



Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia Trypanosomatidae basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70

Jorge Fraga Nodarse ^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-9061-2550>

Ana M. Montalvo Alvarez ¹ <https://orcid.org/0000-0003-1248-6215>

Gert Van der Auwera ² <https://orcid.org/0000-0002-3742-7046>

Jean-Claude Dujardin ² <https://orcid.org/0000-0002-9217-5240>

José M. Requena ³ <https://orcid.org/0000-0003-3410-9488>

Stijn Deborggraeve ² <https://orcid.org/0000-0003-1501-5355>

Philippe Büscher ² <https://orcid.org/0000-0002-1926-7472>

Ilse Maes ² <https://orcid.org/0000-0001-8258-6479>.

Simone De Doncker ²

¹Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

²Department of Biomedical Science. Institute of Tropical Medicine Antwerp. Antwerp, Belgium.

³Departamento de Biología Molecular. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM). Madrid, España.

*Autor para la correspondencia: fraga@ipk.sld.cu

RESUMEN

Palabras clave

Trypanosomatidae; *Trypanosoma*; *Leishmania*; enfermedad de Chagas; enfermedad del sueño; filogenia; proteína de choque térmico 70

Introducción: Dentro de la familia Trypanosomatidae hay dos géneros de importancia médica por su papel como patógenos humanos, *Trypanosoma* y *Leishmania*. Dentro de estos géneros se encuentran especies y subespecies causantes de la leishmaniasis, la tripanosomiasis americana y la tripanosomiasis africana humana. Objetivos: En este estudio investigamos las relaciones filogenéticas de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* utilizando la secuencia del gen *hsp70* citoplasmática y discutimos las implicaciones para las definiciones de especies, la evolución y la taxonomía de estos géneros. **Métodos:** Se secuenció el gen de la HSP70 de 44 cepas de 11 especies de *Leishmania* y 41 cepas de 9 especies de *Trypanosoma* de diferentes orígenes geográficos. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias publicadas previamente en las bases de datos. El programa MEGA se utilizó para la construcción de distintos árboles filogenéticos basados en parámetros de distancia y caracteres. El soporte de los grupos monofiléticos se determinó por el método de *bootstrap*. **Resultados:** En el presente trabajo se utilizó por primera vez el gen de la *hps70* citoplasmática para estudios filogenéticos de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* y con ello se demostró la utilidad de utilizarlo como marcador molecular en el diseño de métodos para la detección, identificación y diferenciación de especies y linajes de *Leishmania* y *Trypanosoma*. Los resultados proporcionan evidencias que soportan la hipótesis de que el género *Leishmania* es originario del "nuevo mundo". **Conclusiones:** Los resultados de los estudios, basados en el análisis filogenético del gen que codifica las *hps70*, contribuyeron a la discusión sobre de un marco general de consenso taxonómico para los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*.



Contributions to the evolution and taxonomic classification of medical importance genus of the Trypanosomatidae family based on the phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene

ABSTRACT

Keywords

Trypanosomatidae; Trypanosoma; Leishmania; chagas diseases; sleeping sickness; phylogeny; heat shock protein 70

Introduction: Within the Trypanosomatidae family, there are two genera of medical importance for their role as human pathogens, *Trypanosoma* and *Leishmania*. Within these genera are species and subspecies that cause leishmaniasis, American Trypanosomiasis and Human African Trypanosomiasis. Objective. In this study, we investigated the phylogenetic relationships of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma* using the cytoplasmic hsp70 gene and we discussed the implications for species definitions, evolution and taxonomy of these genera. **Methods:** The hsp70 gene from 44 strains from 11 *Leishmania* species and 41 strains from 9 *Trypanosoma* species from different geographical origins were sequenced. The sequences obtained were aligned with the sequences previously published in the databases. The MEGA program was used for the construction of different phylogenetic trees based on distance and character parameters. The support of the monophyletic groups was determined by the "bootstrap" method. **Results:** For the first time, the cytoplasmic hsp70 gene was used in phylogenetic studies of the *Leishmania* and *Trypanosoma* genus and, with the results obtained, it was demonstrated that it is convenient to use it as a molecular marker for molecular methods design for detection, identification and differentiation of *Leishmania* and *Trypanosoma* species and lineages. Evidence is provided that supports the hypothesis that the genus *Leishmania* originated in South America ("New World"), thus contributing to the general discussion about the origin of this genus. **Conclusion:** This study actively contributed to discussing the implications of this analysis for the taxonomic framework for the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Trypanosomatidae hay dos géneros de importancia médica por su papel como patógenos humanos, *Trypanosoma* y *Leishmania*. Dentro de estos géneros se encuentran 21 especies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y subspecies de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei gambiensi* y *T. brucei rhodesiense*), agentes causantes de la leishmaniasis, la Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas) y la Tripanosomiasis Africana Humana (Enfermedad del sueño), respectivamente. En conjunto, estas infecciones afectan a más de 30 millones de personas en todo el mundo y representan un grave problema de salud pública, especialmente en África, América del Sur y Asia. Estas enfermedades son responsables de altas tasas de mortalidad y morbilidad en los países en desarrollo y tienen un impacto económico y social en las regiones afectadas. Entre los desafíos para el control de estas enfermedades se encuentra contar con métodos de diagnósticos sensibles y específicos más fáciles de utilizar, especialmente en áreas remotas donde estas enfermedades

son endémicas y que permitan la detección, identificación, diferenciación y caracterización de casos a mejor costo-efectividad. Sin embargo, para diseñar una herramienta diagnóstica fiable es importante llegar a un consenso sobre la clasificación taxonómica de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, ya que la validez del esquema de clasificación taxonómica de estos todavía se debate y el estado de algunas especies se cuestiona.

La clasificación taxonómica del género *Leishmania* se basa principalmente en criterios ecobiológicos como el vector, la distribución geográfica, el tropismo, las propiedades antigénicas y las manifestaciones clínicas⁽¹⁾. Se han propuesto esquemas taxonómicos jerárquicos utilizando categorías de subgéneros, complejos de especies, especies y subspecies. Los dos subgéneros (*L.*) *Leishmania* y (*L.*) *Viannia* se separan en función de su ubicación en el intestino del vector⁽¹⁾, y las especies dentro de los subgéneros generalmente se establecieron mediante Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE)⁽¹⁾, hasta la fecha la regla de oro. La validez del esquema de clasificación taxonómica ha sido cuestionado varias veces, y

el debate se centra en el estado de algunas especies como: *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) archibaldi*, *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) pifanoi* y *L. (V.) lainsoni* ⁽³⁾. Además, la posición taxonómica y la relación filogenética de *Leishmania* de lagartos sigue siendo incierta ⁽¹⁾. Por lo tanto, es necesario acordar un esquema práctico de clasificación taxonómica basado en conceptos confiables y consensuales. Una buena definición de las especies de *Leishmania* es crucial para el diagnóstico correcto y el pronóstico de la enfermedad, así como para tomar decisiones sobre el tratamiento y las medidas de control ⁽⁴⁾.

La clasificación taxonómica del género *Trypanosoma* se basa en la establecida por Hoare quien la basa en la morfología y el desarrollo del vector ⁽⁵⁾. Las especies de *Trypanosoma* que infectan mamíferos se separan en dos secciones: *Salivaria* y *Stercoraria*. Los *Trypanosomas* salivares se subdividieron aún más en cuatro subgéneros: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nanomonas* y *Pycnomonas*. La sección *Stercoraria* comprende tres subgéneros: *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* y *Herpetosoma* ⁽⁶⁾. Dado que algunos de estos grupos son polifiléticos y carecen de relevancia evolutiva y taxonómica, recientemente, algunos autores sugirieron clasificar el género *Trypanosoma* en clados filogenéticos basado en la subunidad pequeña ARNr (SSU-rRNA) y gliceraldehido 3'fosfato deshidrogenasa (gGAPDH) ⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Los estudios filogenéticos moleculares han sido y sigue siendo una técnica que dominan los estudios taxonómicos modernos. Recientemente se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación de eucariotas basados en datos de enfoques morfológicos modernos, vías bioquímicas y filogenia molecular.

Diferentes marcadores moleculares se han utilizado, dentro de ellos el gen que codifica la proteína de choque térmico 70 (HSP70), el que se ha utilizado como un marcador evolutivo importante en diferentes estudios de parásitos (*Cryptosporidium* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Microsporidium* spp. y *Blastocystis hominis*). Los genes que codifican la HSP70 citoplasmática se encuentran entre los primeros genes de Kinetoplastideos en ser clonados y caracterizados debido a su naturaleza conservada. Esta proteína es altamente conservada en secuencia y función, tiene una gran importancia como chaperona molecular, en el plegado de la proteína y como transporte. El gen se organiza en repeticiones en tándem de la cabeza a la cola y el número de copia depende de la especie ⁽¹¹⁾.

