicatrizado	+
JFT-JMB-22	17.11.2023	1 año	Cicatrizado	+
JFT-EA-22	15.11.2023	1 año	Cicatrizado	+
JFT-CS-19	15.11.2023	4,5 años	Cicatrizado	+
JFT-HB-19	12.03.2024	4,8 años	Cicatrizado	+
JFT-MIP-18	15.11.2023	5,1 años	Cicatrizado	+
JFT-CB-18	15.12.2023	5,5 años	Cicatrizado	+
JFT-FB-15	15.12.2023	8 años	Cicatrizado	+
JFT-MA-23	20.04.2024	Control positivo	Lesión activa	+
JFT-YM-23*	15.12.2023	Sin tratamiento/sin lesión	Subclínico*	+
JFT-GT-23	25.01.2024	Negativo de área endémica	Control negativo	-
FOULA-1	24.04.2024	Paciente área no endémica	Sin lesión	-
FOULA-2	24.04.2024	Paciente área no endémica	Sin lesión	-
FOULA-3	24.04.2024	Paciente área no endémica	Sin lesión	-
FOULA-4	24.04.2024	Paciente área no endémica	Sin lesión	-
FOULA-5	24.04.2024	Paciente área no endémica	Sin lesión	-
Total:17 muestras		X:41±31meses (Rango:1-96meses)		

*: Paciente asintomático proveniente de área donde la leishmaniasis es endémica

En relación con la amplificación de ADN de *Leishmania* en muestras de saliva tomadas de pacientes, quienes habían sufrido lesiones activas y recibido tratamiento leishmanicida a diferentes tiempos del presente estudio, los resultados revelaron en todos los casos positividad a la presencia de *Leishmania braziliensis* con la técnica utilizada.

Cada muestra positiva amplificó una banda de 148 pares de bases, lo cual coincide con los resultados obtenidos durante el reconocimiento de la especie del parásito causante de las úlceras activas de las lesiones originales sufridas por los pacientes seleccionados. Tal similitud fue observada en todas las muestras de pacientes analizados entre 1 mes y 8 años post tratamiento, lo cual demuestra el largo periodo de persistencia de la especie de *Leishmania* causante de las lesiones originales a tiempos distintos después del tratamiento específico.

Estos pacientes no habían sufrido reactivación de lesiones, ni reinfección debida a otra especie de *Leishmania* causante de LC. Detalles de los presentes resultados, incluyendo la identificación de *Leishmania braziliensis* en las muestras de saliva de cada paciente incluido en el estudio, a diferente tiempo post tratamiento. Asimismo, se muestra resultados de un grupo de pacientes muestreados en la cátedra de cirugía de nuestra facultad, todos sin lesiones aparentes y provenientes de distintos lugares de la ciudad de Mérida, quienes resultaron negativos para la amplificación de ADN de *Leishmania*, tomados como muestras comparativas con otra negativa de región endémica para leishmaniasis y con el contingente positivo estudiado durante el desarrollo del presente trabajo. Detalles de lo expresado se muestra en la Figura 9.