En este estudio investigamos las relaciones filogenéticas de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* utilizando la secuencia del gen *hsp70* citoplasmática y discutimos las implicaciones para las definiciones de especies, la evolución y la taxonomía de estos géneros.

MÉTODOS

Cepas o aislamientos de especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* utilizados en el estudio

Se utilizaron en el estudio ADN genómico procedente de 44 cepas o aislamientos de 11 especies de *Leishmania* y 41 cepas o aislamientos de 9 especies de *Trypanosoma* de diferentes orígenes geográficos, donados por diferentes laboratorios y que forman parte de la colección de la Unidad de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.

PCR-*hsp70*

Se amplificó un producto de PCR de 1422 pb de las cepas o aislamientos estudiados utilizando el juego de cebadores descritos por Garcia *et al.* ⁽¹²⁾. La mezcla de reacción (50 ml) contenía 1x de tampón de PCR que incluye 1,5 mM MgCl₂, 1x tampón Q, 200 μM de cada desoxinucleósido trifosfato, 0.5 U HotStarTaq Plus DNA polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania), 0,4 mM de cada cebador, y alrededor de 10 ng de ADN genómico aislado del cultivo de parásitos. Las condiciones en el termociclador fueron: desnaturalización inicial 95 °C por 5 min; seguido de 35 ciclos que consisten en 94 °C durante 40 s, 61 °C por 1 min, 72 °C por 2 min; y un paso final de extensión de 8 min a 72 °C. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 2 % y fueron secuenciados directamente sin clonación molecular

Secuenciación del gen *hsp70*

Se realizó la secuenciación de los productos de amplificación de la PCR-*hsp70* de las cepas o aislamientos de especies de *Leishmania* y *Trypanosoma*. A partir de las secuencias de 8 cebadores diseñados para este propósito ⁽¹³⁻¹⁴⁾, se secuenciaron ambas cadenas, excepto los 40 nucleótidos contenidos en los extremos correspondientes a la región complementaria a los cebadores de los que se secuenció una cadena solamente. Para obtener la secuencia se utilizó el juego "BigDye™ Terminator cycle-sequencing-ready-reaction kit" (Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) y el secuenciador automático ABI 3730 (Perkin Elmer). Para el análisis filogenético, solo la región entre los cebadores fue retenida, es decir, 1380 de los 1422 nucleótidos. Se obtuvo que la secuencia consenso de cada cepa estudiada utilizando el programa Clustal X ⁽¹⁵⁾ con ajuste manual. Las secuencias del gen *hsp70* adicionales se obtuvieron de la búsqueda en BLAST en las siguientes bases de datos: GeneDB (<http://www.genedb.org>), TritrypDB (<http://www.tritrypdb.org>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias publicadas previamente en las bases de datos (10 cepas

o aislamientos de *Leishmania* spp y 24 cepas o aislamientos de *Trypanosoma* spp), utilizando el paquete de software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 5.05, ⁽¹⁶⁾, www.megasoftware.net).

Las relaciones filogenéticas entre las distintas especies estudiadas, se analizaron en base a la información obtenida de las secuencias del gen *hsp70*, en comparación con dos cepas de *Trypanosoma* que se utilizaron como grupos externos para el análisis filogenético del género *Leishmania* y 14 especies de *Leishmania* y *Paratrypanosoma confusum* para el análisis del género *Trypanosoma*.

El programa MEGA se utilizó para la construcción de distintos árboles basados en parámetros de distancia (método de unión al vecino, "neighbor joining", utilizando el modelo Kimura-2 parameter, ⁽¹⁷⁾ y caracteres (máxima parsimonia, "maximum parsimony" ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾ y máxima verosimilitud, "maximum likelihood" ⁽²⁰⁾, este último bajo el modelo "general time reversible and gamma distributed"). Las distancias de las secuencias aminoacídicas fueron determinadas mediante el modelo "p-distance". El soporte de los grupos monofiléticos se determinó por el método de *bootstrap* ⁽²⁰⁾.

Utilizando las mismas secuencias nucleotídicas se construyó una red filogenética utilizando el método de "Neighbor-Net", modelo "p-distance" no corregido utilizando el programa SplitsTree4 ⁽²¹⁻²²⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuenciación y análisis del polimorfismo genético de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 1380pb del gen *hsp70* citoplasmático de 44 cepas y aislamientos de diferentes orígenes geográficos que pertenecen a 16 especies de *Leishmania*. Reportándose por primera vez para la secuencia de este gen para 11 especies de *Leishmania*: *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) garhnamii*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) chagasi* y *L. (L.) archibaldi*; para el resto de las especies se reportaron secuencias adicionales. Así mismo se obtuvo la secuencia de nucleótidos de 41 cepas y aislamientos de diferentes orígenes geográficos para 9 especies de *Trypanosoma*: *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. theileri* y *T. lewisi*. Reportándose por primera vez para las Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de *T. cruzi* TcIII, TcIV y TcV, además de *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiensi*, *T. equiperdum*, *T. theileri* y *T. lewisi*. Igualmente, para el resto de las especies, se reportaron secuencias adicionales. Para ambos géneros las secuencias obtenidas se depositaron en el Ban-

co de Genes (GeneBank). Para las cepas correspondientes a las diferentes especies de *Leishmania* los números de acceso son: FN395020-FN395056 y EU599090-EU599093, mientras que para las cepas correspondientes a las especies de *Trypanosoma* los números de acceso son: KC959988-KC960011, KP208734-KP208748 y KP257564-KP257565 ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Para el género *Leishmania*, el fragmento del gen *hsp70* es rico en guanina-citosina (GC) (63,6-65,4 %), con una similitud entre las secuencias analizadas entre 94,1 y 99,8 %. La variación de la secuencia nucleotídica es suficiente para discriminar especies de parásitos: 148 posiciones nucleotídicas polimórficas (11 %) y 111 posiciones nucleotídicas parsimoniosamente informativas (8 %), lo que significa que al menos dos nucleótidos diferentes están presentes, cada uno encontrado en al menos dos secuencias. Las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas (459 aminoácidos) revelaron sustituciones en 43 posiciones (9 %), de los cuales 39 sitios (8 %) son parsimoniosamente informativos ⁽¹³⁾.

Para el género *Trypanosoma*, el fragmento del gen *hsp70* es igualmente rico en guanina-citosina (GC) (de 55,8 % a 65,6 %), con una similitud entre las secuencias analizadas entre 75 % y 100 %. La variación de la secuencia nucleotídica es suficiente para discriminar especies de parásitos: 526 posiciones nucleotídicas polimórficas (29,8 %) y 412 posiciones nucleotídicas parsimoniosamente informativas (29,8 %). Las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas (459 aminoácidos) revelaron sustituciones en 132 posiciones (28,8 %), de los cuales 83 sitios (18,1 %) son parsimoniosamente informativos ⁽¹⁴⁾.

La variación identificada entre las especies de *Leishmania* y entre las especies de *Trypanosoma* apoyadas en la existencia de sitios parsimoniosamente informativos, habla de que el gen es un marcador molecular apropiado para la tipificación de especies, subespecies y linajes de ambos géneros ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Al analizar la relación entre el número de sustituciones no sinónimas por sitios potencialmente no sinónimos (dN) y el de sustituciones sinónimas por sitios potencialmente sinónimos (dS), para ambos géneros resultó la relación dN/dS < 1 (*Leishmania* dN/dS = 0,30; *Trypanosoma* dN/dS = 0,08), lo que representa que este gen para ambos géneros está sujeto a una selección purificadora que ha permitido preservar la funcionalidad de la HSP70 ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Análisis filogenético del género *Leishmania*

La Figura 1 muestra el árbol filogenético construido a partir de las secuencias nucleotídicas utilizando el método de Unión al Vecino. Los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* forman un grupo monofilético, con *L. (Sauroleishmania)* rami-

ficándose en el medio como un taxón independiente. Dentro del subgénero *L. (Leishmania)*, el árbol muestra una distinción entre especies del Viejo y Nuevo Mundo ⁽¹³⁾.

El análisis filogenético soporta ocho grupos monofiléticos: *L. (L.) donovani* (Complejo *L. (L.) donovani*), *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* (Complejos *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) tropica*), *L. (L.) mexicana* (Complejo *L. (L.) mexicana*), *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* (Complejo *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis* (Complejo *L. (V.) braziliensis*). Estos grupos fueron también verificados en árboles filogenéticos construidos por los métodos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud, así como los árboles obtenidos basados en las secuencias aminoacídicas deducidas (datos no mostrados) ⁽¹³⁾.