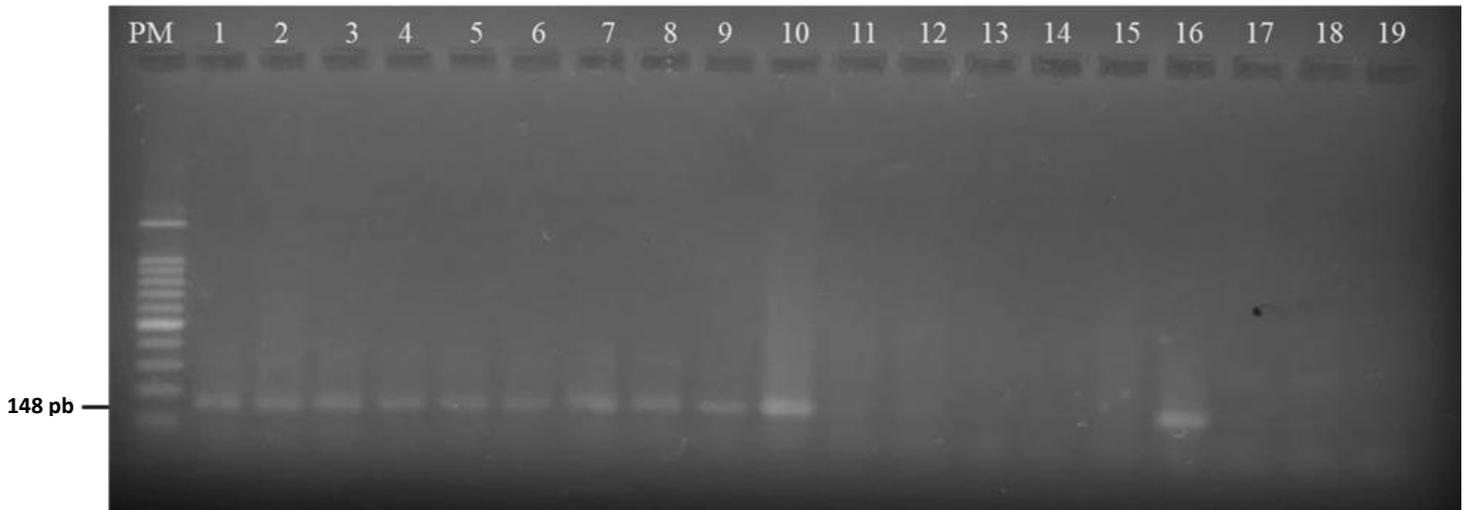


Figura 9. Demostración de la presencia de ADN de *Leishmania braziliensis* en muestra de saliva de pacientes a diferente tiempo post tratamiento.

PM: Marcador molecular de 100pb.

Líneas 1-9: Muestras de saliva de pacientes post tratamiento.

Línea 10. Paciente positivo sin lesión de área endémica.

Líneas 11-15: Muestra de saliva negativas tomadas de pacientes FOULA.

Línea 16: Control positivo de reacción (muestra de biopsia de lesión activa de paciente con leishmaniasis).

Línea 17: Control negativo de área endémica.

Línea 18: Control negativo (Individuo de área no endémica).

Línea 19: Control interno de reacción (H₂O).

4.2 DISCUSION

En el presente trabajo, utilizando un ensayo de PCR, se logró detectar e identificar específicamente ADN de *Leishmania* en muestras de saliva, tomadas en individuos que habían sufrido leishmaniasis cutánea (LC) y recibido tratamiento leishmanicida con cicatrización de lesiones, entre 1 mes y 8 años antes de la realización de este estudio. Para tener certeza sobre la veracidad de la identificación del organismo detectado en nuestro estudio, el muestreo de pacientes incluidos en el mismo fue llevado a cabo en individuos inequívocamente infectados con *Leishmania braziliensis*, previamente diagnosticados clínica, parasitológica, inmunológica y molecularmente quienes fueron regularmente reevaluados, a diferentes periodos post tratamiento, en la unidad diagnóstica que nos facilitó apoyo y asesoría para la realización del estudio, antes identificada.

Como lo revelan los resultados obtenidos, los ensayos de PCR realizados en los pacientes seleccionados para el muestreo de fluido salival, a diferentes tiempos post tratamiento, demostraron la presencia de ADN de *L. braziliensis* en todos, independientemente del tiempo transcurrido luego de producida la cicatrización de las respectivas lesiones. Estos hallazgos parecieran indicar que, la saliva es un destino habitual en las infecciones causadas por *Leishmania* luego de su distribución a diferentes partes del cuerpo desde el sitio de la lesión original. Asimismo, este resultado apoya previos hallazgos que incluyen saliva, otros fluidos corporales y estructuras tisulares de la cavidad bucal en pacientes que han sufrido LC^{5,9,13}.

Los presentes resultados también sugieren una característica biológica de las especies de *Leishmania* que producen LC, para invadir el fluido salival y otros tejidos a partir de la lesión primaria como un recurso del parásito en busca de refugio en resguardo de la respuesta inmune del hospedador, lo cual le permite un largo periodo de persistencia como se observa en este estudio y en otros

similares, involucrando otras especies de la familia *Trypanosomatidae* a la que pertenece el género *Leishmania*^{4,9,14,29}.

Lo anterior parece indicar que la presencia de ADN de *Leishmania* en el fluido salival de hospedadores humanos, es un fenómeno de larga duración, el cual puede ser fácilmente detectable, utilizando técnicas moleculares altamente sensibles y específicas como los ensayos de PCR, demostrado en este estudio. Por tal razón, basados en los presentes hallazgos, así como en la exactitud, facilidad de uso y el bajo costo de aplicación de esta prueba molecular en el fluido salival, podría considerarse una herramienta de rutina diagnóstica para identificación específica de ADN de *Leishmania* en pacientes con LC y otras formas de la infección como la leishmaniasis visceral. Asimismo, esta metodología podría servir para revelar infecciones subclínicas en poblaciones afectadas por este flagelo y contribuir, a su vez, a develar infecciones ocultas de esta subestimada enfermedad en áreas geográficas donde la misma es endémica^{3,26,27,31}.

Corroborando los hallazgos del presente trabajo, existen reportes llevados a cabo en la Facultad de Odontología-ULA en previas oportunidades y relacionados con problemáticas estudiadas en el mismo centro diagnóstico que nos ha brindado su colaboración, con la misma filosofía de trabajo y la misma preocupación científica. Al respecto, existe un estudio realizado en pacientes con enfermedad periodontal crónica, quienes habían sido tratados por presentar LC entre 5 y 10 años, previo a la demostración de persistencia de ADN de *Leishmania* en 7 de los 10 (70%) pacientes estudiados, demostrado por una robusta amplificación del producto de PCR⁴⁰, los autores refieren una avanzada enfermedad periodontal albergando infección por *Leishmania* sin efectos aparentes relacionados con leishmaniasis, asomando recomendación para evitar terapia con esteroides u otra droga inmunosupresora. De la misma manera, llaman la atención sobre la posibilidad de infección profesional a partir de

pacientes infectados, recomendando se considere a la leishmaniasis como riesgo de infección cuando se practica el diagnóstico diferencial de infecciones orales y dentales de pacientes provenientes de áreas donde la leishmaniasis es endémica⁴⁰, lo cual es confirmado con los resultados de nuestro estudio. Además de las referidas lesiones cutáneas, existen reportes sobre detección de *L. braziliensis* en muestras de lesión mucosa crónica con años de evolución clínica, habiéndose observado perforación del tabique nasal sin haberse evidenciado lesión cutánea sugestiva de leishmaniasis. Sin embargo, exámenes realizados en laboratorio de diagnóstico especializado revelaron la presencia de amastigotes de *Leishmania*, habiéndose identificado la presencia de *L. braziliensis* utilizando ensayos de PCR concluyéndose como un caso de leishmaniasis mucocutánea de vieja data con baja respuesta inmunológica a juzgar por resultados negativos a pruebas de IDR y a anticuerpos anti-*Leishmania*, llamándose la atención sobre el riesgo potencial de casos similares⁴¹.

Recientemente, en un grupo de pacientes con lesiones activas causadas por *L. braziliensis*, fue detectada la presencia de ADN del parásito en muestras de saliva antes, durante y después del tratamiento leishmanicida, indicando la frecuente invasión al fluido salival, lo cual se corrobora en el presente trabajo en pacientes años después de aplicada la terapia y ocurrido el proceso de cicatrización sin haberse observado señales de recidivas o reinfecciones posterior a la infección primaria⁶.