Como se puede observar en la figura 2A, los mismos grupos que se identificaron por el análisis convencional se muestran en esta red. Una ampliación del grupo que comprende las especies del subgénero *L. Viannia* (figura 2B) muestran que *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana* se encuentran como subgrupos separados dentro de los complejos *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*, respectivamente. De la misma forma que se muestra como *L. (L.) infantum*, aparece como subgrupo separado dentro del complejo *L. (L.) donovani* (figura 2C). De ahí que concluyamos que las especies *L. (L.) infantum*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana* se encuentran como subgrupos separados dentro de los complejos *L. donovani*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis* respectivamente. Las especies *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) garnhami* no pueden distinguirse como entidades separadas (figura 2 C, D) ⁽¹³⁾.

Con vistas a corroborar los resultados obtenidos basados en el gen que codifica la HSP70 se realizó el análisis combinado de *hsp70*+proteína de choque termino pequeña 20Kda (*hsp20*). Las secuencias de los genes *hsp20* y *hsp70* de 42 cepas de diferentes orígenes geográficos, que representan 14 especies de *Leishmania*, se concatenaron y analizaron como mismo se realizó el análisis filogenético previo basado en el gen *hsp70*. De forma general se corroboraron los resultados obtenidos con el gen *hsp70*, con la excepción de que *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) tropica* se soportan como dos grupos distintos y pueden considerarse como dos especies separadas. De destacar, además, se corroboraron los resultados previos obtenidos donde hay una separación de *L. infantum* y *L. peruviana* como subgrupos dentro de los complejos *L. (L.) donovani* y *L. (V.) braziliensis*, respectivamente ⁽²³⁾.

Como resultados adicionales podemos señalar que por primera vez el gen de la HSP20 fue utilizado en estudios filogenéticos del género *Leishmania*, constituyendo un marcador molecular útil para este tipo de estudios ⁽²³⁾.

El análisis combinado de los genes *hsp70*+ 7 Spliced-Leader RNA (7SL-RNA)+ espaciadores internos de la transcrip-

ción (ITS) ARN ribosómico (ARNr) (rDNA ITS1)+ mini exón refuerza los resultados obtenidos con el gen *hsp70* (datos no mostrados). Los mismos grupos monofiléticos fueron encontrados con el análisis concatenado con la con la excepción de que *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) tropica*, aun cuando se soportan en un grupo monofilético con alto valor de "bootstrap" se soportan como dos grupos distintos y pueden considerarse como dos especies separadas, así como se había descrito anteriormente al combinar los genes *hsp70*+*hsp20*.

Como se ha presentado el análisis filogenético del gen *hsp70* agrupa a las especies del género *Leishmania* de mamíferos en ocho grupos monofiléticos. Los grupos corresponden a especies, o a los llamados complejos de especies. Cada uno de los ocho grupos obtenidos es discutido en detalle a continuación, junto con una vista alternativa sobre definiciones de especies basadas en el gen *hsp70* y el análisis concatenado.

- **Complejo *L. (L.) donovani*:** Este grupo comprende todas las especies causantes de leishmaniasis visceral (*L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. infantum*, y *L. chagasi*). En la Figura 2 queda claro que *L. infantum* y *L. chagasi* no pueden distinguirse una de la otra y comprenden un subgrupo dentro del grupo *L. donovani*. Estos resultados están de acuerdo con el análisis de microsatélites, RFLP, RAPD y secuenciación de ADN y esto es consistente con la reciente introducción de *L. infantum* en el Nuevo Mundo ^(2,24-26). Por su parte *L. archibaldi* se ha cuestionado como un taxón independiente ya que diferentes marcadores moleculares no lo distinguen de *L. donovani* ^(27,26,28-32). Además, sobre la base de la *hsp70* no pueden ser diferenciadas. Sobre la base de estos datos y los análisis combinados realizados recomendamos reconocer a *L. donovani* como una única especie en el complejo *L. donovani* con *L. donovani infantum* como una subespecie.
- **Complejo *L. (L.) tropica*:** Basado en el gen *hsp70*, *L. tropica* no se puede distinguir de *L. aethiopica*, ambas especies forman un mismo grupo con alta fidelidad estadística. Estos resultados han sido obtenidos mediante el análisis filogenético de otros marcadores moleculares ^(27,33,34,35,36,38). En función de estos resultados y como ninguno de los grupos es monofilético, no se le puede dar el estatus de subespecie. De ahí que solo se reconozca una sola especie *L. tropica* basado en estos resultados. Sin embargo, al realizar los análisis concatenados estas dos especies aparecen como entidades separadas con alto valor de "bootstrap", aun cuando queden agrupadas por lo que deben ser consideradas como dos especies *L. tropica* y *L. aethiopica*.

- **L. (L.) major:** Lainson y Shaw ⁽¹⁾ incluyeron a *L. major* dentro del complejo *L. tropica*. Sin embargo, basado en el gen *hsp70* claramente se identifica como un grupo monofilético separado de *L. tropica* como también se observó mediante el análisis por MLEE ⁽²⁾, secuencia repetitiva ADN ⁽³⁸⁾, *cytB* ⁽³⁵⁾, 7SL RNA ⁽³⁷⁾, y la región ITS ⁽³³⁻³⁴⁾. Nuestros resultados soportan el estatus de *L. major* como una especie independiente como propuso la OMS ⁽³⁷⁾ y Bañuls et al. ⁽³⁾.
- **Complejo L. (L.) mexicana:** Tres especies quedan agrupadas en este complejo *L. amazonensis*, *L. mexicana* y

L. garnhami. Este grupo está muy bien definido como un grupo diferente a los grupos correspondientes a las especies del subgénero *Leishmania* del Viejo Mundo (figuras 1 y 2). Resultados similares fueron obtenidos por el análisis de diferentes genes ^(33,35-37,39). En nuestro análisis ninguna de las 3 especies puede distinguirse como clados independientes. De ahí que no podamos definir como subespecies basado en el gen *hsp70*, y reconocamos a *L. mexicana* como la única especie reconocida. Aunque el análisis combinado parece diferenciar *L. amazonensis*-*L. garnhami* de *L. mexicana* en dos grupos bien