Finalmente, y para demostrar estrategias similares en otras especies de parásitos de la familia *Trypanosomatidae* a la cual pertenecen las especies del género *Leishmania*, se registra el hallazgo de persistencia de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, en individuos seropositivos previamente diagnosticados como pacientes chagásicos crónicos, presentando ADN de *T. cruzi* en biopsias tomadas de focos gingivales inflamatorios procesados por PCR, en un 23% de las muestras estudiadas. Estos hallazgos junto con otros

demostrando ADN de *T. cruzi* en muestras de fluido crevicular en pacientes chagásicos crónicos parece indicar que la invasión de parásitos de esta familia y posiblemente de otras por estudiar nos advierte la necesidad de estar alerta sobre estas infecciones en el campo de estudio del profesional de la odontología en todas sus especialidades^{8,10}.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

5.1 CONCLUSIONES

1. El ensayo de PCR, permite detectar e identificar específicamente ADN de *Leishmania* en muestras de saliva, años después del tratamiento leishmanicida y cicatrización de la lesión primaria.
2. El fluido salival es un destino habitual en las infecciones causadas por *Leishmania* luego de su distribución desde el sitio de la lesión primaria.
3. La dispersión de *Leishmania* es una característica biológica para invadir el fluido salival, líquido crevicular y otros tejidos de la cavidad bucal, que permite evadir la respuesta inmune del hospedador, logrando largos periodos de persistencia, compartida con otras especies de la familia *Trypanosomatidae* a la cual pertenece el género *Leishmania*.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Es de suma importancia tratar todo paciente proveniente de áreas donde la leishmaniasis es endémica que acuda a nuestra consulta, como un paciente de alto riesgo, sin olvidar utilizar las barreras de protección, poniendo en práctica los principios de control de infección impartidos en nuestra FOULA.
2. Hacer consciente al personal sobre la existencia en la región de la leishmaniasis sabiendo que, aunque con largo tiempo transcurrido, luego de su cicatrización la persistencia parasitaria es común en el hospedador humano.
3. A través de la anamnesis indagar sobre la procedencia del paciente y estar en capacidad de poder sospechar clínicamente sobre la presencia potencial de esta enfermedad olvidada en un contexto de la salud pública de la región.

REFERENCIAS

1. Garnham PCC, 1987. Book Introduction In: W. Peters and R. Killick-Kendrick Editors. The Leishmaniasis in Biology and Medicine Volume 1. Academic Press. London, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
2. Scorza J.V., Valera M., Moreno E., Jaimes R. (1983). Encuesta epidemiológica sobre Leishmaniasis cutánea. Un estudio en Mérida Venezuela. Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 95:118-123.
3. Lee YH, & Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. Am J Dent. 2009; 22(4): 241-8.
4. Felinto de Brito M.E., Lima Almeida E., Rapela Medeiros A.C., Pereira Werkhäuser R., de Almeida Alexandre J.L., Santos Lima-Figueiredo B., Gomes Rodrigues E.H., Pinto Brandão-Filho S. 2018. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 113(4): e170250.
5. Corvalan F, Sampaio R, Brustoloni Y, et al., 2011. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases ISSN 1678-9199, volume 17 issue 1 pages 98-102.
6. Añez N, Crisante G, Rojas A. (2023). Use of PCR assay to detect *Leishmania*-DNA in saliva from patients suffering American Cutaneous Leishmaniasis. Rev Biomed 2023; 34 (2).
7. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, González N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramírez JL. 1999. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg.;60:726–732.
8. Añez N, Crisante G, Caraballo F, et al. 2011. *Trypanosoma cruzi* persistence at oral inflammatory foci in chronic chagasic patients. Acta Trop.;117(3):207-11.

9. N. Añez, G. Crisante, A. Rojas, S. Araujo, A. Liuzza, J. Mesa, H. Parada (2015) A follow-up study of chagasic patients with special reference to *Trypanosoma cruzi* persistence and criteria of Chagas disease cure. *Int. J. Clin. Med. Res.*, 2 (3), pp. 20-29.
10. N. Añez, G. Crisante, A. Rojas, R.O. Rojas, J. Bastidas (2016). A new acute oral Chagas disease outbreak in Merida, Venezuela: a comprehensive study. *Int. J. Clin. Med. Res.*, 3 (1), pp. 29-37.
11. Carrasco HA, Añez N, Percoco G, et al. persistence of myocardial *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: (Suppl C): 210C.
12. Carrasco, H., Añez, N., Percoco, G., González, N., Ramírez, J.L., Crisante, C., Rojas, A. Parada, H., Fuenmayor, C., 2000. Myocardial *Trypanosoma cruzi* parasitism is constant in chronic chagasic patients. *Revista de Investigación y Clínica Pediátrica*. Vol 1. Num 1., abril, mayo, junio, 2000.
13. Steverding. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* (2017) 10:82. DOI 10.1186/s13071-017-2028-5.
14. Guevara P., Ramírez J. L., Rojas E., et al 1993. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet*, 341:1341.
15. Añez N., Rojas A., Scorza J., et al., 2018. Successful treatment against American cutaneous leishmaniasis by intralesional infiltration of a generic antimonial compound-lidocaine combination. A follow up study. *Acta tropica*. ACTROP 4680.
16. Siriyasatien P, Chusri S, Kraivichian K, Jarivapan N, Hortiwakul T, Silpapaiakul K, et al. Early detection of novel *Leishmania* species DNA in the saliva of two HIV-infected patients. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 89.
17. Lainson R, & Shaw JJ. 1998. New World leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Vol. 5, Parasitology. Arnold, London, p.241-266.

18. Añez N, Cazorla D, Nieves E, *et al.*, 1988. Epidemiology of the cutaneous leishmaniasis in Merida Venezuela, diversity and dispersion of species of phlebotomine sandflies at different altitud and its possible role in the transmission of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Vol. 83 (4) 455-463.
19. Costa JML, Saldanha ACR, Nascimento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, *et al.* 2009. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. GM Bahia. 2009; 79(3): 70-83.
20. Weigle Kristen & Saravia Nancy, 1996. Natural History, Clinical Evolution, and the Host-Parasite Interaction in New World Cutaneous Leishmaniasis. Clinics in Dermatology, 14 (5) 433-450. Disponible [https://sci-hub.se/10.1016/0738-081x\(96\)00036-3](https://sci-hub.se/10.1016/0738-081x(96)00036-3)
21. Sendino A, Barbado J, Mostaza J, *et al.*, 1990. Visceral Leishmaniasis with Malabsorption Syndrome in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. The American Journal of Medicine. 89 (5) 673-675. Disponible [https://sci-hub.se/10.1016/0002-9343\(90\)90188-j](https://sci-hub.se/10.1016/0002-9343(90)90188-j)
22. Altes J, Salas A, Riera M, *et al.*, 1991. Visceral leishmaniasis another HIV-associated oportunist infection Report of eight cases and review of the literature. SIDA 5:201-207.
23. Mabrahtu Yb, Van Eys E, Guizani I, Lawyer P, Pamba H, Koech D, *et al.*, 1993. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* s.l. in Kenya. Trans Roy Soc Trop Med H y g, 1993, 87 (5): 598-601
24. Fahal AH, El Hag IA, El-Hassan AM, Hashim FA. 1995. Leishmanial cholecystitis and colitis in a patient with visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 284.
25. Hill, K. L., N. R. Hutchings, D. G. Russell, and J. E. Donelson. 1999. A novel protein targeting domain directs proteins to the anterior cytoplasmic face of the flagellar pocket in African trypanosomes. J. Cell Sci. 112:3091–3101.