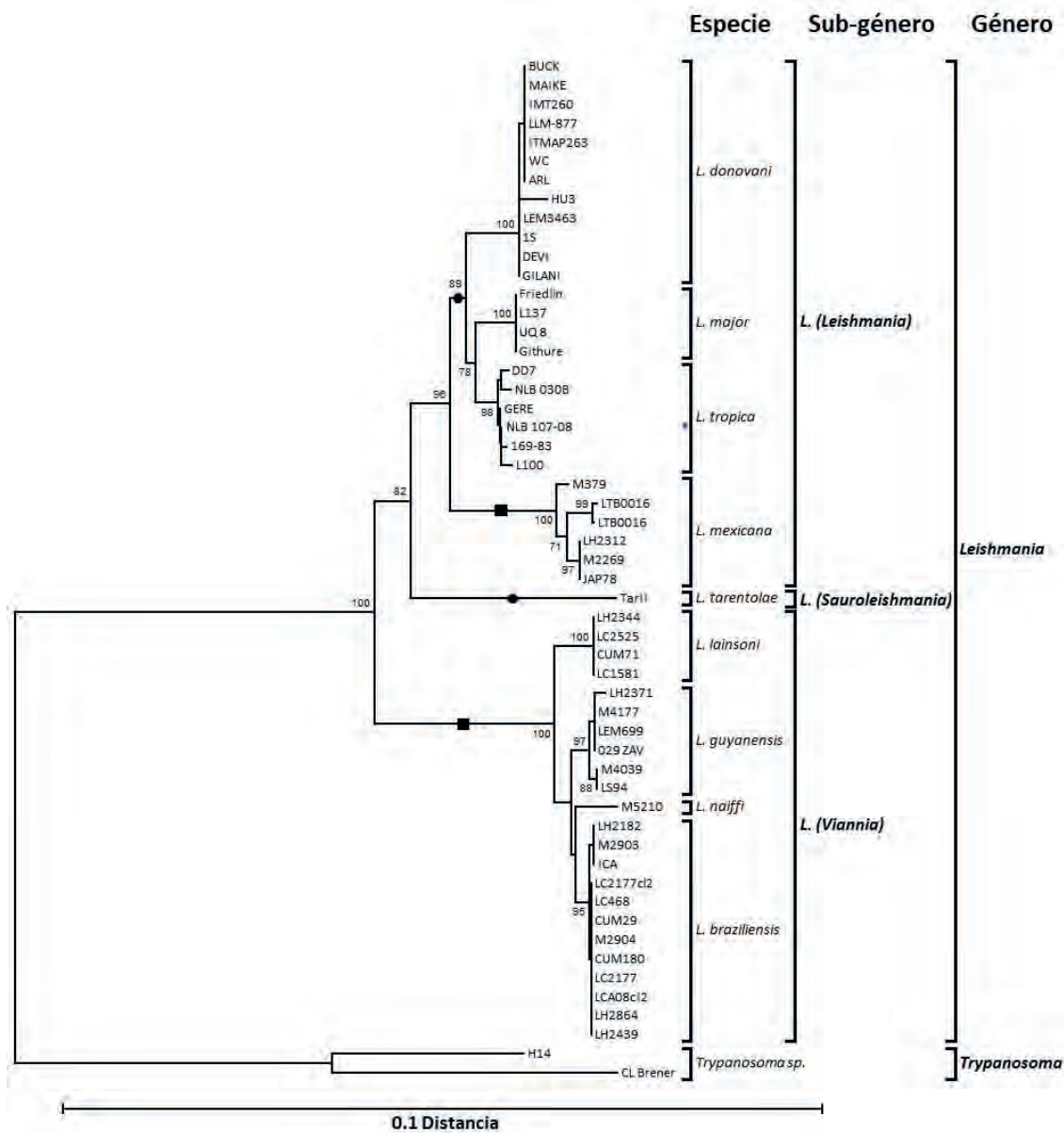


Fig. 1. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *hsp70* de distintas especies de *Leishmania* según el método de unión al vecino (neighbor-joining). La distancia fue estimada por el método de Kimura 2-parameter. El análisis de "bootstrap" 2000 réplicas. Especies del viejo Mundo se representan con círculos en la rama, mientras que especies del Nuevo Mundo con un cuadrado. El árbol está enrutado con las especies de *Trypanosoma*. ⁽¹³⁾

definidos, sin embargo, se necesitan un mayor número de cepas representantes de las 3 especies para llegar a conclusiones al respecto.

- **L. (V.) naiffi:** Esta es una de los cuatro grupos reconocidos dentro del subgénero *Viannia*, y que está de acuerdo con observaciones previamente obtenidas por diferentes autores^(3,40,41). Pocos estudios han analizado el estatus filogenético de como especie y en todos los casos se han utilizado muy pocos aislamientos, con resultados similares⁽⁴²⁻⁴⁵⁾. Como en nuestro estudio solo se pudo utilizar un aislado de esta especie, no podemos investigar su estado monofilético. Aun cuando con los análisis concatenados donde se usaron entre 2 y 3 aislamientos este parece ser un clado independiente.

- **Complejo L. (V.) braziliensis:** Este grupo de forma por dos especies *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Algunos autores sugieren que *L. peruviana* es simplemente una variante de *L. braziliensis* y no una especie validada⁽⁴⁶⁾. Estos resultados son soportados por nuestro estudio. Como se observa en la Figura 2, *L. peruviana* aparece como un subgrupo dentro de la población de *L. braziliensis*, resultado también obtenido mediante el análisis concatenado. De ahí que se sugiera basado en el gen *hsp70* el estatus de especie para *L. braziliensis* para todos los aislamientos de este complejo con *L. braziliensis peruviana* como una subespecie.
- **Complejo L. (V.) guyanensis:** Como se encontró previamente con el análisis de isoenzimas^(2,24,40), patrones de

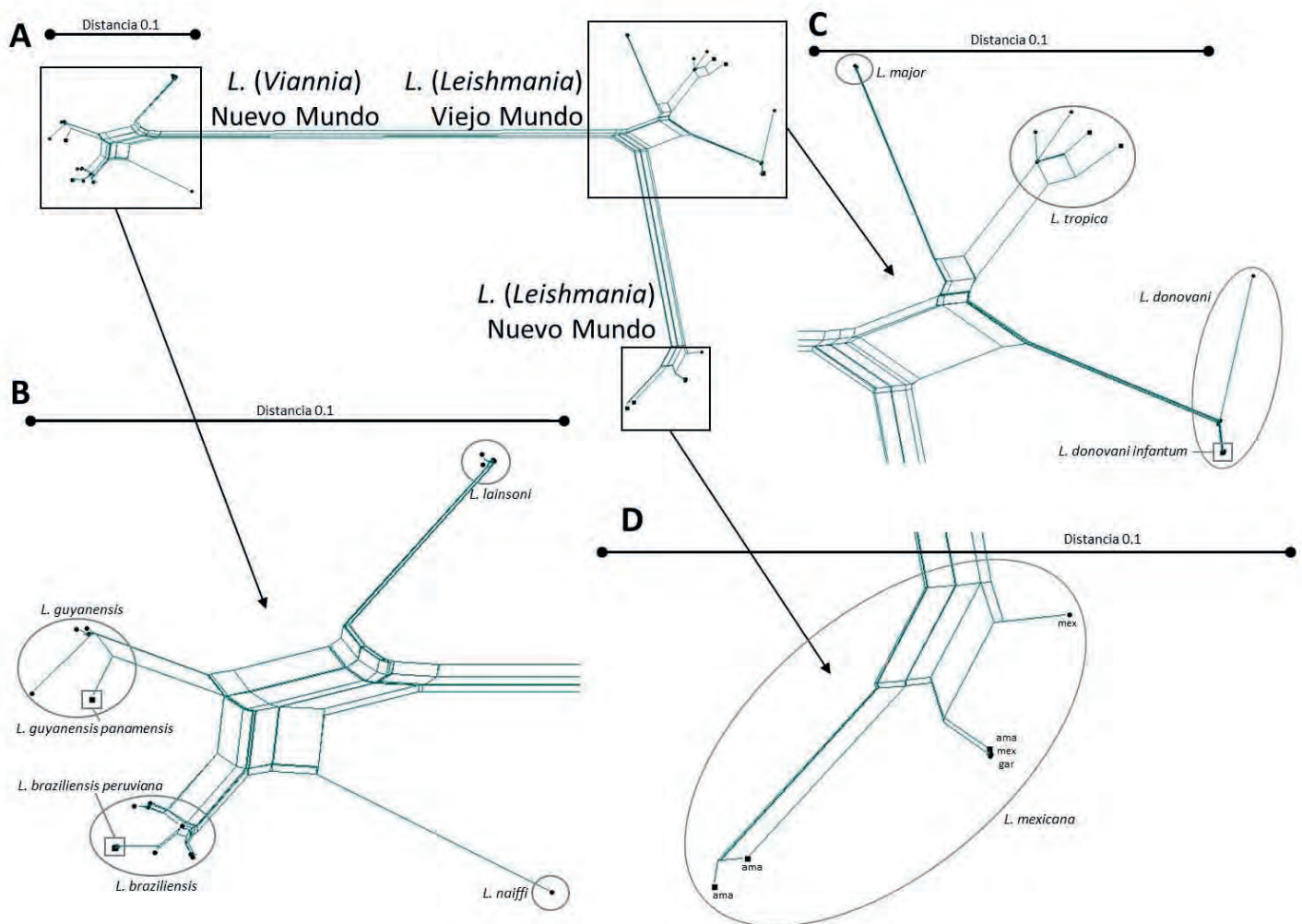


Fig. 2. Red filogenética basada en las secuencias del gen *hsp70* de distintas especies de *Leishmania*, según el método "NeighborNet algorithm" cada uno de los cuatro paneles (A)- (D) se dibuja a la escala indicada. (A). Red completa con representaciones de los tres grupos mostrados con más detalles en los paneles restantes. (B). Las secuencias del subgénero *L. (Viannia)* se separan en cuatro especies. Los cuadrados se usan para indicar subespecies. (C). Secuencias del subgénero *L. (Leishmania)* del Viejo Mundo, separados en tres especies. Dentro de *L. (L.) tropica*, los cuadrados (tro) denotan las secuencias de *L. (L.) tropica*, los puntos (aet) representan *L. (L.) aethiopica*. Dentro de *L. (L.) donovani*, los cuadrados representan *L. donovani infantum*. (D). Secuencias del Nuevo Mundo del subgénero *L. (Leishmania)*. Las especies *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis* están indicadas por gar, mex y ama, respectivamente⁽¹³⁾.

restricción del gen ITS ADNr ⁽⁴²⁾, y el análisis filogenético de ITS ADNr y cytB ^(33,35), *L. guyanensis* y *L. panamensis* forman un grupo monofilético (figura 1). Dentro de este complejo, ambas especies forman sub-clúster monofiléticos, confirmando los resultados de una amplia gama de isoenzimas y marcadores de RAPD ⁽⁴⁷⁾, así como el análisis filogenético basado en ITS ADNr ^(34,43,45) que muestran una separación clara. En conclusión, los datos basados en el gen *hsp70* data sugieren identificar a *L. guyanensis*, con *L. guyanensis panamensis* como una subespecie.

- **L. (V.) lainsoni:** Esta especie presenta las más distintivas características biológicas (morfología, crecimiento en medio de cultivo exentico), bioquímicas (patrones de electroforesis enzimáticas), y de biología molecular dentro del subgénero *L. (Viannia)*. Nuestro análisis basado en el gen *hsp70* mostro a *L. lainsoni* como la especie más divergente dentro del subgénero *L. (Viannia)* (Figura 1). Nuestros datos identifican a *L. lainsoni* como una especie separada dentro del subgénero *L. (Viannia)* como se describió anteriormente ^(3,24,42,48) y se corrobora con los resultados de los análisis concatenados.

De forma general proponemos entonces simplificar la clasificación actual taxonómica de *Leishmania* basado en los grupos monofiléticos encontrados en base al gen *hsp70* (tabla 1).

Por primera vez el gen de la HSP70 citoplasmática fue utilizado en estudios filogenéticos del género *Leishmania* y con los resultados obtenidos se demostró su utilidad para realizar

estos análisis. Este estudio contribuyó significativamente a promover la discusión sobre un marco de consenso taxonómico para *Leishmania* ⁽⁴⁹⁾.

Proponemos abandonar el concepto de complejos de especies, ya que ninguno de ellos parece estar compuesto de entidades monofiléticas separadas. Proponemos además simplificar la clasificación taxonómica de *Leishmania*, basado en los resultados filogenéticos basados en función de la *hsp70* en función de lograr que sea fácilmente aplicable desde un punto de vista clínico y epidemiológico para el beneficio de pacientes y personas en riesgo ^(50,51).

Actualmente la clasificación del Género *Leishmania* se basa en los resultados obtenidos basados en el gen de la *hsp70* ^(4,50,51).

Origen del género *Leishmania*

Hoy existen tres hipótesis para los orígenes del género *Leishmania*: Paleártica, Neotropical y Múltiples orígenes. En la hipótesis Paleártica, se asume el origen de *Leishmania* de lagartos cretáceos con migraciones recientes al Neártico, lo que sugiere que *Sauroleishmania* forma un clado hermano para todas las demás especies. En contraste, la segunda hipótesis, sugiere el origen de la *Leishmania* en el Neotrópico, respaldado por filogenias basadas en secuencias. Aquí los datos sugieren que las especies del nuevo mundo surgieron hace 46-34 millones de años y son los antepasados de las especies del viejo Mundo, haciendo de *Sauroleishmania* una forma derivada de mamíferos y no ancestral. Por último y no

Tabla 1. Nomenclatura simplificada en el análisis del gen *hsp70*

Subgénero (localización intestino vector)	Complejo (Grupo de especies/ estatus especie cuestionados)	Especies (Vector, distribución geográfica, tropismo, propiedades antigénicas y manifestaciones clínicas)	Especies validadas por el análisis con la <i>hsp70</i>
Leishmania	L. major	L. major; L. gerbilli, L. turanica, L. arabica	L. major
	L. tropica	L. tropica/L. killicki; L. aethiopica	L. tropica L. aethiopica
	L. donovani	L. donovani/ L. archibaldi; L. infantum/L. chagasi	L. donovani
	L. mexicana	L. mexicana/ L. pifanoi; L. amazonensis/L. garnhami; L. venezuelensis; L. waltoni; L. aristidesi; L. foraltini	L. Mexicana
Viannia	L. braziliensis	L. braziliensis; L. peruviana	L. braziliensis
	L. guyanensis	L. guyanensis, L. panamensis, L. shawi	L. guyanensis
		L. lainsoni	L. lainsoni
		L. naiffi	L. naiffi
		L. linderbergi; L. utigensi	

menos importante, la hipótesis del origen múltiple sugiere una división de *Leishmania* en dos linajes de Euleishmania (incluidos los subgéneros de *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania*) y Paraleishmania en el supercontinente Gondwana. Posteriormente la ruptura de Gondwana separó a los antepasados de todos los subgéneros de *Leishmania* ⁽⁵²⁾.

El análisis realizado basado en el gen *hsp70* y en la combinación de los genes estudiados proporciona evidencia convincente en apoyo de la hipótesis de que el género *Leishmania* puede haberse originado en América del Sur (Nuevo Mundo), apoyando la hipótesis Neotropical, dentro de las tres hipótesis que existen para los orígenes del género, en concordancia con otros estudios ^(1,10,20,26,37,38). En cada uno de los árboles filogenéticos presentados (figura 1, 2) las ramas más ancestrales corresponden a las especies del subgénero *L.* (*Viannia*) que incluyen aquellas especies que se encuentran distribuidas en América del Sur. De forma general se muestra que las especies del Nuevo Mundo se ramifican cerca de la base de los árboles y las especies del Viejo Mundo en la corona del subgénero *L.* (*Leishmania*).

Nuestro análisis proporciona evidencias que soportan la hipótesis de que el género *Leishmania* fue originado en América del Sur (Nuevo Mundo), contribuyendo a la discusión general sobre el origen de este género.

Análisis filogenético del género *Trypanosoma*

La figura 3 muestra el árbol construido a partir de las secuencias nucleotídicas utilizando el método de Unión al Vecino "Neighbor-Joining". Nueve grupos son reconocidos: *T. carassi*, *Trypanozoon*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. theileri*, *T. grayi*, *T. lewisi*, *T. rangeli* y *T. cruzi*. El clado *Trypanozoon* incluye *T. brucei gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei*, *T. evansi* y *T. equiperdum*. El subgénero *Megatrypanum* no es compatible como la sección *Stercoraria*. El subgénero *Herpetosoma* forma un grupo parafilético, con el subgénero *Schizotrypanum* ramificándose entre *T. rangeli* y *T. lewisi*. El grupo *T. cruzi* incluye *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei*. Este último como un subgrupo dentro del clado *T. cruzi* ⁽¹⁴⁾.

Estos grupos fueron también verificados en árboles filogenéticos construidos por los métodos de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, así como los árboles obtenidos basados en las secuencias aminoacídicas deducidas ⁽¹⁴⁾.

Utilizando las mismas secuencias nucleotídicas se construyó una red filogenética utilizando el método de "Neighbor-Net", modelo "p-distance" no corregido. Como se puede observar en la figura 4A, los mismos grupos que se identificaron por el análisis convencional se muestran en esta red. En el clado *T. rangeli* se pueden distinguir dos grupos (figura 4B). Las especies o subespecies dentro del subgénero *Trypano-*

zoon no se pueden distinguir (figura 4C). Se observan cuatro grupos genéticos en *T. cruzi*, correspondiente a las Unidades Discretas de tipificación (DTU): TcI, TcIII, TcIV y los DTUs TcII, TcV y TcVI que no forman entidades separadas (figura 4D) ⁽¹⁴⁾.

El análisis combinado de subunidad menor ARNr (SSU-ADNr)+ gliceraldehído 3'fosfato deshidrogenasa (gGADPH) +*hsp70* resuelven aún más las relaciones filogenéticas dentro del género *Trypanosoma* (datos no mostrados). El análisis fue consistente con el análisis de del gen *hsp70*, con pocas excepciones. Primero, *T. theileri* se agrupó consistentemente con la sección *Stercoraria* con una alta fidelidad en todos los árboles. Segundo, *T. vivax* claramente se agrupa con el clúster *Trypanozoon-T. congolense* ⁽¹⁴⁾.

Como se ha presentado el análisis filogenético basado en el gen *hsp70* agrupa a las especies del género *Trypanosoma* en nueve grupos monofiléticos. Los grupos corresponden a especies o subespecies. Cada uno de los grupos obtenidos es discutido en detalle a continuación.

- **Clado *Trypanozoon*:** El subgenera *Trypanozoon* forma un grupo monofilético constituido por las subespecies *T. brucei brucei*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense*, y las especies *T. evansi* y *T. equiperdum* que no se soportan como grupos separados. Ni por el análisis por el gen *hsp70*, ni por el análisis concatenado con otros marcadores genéticos se obtienen diferencias en este grupo. La monofilia de *Trypanozoon* se ha observado además con diferentes marcadores moleculares ^(9,53-55). *T. evansi* y *T. equiperdum* por lo tanto, no son clados monofiléticos y no califican para el estado de especie.
- Diferentes autores proponen incluir dentro del clado *T. brucei* a las especies *T. congolense*, *T. vivax* así como otras especies transmitidas por la mosca tsetse (*Trypanosoma simiae* y *Trypanosoma godfreyi*), basado en los resultados obtenidos por el análisis filogenético de los genes SSU-rRNA y gGADPH ^(9,10,56-59). Aun cuando en nuestro análisis *T. brucei*, *T. congolense*, y *T. vivax* se agrupan juntos en un mismo clado. Sin embargo, en todos los análisis, *T. congolense* y *T. vivax* forman entidades distintas con altos valores de "bootstrap" y por ende consideramos que deben ser consideradas especies separadas en los **clados *T. congolense* y *T. vivax***. (figura 3).
- **Clado *T. theileri*:** En nuestro análisis basado en el gen *hsp70* solo, *T. theileri* no se une convincentemente con la sección *Stercoraria* sino con la *Salivaria*. Esta posición dentro del género *Trypanosoma* ha sido muy debatida y hasta el momento no se han podido establecer claramente las relaciones. Algunos estudios demuestran que *T. theileri* está más cerca de *T. cruzi* que de *T. brucei* ba-

sado en el estudio filogenético de los genes SSU-rRNA y gGAPDH (54,59-61). Sin embargo, el análisis combinado realizado en este estudio basado en los genes SSU-rDNA+gGADPH+hsp70 agrupa a *T. theileri* con la sección *Stercoraria*. Sin embargo, otros estudios han mostrado resultados contradictorios basados en los mismos genes (56,58). Nuestros resultados soportan a *T. theileri* como un clado independiente como propusieron Simpson et al. (7); Rodrigues et al. (61) y Hamilton et al. (60).

- **Clado *T. grayi*:** Basado en el análisis filogenético del gen *hsp70* solo, *T. grayi* aparece como un taxón independiente, no relacionado claramente con ningún grupo en nuestro análisis. Sin embargo, en el análisis concatenado SSU-rDNA + gGADPH + *hsp70* las secuencias claramen-

te se agrupan más relacionadas con *T. cruzi* que con el clado *T. brucei*. Kelly et al. (62) concluyeron que *T. grayi* está más relacionado con *T. cruzi* que con *T. brucei*, pero el análisis filogenético con SSU-rRNA y gGAPDH lo ubica en un clado separado de *T. cruzi* y *T. brucei*, a menudo con otros tripanosomas de reptiles o aves (9,59,62).

- **Clado *T. lewisi*:** Dentro del subgénero *Herpetosoma* se encuentran las especies *T. lewisi* y *T. rangeli*. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos basados en el gen *hsp70*, este subgénero es claramente parafilético. Añez (63) propuso eliminar a *T. rangeli* del subgénero *Herpetosoma*, creando un Nuevo subgénero *Tejeraia*. Otros autores sugieren su reclasificación en el subgénero *Schizotrypanum*, o descontinuar el uso de subgéneros ba-

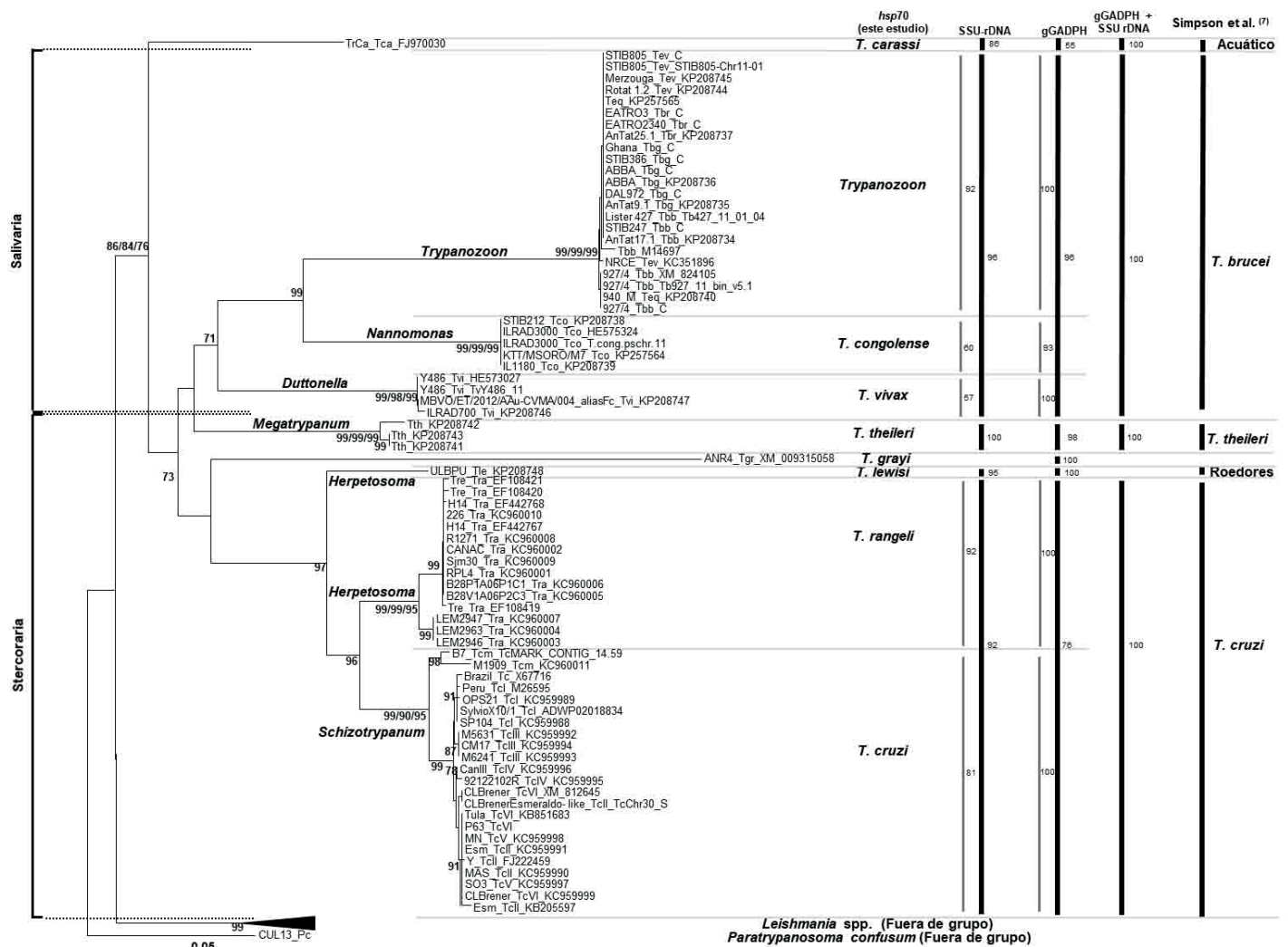


Fig. 3. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *hsp70* de 11 especies de *Trypanosoma* según el método de Unión al Vecino (Neighbor-Joining). La distancia fue estimada por el método de Kimura 2-parameter. El análisis de "bootstrap" 2000 réplicas. Especies del viejo Mundo se representan con círculos en la rama, mientras que especies del nuevo Mundo con un cuadrado. El árbol está enrutado con las especies de *Leishmania* y *Paratrypanosoma confusum*. Los nombres de las ramas representan la clasificación clásica de subgéneros de Hoare (5). Las secciones *Stercoraria* y *Salivaria* se indican a la izquierda.

sado en los resultados filogenéticas realizados con los genes SSU-rRNA, gGAPDH, proteasa tipo catepsina L, cyt b, y SL RNA (10,51,64-66).

- **Clado *T. rangeli*:** El análisis basado en el gen *hsp70* identifico a *T. rangeli* como un clado hermano a *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei*, al igual que al utilizar otros marcadores moleculares (9,10,64-66).
- **Clado *T. cruzi*:** El análisis del gen *hsp70* y el análisis concatenado basado en los genes SSU rDNA+gGADPH+hsp70 soportan que el clado *T. cruzi* clade como describió Simpson et al. (59) (figura 3). *T. cruzi* es una de las especies del subgénero *Schizotrypanum* que constituye un grupo heterogéneo monofilético dentro del género *Trypanosoma* (5,67). Se acepta actualmente que al menos existen seis Unidades Discretas de tipificación (DTUs) (68): TcI-TcVI

(67,69). Cuatro grupos fueron soportados mediante el gen *hsp70* en la red filogenética (Figura 4D) correspondiente a TcI, TcIII, TcIV y TcII + V + VI. Como TcV y TcVI son resultado del evento de hibridación de TcII y TcIII, siendo este el más cercano proceso de hibridación a los que se ha sometido esta especie (70-73), no nos sorprende las relaciones entre estos linajes especialmente con TcII (73-74). Basado en el gen *hsp70* no es posible discriminar los DTUs TcII, TcV, y TcVI. Dos genotipos relacionados con *T. cruzi* están relacionados con murcielagos: *Tc-bat* y *T. cruzi marinkellei* (75-76). La genealogía de los genes *hsp70* inferidos en este estudio confirma que los aislados de *T. cruzi marinkellei* son un clado hermano de los aislados de *T. cruzi* humanos, ambos formando grupos monofiléticos (figura 3). Estos resultados están en concordancia

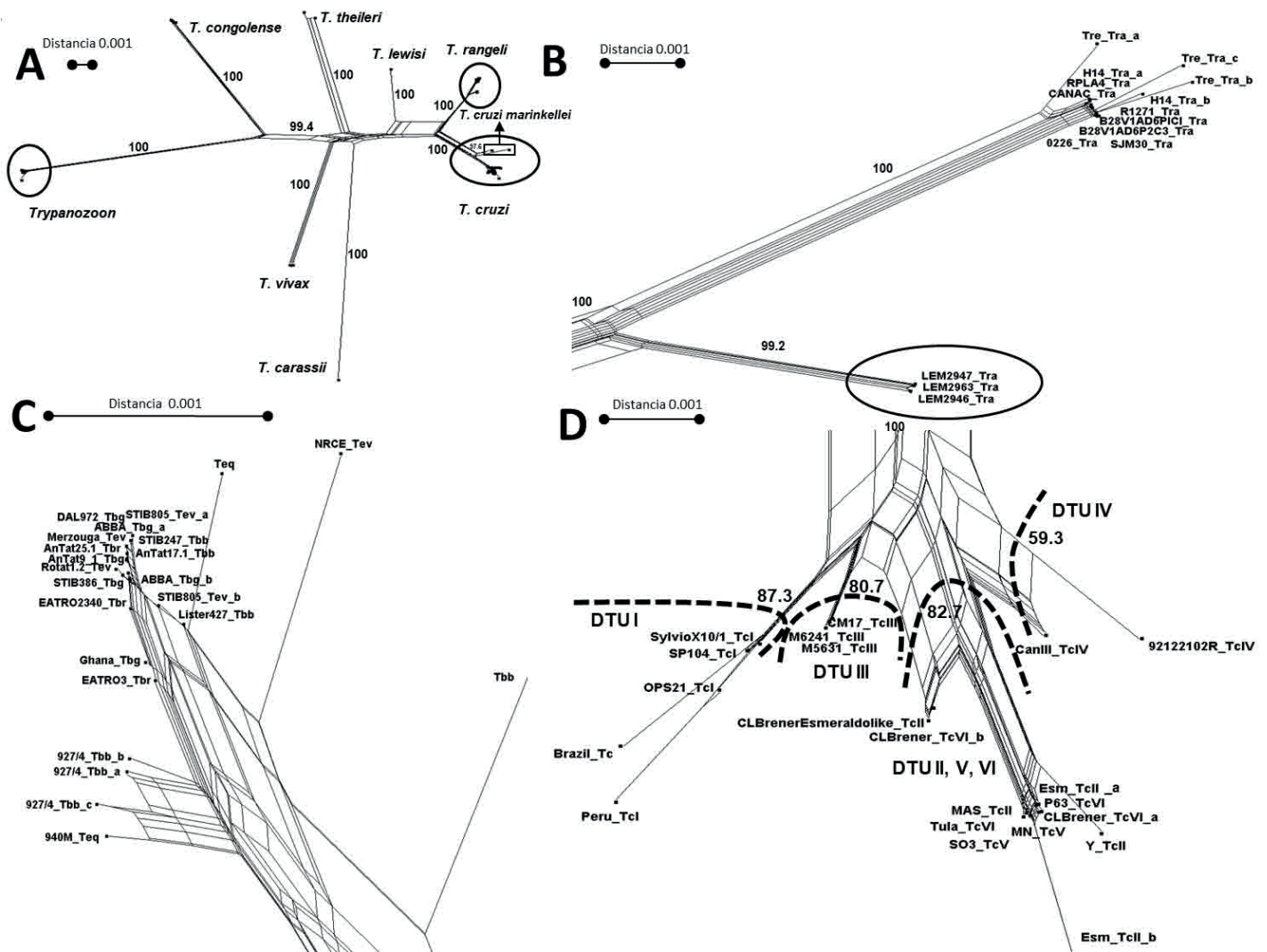


Fig. 4. Red filogenética basada en las secuencias del gen *hsp70* de distintas especies de *Trypanosoma*, según el método "NeighborNet algorithm" cada uno de los cuatro paneles (A)- (D) se dibuja a la escala indicada. (A). Red completa con representaciones de los tres grupos mostrados con más detalles en los paneles restantes. (B.). Clado *T. rangeli* (C). Clado *Trypanozoon* (D). Clado *T. cruzi*. Dentro del clado se diferencian las DTU.

con los previamente reportados con diferentes los genes (56,65,75), y por el análisis de proteómica comparativa (77).

Por primera vez el gen de la HSP70 citoplasmática fue utilizado en estudios filogenéticos del género *Trypanosoma* y con los resultados obtenidos se demostró su utilidad para realizar estos análisis. La filogenia de *Trypanosoma* derivada del análisis del gen *hsp70* se suma a la evidencia existente hacia la clasificación de este género en clados filogenéticas y descontinuar la clasificación clásica de sección y subgénero.

Conclusiones

Se depositaron en el Banco de Genes la secuencia parcial del gen *hsp70* citoplasmático de 43 cepas de 11 especies de *Leishmania* y 41 de 9 especies de *Trypanosoma*, lo que permitirá realizar estudios futuros y que contribuye al conocimiento de la comunidad científica internacional. El análisis del polimorfismo genético basado en la secuencia del gen *hsp70* demostró que este marcador molecular es útil para ser utilizado en el diseño de métodos moleculares para la detección, identificación y diferenciación de especies y linajes de *Leishmania* y *Trypanosoma*.

Por primera vez el gen de la HSP70 citoplasmática fue utilizado en estudios filogenéticos de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, este gen se encuentra bajo una selección purificadora que le permite su conservación y preservar la funcionalidad de la proteína y con los resultados obtenidos se demostró su utilidad para realizar estos análisis. Mediante la secuenciación de locus-simple, basado en el gen *hsp70*, se puede realizar la identificación de especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* sin la necesidad del aislamiento del parásito. Con este estudio, se contribuyó activamente a la discusión sobre un marco general de consenso taxonómico para los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*.

El concepto de complejos de especies para agrupar especies de *Leishmania* basado en características biológicas y bioquímicas no está respaldado por filogenias moleculares y proponemos descontinuar la clasificación clásica de sección y subgénero de las especies de *Trypanosoma* y proponer la clasificación en clados, ya que las secciones y subgéneros son claramente polifiléticos. Nuestro análisis proporciona evidencias que soportan la hipótesis de que el género *Leishmania* fue originado en América del Sur (Nuevo Mundo), contribuyendo a la discusión general sobre el origen de este género.

Los resultados basados en el análisis filogenético del gen que codifica la *hsp70* fueron tomados en cuenta y sirvieron de base para la actual clasificación taxonómica de *Leishmania*, que busca el mayor grado posible de relevancia práctica, bajo los principios de reducción, simplificación y delineación,

en función de lograr que sea fácilmente aplicable desde un punto de vista clínico y epidemiológico para el beneficio de pacientes y personas en riesgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters W, Killick-Kendrick R (editores). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press; 1987. p. 1–120.
2. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestion for a new classification. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1990; 65(3): 111–125.
3. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv. Parasitol. 2007; 64: 1–109.
4. Schönian G, Cupolillo E, Mauricio I. Molecular evolution and phylogeny of leishmania. En: Drug Resistance in *Leishmania* Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. Springer-Verlag Wien; 2013. p. 15-44.
5. Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972.
6. Vickerman K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. En: Lumsden WHR, Evans DA (editores). Biology of the Kinetoplastida. London/New York/San Francisco: Academic Press;1976. p. 1–34.
7. Simpson AG, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends. Parasitol. 2006; 22(4):168–174.
8. Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. Parasite. 2008;15(3):226–232.
9. Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. Parasitol. Today. 1999; 15(11): 432–437.
10. Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. Infect. Genet. Evol. 2001; 1(2):143–150.
11. Requena JM, Montalvo AM, Fraga J. Molecular chaperones of *Leishmania*: central players in many stress-related and -unrelated physiological processes. BioMed Res. Int. 2015; 301326.
12. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(5): 2294–2297.
13. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker, S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat shock protein 70 gene. Infect. Genet. Evol. 2010; 10(2): 238–245.
14. Fraga J, Fernández-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Deborggraeve S, Büscher P, et al. Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. 2016; 43(Sept):165-72.
15. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X. windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997; 25(24):4876-82.
16. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011; 28(10):2731–2739.

17. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111–120.
18. Eck RV, Dayhoff MO. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation. Maryland: Silver Springs; 1966.
19. Fitch WM. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 1971; 20(4): 406–416.
20. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985; 39(4): 783–791.
21. Huson DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics.* 1998; 14(1):68–73.
22. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23(2): 254–267.
23. Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 18: 229–237.
24. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50(3): 296–311.
25. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today.* 2000; 16(5):188–189.
26. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Debet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104(22): 9375–9380.
27. Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37(5): 565–576.
28. Lewin S, Schonian G, El Tai N, Oskam L, Bastien P, Presber W. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32(10):1267–1276.
29. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Chance ML, Kemp SJ, Watts PC, Noyes HA. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and "*L. archibaldi*" from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology.* 2004; 129(Pt 4):399–409.
30. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology.* 2004; 128(Pt3): 263–267.
31. Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuypere S, Hide M, Bañuls AL, De Doncker S, et al. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(4), 685–692.
32. Zemanova E, Jirku M, Mauricio IL, Horak A, Miles MA, Lukes J. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37(2):149–160.
33. Dávila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2000; 94(6):651–654.
34. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa-Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Res.* 2002; 88(10):918–925.
35. Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, et al. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology.* 2004; 128(Pt 5):483–491.
36. Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp. Parasitol.* 2009; 121(4):352–361.
37. Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fisher SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 72(4):415–420.
38. Piarroux R, Fontes M, Perasso R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H, Quilici M. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995; 73(1-2):249–252.
39. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schonian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes. Infect.* 2005; 7(11-12):1224–1234.
40. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1993; 68(2):107–108.
41. WHO. Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 793. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1990.
42. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995; 73(1-2):145–155.
43. Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Flemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(1): 46–53.
44. Sukmee T, Sriripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int. J. Parasitol.* 2008; 38(6):617–622.
45. Villinski JT, Klena JD, Abbassy M, Hoel DF, Pupilampu N, Mechta S, et al. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with focal disease outbreak in Ghana. *Diagnost. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 60(3): 323–327.
46. Grimaldi Jr G, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36(2):270–287.
47. Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96(Suppl1):S9–13.
48. Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp., a new parasite from the State of Para Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987; 82(2):289–291.
49. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol.* 2010; 26(10):466–9.
50. van der Auwera G, Fraga J, Montalvo AM, Dujardin JC. *Leishmania* taxonomy up for promotion? *Trends Parasitol.* 2011; 27(2):49–50.

51. Mauricio IL. *Leishmania* taxonomy. En: F. Bruschi, & L. Gradoni (editores), *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer International Publishing; 2018. p. 15-30.
52. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):82.
53. Amer S, Ryu O, Tada C, Fukuda Y, Inoue N, Nakai Y. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. *Acta Trop*. 2011; 117(1):39–46.
54. Cortez AP, Ventura RM, Rodriguez AC, Batista JS, Paiva F, Añez N, et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*. 2006; 133(Pt 2):159–169.
55. Gibson W. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int. J. Parasitol*. 2007; 37(8-9):829–838
56. Cavazzana JrM, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol*. 2010;40(3):345–355.
57. Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int. J. Parasitol*. 2004; 34(12):1393–1404.
58. Lima L, Espinosa-Alvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, et al. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat-seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit. Vectors*. 2013; 6: 221.
59. Simpson AG, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006; 22(4):168–174.
60. Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2007; 44(1):15–25.
61. Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MMG. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006; 132(2): 215–224.
62. Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field M.C. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci. Data*. 2006; 1:140024.
63. Añez, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera. IV—a reconsideration of its systematic position. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1982; 77(4):405–415.
64. Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. 2004; 128(3):283–294.
65. Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana JrM, Ortiz PA, Campaner M., et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Trop*. 2009; 109(3):199–207.
66. Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, et al. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Trop*. 2009; 112(3): 249–259.
67. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol*. 2012; 12(2):240–253.
68. Tibayrenc M, Ayala FJ. Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2012; 109(48): 3305–3313.
69. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009; 136(12): 1509–1528.
70. Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2000; 111(1):95–105.
71. Ferreira RC, Briones MR. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggests that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. *Infect. Genet. Evol*. 2012; 12(5): 1064–1071.
72. Flores-Lopez CA, Machado CA. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5:e1272.
73. Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 2005; 171(2): 527–543.
74. Caballero ZC, Costa-Martins AG, Ferreira RC, Alves JMP, Serrano MG, Camargo EP, et al. Phylogenetic and syntenic data support a single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. *Parasit. Vectors*. 2015; 8:222.
75. Lima L, Ortiz PA, da Silva FM, Alves JM, Serrano MG, Cortez AP, et al. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. *PLoS ONE*. 2012; 7:e38385
76. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009; 136(6):641–655.
77. Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demetere E, Seveno M, Barnabe C, et al. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *U S A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2010; 107(47): 20411–20416.

Recibido: 27/04/2020

Aprobado: 15/07/2020

Agradecimientos. Los autores desean agradecer a todos los colegas e institutos quienes amablemente donaron las cepas de referencia o ADN de Leishmania y Trypanosoma utilizados en este estudio: J. Arévalo (Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Perú); L. García (Centro Universitario de Medicina Tropical, Cochabamba, Bolivia); E. Cupolillo (Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil); G. Schönian (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Berlín, Alemania); I. Mauricio y D. Evans (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido); P. Desjeux (Instituto Boliviano de Biología de Altura, La Paz, Bolivia); J.-P. Dedet y J.A. Rioux (Centre National de Reference des Leishmania, Montpellier, Francia); J.J. Shaw (Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil); G. Schoone y A. El Harith (Royal Instituto Tropical, Ámsterdam, Países Bajos); y el consorcio Leishpinet (contrato de la UE INCO-CT2005-015407), F. Guhl (Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia), M. D. Lewis y M. A. Miles (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido), H. J. Carrasco (Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela), J. A. Costales y M. J. Grijalva (Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador; y el Instituto de Enfermedades Tropicales (TDI), Ohio Universidad, EE. UU.) Y R. Fikru (Universidad de Addis Abeba, Etiopía). Los autores agradecen a B. Cuyper (Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica), J. Cauchard (Agencia Francesa para la Alimentación, Medio Ambiente y Salud y Seguridad Ocupacional, Francia), J. Wilkes (Universidad de Glasgow, Reino Unido) y F. Claes (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia) por proporcionar las secuencias completas del genoma utilizadas en el estudio.

Conflictos de interés. No hay conflicto de interés en la investigación realizada.

Contribución de autoría:

1. Conceptualización: Jorge Fraga Nodarse, Ana Margarita Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin, José M. Requena.
2. Curación de datos: Jorge Fraga Nodarse, Gert Van der Auwera
3. Análisis formal: Jorge Fraga Nodarse, Ana Margarita Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin, José M. Requena
4. Adquisición de fondos: Ana Margarita Montalvo Alvarez, Jean Claude Dujardin
5. Investigación: Jorge Fraga Nodarse, Ana M. Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean-Claude Dujardin, José M. Requena, Stijn Deborggraeve, Philippe Büscher, Ilse Maes, Simone De Doncker
6. Metodología: Jorge Fraga Nodarse, Ana M. Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean-Claude Dujardin, José M. Requena, Stijn Deborggraeve, Philippe Büscher, Ilse Maes, Simone De Doncker
7. Administración del proyecto: Ana Margarita Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin.
8. Recursos: Ilse Maes, Simone De Doncker
9. Software: -
10. Supervisión: Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin
11. Validación: Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin, José M. Requena, Stijn Deborggraeve, Philippe Büscher
12. Visualización: Jorge Fraga Nodarse, Ana Margarita Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin
13. Redacción – borrador original: Jorge Fraga Nodarse, Gert Van der Auwera
14. Redacción – revisión y edición: Jorge Fraga Nodarse, Ana Margarita Montalvo Alvarez, Gert Van der Auwera, Jean Claude Dujardin

Financiamiento. Este trabajo fue financiado por el tercer acuerdo marco de la Dirección General de Cooperación al Desarrollo Belga con el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.