26. Mohammad Javaid, Ahad Ahmed, Robert Durand, *et al.*, 2015. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of oral biology and craneofacial research*. 6, 66-75.
27. Atchara Phumee, Kanyarat Kraivichain, Sarunyou Chusri, *et al.*, 2013. Detection of *Leishmania siamensis* DNA in Saliva by Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 89(5): 899–905. Disponible <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820333/>
28. Netranapha Pandey, Suradej Siripattanapipong, Saovanee Leelayoova, *et al.*, 2018. Detection of *Leishmania* DNA in saliva among patients with HIV/AIDS in Trang Province, southern Thailand. Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
29. Guevara P, Rojas E, González N, Scorza JV, *et al.* 1994. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diag Lab Immunol* 1994; 1: 385-389.
30. Añez N., González C., Lugo de Yarbuh A., *et al.*, 2000. Association of trauma with *Leishmania spp.* parasite recall. Clinical and experimental evidences. *Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental*. Vol XI, N 1 y 2.
31. Pereira Lima Daniela, Garcia Diniz Diego, Suzely Adas, *et al.*, 2010. Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases* 14, e184–e188.
32. Cantos-Barreda, A., Escribano, D., Bernal, L., *et al* 2017. *Quantification of anti- Leishmania* antibodies in saliva of dogs. *Veterinary Parasitology*, 242, 54–58. doi:10.1016/j.vetpar.2017.05.017.
33. Hernández Castañeda, A., & Aranzazu Moya, G. (2012). Características y propiedades físico-químicas de la saliva: una revisión. *Ustasalud*, 11(2),102-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.15332/us.v11i2.1123>

34. Cella Conter Carolina, Herintha Coeto Neitzke-Abreu, Raissa Bocchi Pedroso, *et al.*, 2015. Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in leucocytes from the blood of patients with cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(5):626-628. Disponible <https://sci-hub.se/10.1590/0037-8682-0052-2015>
35. Dávila J., Koudeir S., 2016. Detección de persistencia de *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos crónicos mediante estudio molecular en muestras de fluido crevicular de focos inflamatorios gingivales. Tesis de pregrado, Mérida-Venezuela. Universidad de Los Andes.
36. Hernández Sampieri R., Fernández Collado C., Baptista Lucio P. 2010. Metodología de la investigación. 5ta ed. México D.F.: Mc Graw Hill; 2010. 83-143p.
37. Declaración de Helsinki, última actualización en Fortaleza 2013. <http://www.iacs.aragon.es/econocimiento/documentos/ceica/2013-declaracion-helsinki-brasil.pdf>
38. Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., Agabian, N., 1998. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1989e1995.
39. Rojas, A., Crisante, G., García, P., Carrero, J., Añez, N., 2015. *Leishmania braziliensis*-GPI anchored membrane proteins as an alternative tool for specific sero-diagnosis of active American cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Microbiol. Biotech.* 2 (4), 57–63.
40. Premoli G., González N., Añez N, *et al.*, 2002 PCR detection of specific *Leishmania*-DNA in patients with periodontal disease. *Pathologica.* 94:28-31.
41. Añez N, Rojas A, Crisante G, Jerez M, 2012. Detección de *Leishmania braziliensis* en lesión mucosa con 16 años de evolución: registro de un caso. *Bol Malariol Salud Ambient* 52: 15–29.

42. Montalvo C., Fraga J., Monzote L., García M., Fonseca L., 2012. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. Rev. Cubana. Med. Trop. vol.64 no.2 Ciudad de la Habana. Mayo-ago. 2012.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Anexo 1

República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Odontología
Departamento de Medicina Oral
Cátedra de Anestesiología y Cirugía Estomatológica

Historia N°

Lugar y Fecha: _____



FICHA CLÍNICA

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Nombres: _____ Apellidos: _____
Edad: _____ Sexo: F M Estado Civil: _____ Ocupación: _____ Dirección: _____
Teléfonos: _____

II. MOTIVO DE CONSULTA: _____

HISTORIA DE LA ENFERMEDAD ACTUAL: _____

III. ANTECEDENTES PERSONALES:

A. ANTECEDENTES MÉDICOS

1. INFECCIOSOS: Sufre usted o ha sufrido enfermedades como Sífilis, HIV, Infecciones en riñón, corazón, pulmones, otros: SI NO Especifique: _____

2. PATOLÓGICOS: Sufre usted o ha sufrido de enfermedades Metabólicas: SI NO Cardiovasculares: SI NO Gastrointestinales: SI NO Genitourinarias: SI NO Neurológicas: SI NO Especifique: _____

3. ALÉRGICOS: Tiene alergia a algún medicamento, alimento o sustancia? SI NO ¿Cuál?: _____

4. QUIRÚRGICOS: ¿Alguna vez lo han operado? SI NO Causa: _____
¿Hubo complicaciones? SI NO Especifique: _____

5. HOSPITALARIOS: ¿Alguna vez lo han hospitalizado? SI NO Fecha: _____
Causa: _____

6. FARMACOLÓGICOS: ¿Ha estado tomando algún medicamento en los últimos tres meses? SI NO ¿Cuál? _____
Posología: _____

7. HEMATOLÓGICOS: ¿Alguna vez le han trasfundido sangre? SI NO Causa: _____
¿Sufre usted de equimosis, sangrados abundantes, retardada cicatrización? SI NO ¿Sabe la causa? _____
Grupo Sanguíneo: _____

8. TÓXICOS: ¿Fuma? SI NO ¿Bebe alcohol? SI NO Otras sustancias: _____

9. FAMILIARES: _____

10. EN CASO DE SER MUJER: ¿Esta embarazada? SI NO _____

OTROS NO ESPECIFICADOS: _____

B. ANTECEDENTES ODONTOLÓGICOS (QUIRÚRGICOS)

¿Le han realizado cirugías en su cavidad bucal? SI NO Tipo: _____
¿Hubo complicaciones? SI NO Especifique de que tipo (Infecciosas, hemorrágicas, cicatrización etc.) _____

IV. EXPLORACIÓN CLÍNICA

Peso: _____ Kg. Estatura: _____ Mts. IMC: _____

Extraoral: _____

Intraoral: _____

SIGNOS VITALES FC: _____ Temperatura: _____ Tensión Arterial: _____ FR: _____

RESULTADO DE EXÁMENES COMPLEMENTARIOS: _____

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO: _____

DIAGNÓSTICO: _____

Presencia de cicatriz

Número de cicatrices

Tiempo transcurrido de cicatrización _____

Anexo 2



GRUPO DE INVESTIGACIONES PARASITOLÓGICAS

“J.F. TORREALBA” ULA-MÉRIDA

“Detección de ADN *leishmania* en saliva”

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ identificado con la cédula de identidad N° _____, natural de _____, he sido informado que la muestra que se tomará el día de hoy, será utilizada en investigaciones orientadas a la detección de ADN de *Leishmania*, agente causal de Leishmaniasis.

Toda la información relativa a mi caso será manejada en forma de códigos para mantener la privacidad de los resultados de laboratorio, sobre los cuales tendrá acceso el médico tratante y mi persona. Los investigadores responsables podrán publicar a futuro dichos resultados garantizando la confidencialidad de mi identidad. De igual manera, autorizo el uso de la muestra para futuros proyectos de investigación relacionados al desarrollo y mejoramiento de nuevas técnicas de diagnóstico de esta enfermedad. Teniendo pleno conocimiento de ello doy mi consentimiento absolutamente voluntario para la utilización de la muestra extraída para las pruebas antes mencionadas.

En caso de dudas me comunicaré con el Dr. Nestor Añez Reverol al 0274-2401285.

En _____ a los ____ días del mes _____ del _____.

Firma del paciente o representante legal.

C.I:

Firma del investigador responsable

Dr. Nestor Añez Reverol

C.I:

Firma del Testigo

C.I: