

Artículo original

Detección de ADN de *Leishmania* en saliva de pacientes a diferente tiempo post tratamiento leishmanicida

Marinest Añez-Rojas^a, Agustina Rojas^b, Néstor Añez-Rojas^c, Leonel Castillo^a, Néstor Añez^{b*}

^aFacultad de Odontología, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. ^bInvestigaciones Parasitológicas "J.F. Torrealba" Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ^cGrupo de Biotecnología, UNESUR, Santa Bárbara del Zulia, Zulia, Venezuela

Recibido 30 de Julio de 2025; aceptado 05 de diciembre de 2025

<https://doi.org/10.69833/RSVM.2025.45.2.15>

Resumen: La leishmaniasis cutánea americana (LCA) es una parasitosis endémica de la región latinoamericana, causada por protozoarios del género *Leishmania*, la cual afecta hospedadores vertebrados, incluyendo humanos, provocando lesiones tegumentarias de gravedad variable. El agente etiológico, una vez depositado en el hospedador por insectos dípteros flebotominos de la familia Psychodidae, durante la ingesta sanguínea, es fagocitado y transportado por células del sistema fagocítico mononuclear hasta un ganglio linfático, para la presentación antigénica, siendo luego distribuido por vía linfática a diferentes tejidos y/o fluidos corporales. En el presente estudio, utilizando ensayos de PCR, se demuestra la presencia de ADN de *Leishmania* en saliva de pacientes que habían sufrido leishmaniasis y cicatrizado sus lesiones entre un mes y ocho años post tratamiento leishmanicida. Se discute la utilidad del uso de ensayos de PCR en saliva, como medio diagnóstico no invasivo en estudios clínicos y epidemiológicos, en áreas donde la leishmaniasis es endémica. Asimismo, se advierte sobre el resguardo de la infección por *Leishmania* durante la práctica odontológica.

Palabras claves: *Leishmania*, leishmaniasis cutánea americana, ADN, saliva, diagnóstico, tratamiento

Leishmania DNA detection in saliva of patients at different post-leishmanicidal treatment times

Abstract: American cutaneous leishmaniasis (ACL) a vector borne disease caused by *Leishmania* parasites producing tegumentary lesion in vertebrate hosts, including human, is endemic in most Latin-American countries. The etiological agent, once deposited on the skin during a Psychodidae-sand fly feeding, is taken by cells of the phagocytic mononuclear system to a lymphatic nodule for antigenic presentation, and then distributed to different tissues and body fluids. In this study, we demonstrate, using a PCR assay, the presence of *Leishmania* DNA in saliva of patients who had healed lesions between 1 month to 8 years after receiving leishmanicidal treatment. The usefulness of PCR assay, as non-invasive diagnostic tool for studies on leishmaniasis, is discussed. The need for precaution in dentistry occupational practice, is suggested.

Keywords: *Leishmania*, American cutaneous leishmaniasis, DNA, saliva, diagnostic, treatment

* Correspondencia:
E-mail: noar1510@gmail.com
ORCID: [0000-0003-4758-2573](https://orcid.org/0000-0003-4758-2573)

Introducción

La leishmaniasis cutánea americana (LCA), una de las denominadas enfermedades olvidadas, o desatendidas, causada por un protozoo del género *Leishmania*, se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano, registrándose frecuentemente en pobladores de áreas rurales y semiurbanas de Latinoamérica. El parásito es transmitido al hospedador humano mediante la picadura de hembras de insectos dípteros hematófagos de la familia Psychodidae del género *Lutzomyia*, incriminados como vectores, en lugares donde existen las condiciones de riesgo. El comportamiento biológico, fijado por organismos causantes de leishmaniasis permite que, una vez depositadas las formas infectivas del parásito en el hospedador humano, éstas sean capturadas por células del sistema fagocítico mononuclear (ej. macrófagos, células dendríticas), actuando luego como presentadoras de 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/o fluidos de la economía, resultando la acción del parásito en los puntos de mayor concentración del mismo [1].

La leishmaniasis, como entidad nosológica, comprende un amplio espectro clínico, cuyo rango se extiende desde infecciones inaparentes, asintomáticas o subclínicas, hasta casos de alta severidad. Las lesiones pueden estar confinadas a la piel en la leishmaniasis cutánea (LC), o causar la destrucción del tabique nasal o de la región nasofaríngea, manifestándose como leishmaniasis mucocutánea (LMC). La LC es la más común de estas parasitosis, causando globalmente cerca de un millón de casos por año, llegando a producir complicaciones tales que incapacitan al hospedador humano para realizar sus tareas habituales o provocan desfiguraciones difíciles de controlar de no ser atendidas en su debido tiempo [1].

La LC afecta gran parte de la población latinoamericana, en general, y la venezolana, en particular, detectándose localidades endémicas en casi todo el territorio nacional, siendo las áreas de la geografía andina (estados Táchira, Trujillo y Mérida) las que lideran las estadísticas de prevalencia en el país [2].

La situación epidemiológica señalada, aunada a la complejidad clínica, obliga a buscar métodos diagnósticos certeros, que puedan aplicarse de manera expedita en los centros de salud en las áreas endémicas. Desafortunadamente, la capacidad diagnóstica para la leishmaniasis en Venezuela está restringida a algunos centros especializados, ya que el sistema de salud nacional carece de una red constituida por personal capacitado para tal fin, y otros 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, los mismos carecen de los elementos diagnósticos necesarios y/o de la experticia de su personal para realizarlos [3].

Comprendiendo la complejidad del problema, y la necesidad de clarificar ciertos hallazgos recientemente publicados en la literatura científica, relacionados con la capacidad de invasión de *Leishmania* a la cavidad bucal [4-6], el objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *Leishmania* en saliva de pacientes que han sufrido leishmaniasis cutánea y recibido tratamiento leishmanicida. Con tales tratamientos, aunque se logra la cicatrización de la lesión ulcerosa, no se produce la total desaparición de los parásitos en ciertos tejidos, donde la respuesta inmune no llega con su eficiencia liberadora a la infección, la cual persiste por tiempo variable post tratamiento, similar a como ocurre en otros organismos de la familia Trypanosomatidae a la que pertenece el género *Leishmania*, aquí estudiado [7-12].

Aun cuando en la mayoría de las veces los organismos causantes de LC son evidenciados en el tegumento del hospedador, no es raro que tales parásitos alcancen durante su distribución fluidos como orina, secreciones faríngeas, lágrimas, semen y saliva [13]. Por tal razón, en el presente estudio, se evaluó, mediante metodología molecular utilizando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la detección del ADN de *Leishmania* en muestras de saliva de pacientes que han sufrido leishmaniasis cutánea y logrado la cicatrización de las lesiones, a diferentes tiempos de haber recibido tratamiento leishmanicida.

Materiales y métodos

Criterio de inclusión: Los pacientes incluidos en el presente estudio fueron seleccionados en el laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba”, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, procedentes de áreas donde la leishmaniasis es endémica. Todos acudieron a este centro diagnóstico por sospecha de leishmaniasis cutánea (LC), presentando úlceras de diferentes tamaños y localizaciones, para ser valorados metodológicamente. Confirmada la etiología de las lesiones, fueron tratados hasta lograr la completa cicatrización. Los controles negativos fueron seleccionados entre pacientes atendidos en la consulta de la Cátedra de Cirugía de la Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, provenientes de áreas no endémicas del estado Mérida, Venezuela.

Pacientes: Un total de 17 individuos fueron incluidos en el presente estudio, distribuidos en los siguientes grupos: nueve con evidencia de lesiones cicatrizadas, quienes habían recibido tratamiento leishmanicida entre un mes y ocho años antes de la toma de muestras; dos controles positivos provenientes de área endémica y diagnosticados previamente mediante PCR, presentando lesión activa e infección subclínica, respectivamente; seis controles negativos, cinco procedentes de áreas no endémicas y uno de área endémica, evaluados en la consulta de la cátedra de cirugía de la Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes.

Los nueve pacientes seleccionados para el estudio, fueron diagnosticados para confirmar el agente causal de la infección por *Leishmania*, durante la fase de lesiones activas, mediante el siguiente protocolo: **i.** Prueba de leishmanina o intradermo-reacción de Montenegro (IDR), con observación de las induraciones 48-72 horas post-aplicación y considerada positiva una induración con diámetros iguales o superiores a 5x5 mm. **ii.** Pruebas parasitológicas mediante detecciones microscópicas de formas tisulares de *Leishmania* (amastigotes), en muestras tomadas de las lesiones o úlceras cutáneas por aspiración con micro agujas y/o por aposición del tejido sobre láminas portaobjetos. Las mismas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa al 10 % en buffer fosfato pH 7,2 siendo observadas en microscopio Axioscop (Zeiss-Germany) a 1000X y registradas con cámara Noticam 480 en interfase con computador Pentium1000. **iii.** Mediante caracterización molecular de la especie de *Leishmania* detectada por ensayos de PCR; y **iv.** Constatando la presencia de cicatriz correspondiente en cada paciente tratado a diferentes periodos post-tratamiento leishmanicida y seleccionados para el estudio. La secuencia de la metodología es mostrada en la figura 1.

Consideraciones éticas: En todos los casos, un consentimiento informado fue leído a cada paciente, explicándoseles detalladamente en que consistía el protocolo de estudio, incluyendo el proceso de la toma de muestra y cada uno de los métodos utilizados para llegar a diagnosticar el cuadro presentado. Una vez demostrada su comprensión y aceptación, el documento de consentimiento fue firmado por el interesado o su representante en caso de ser un menor de edad. Todo lo anterior cumpliendo con lo establecido en la Declaración de Helsinki y con criterios exigidos por el Comité de Bioética del departamento donde se realizó el estudio y del Consejo Nacional de Investigación Científica de Venezuela.

Muestreo, detección e identificación del ADN de Leishmania en saliva de pacientes a diferentes periodos post-tratamiento leishmanicida: Para la detección de ADN

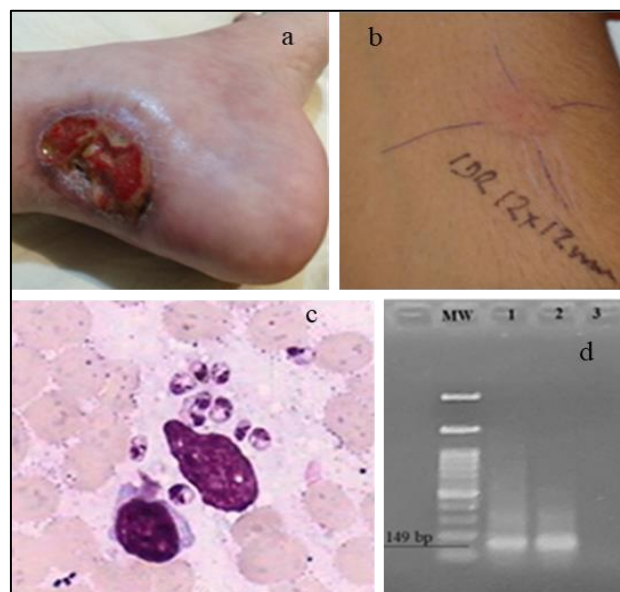


Figura 1. Metodología diagnóstica confirmatoria de infección por *Leishmania* en lesiones activas, previo al tratamiento leishmanicida en pacientes incluidos en el estudio a) Lesión activa; b) Medida de la intradermorreacción de Montenegro-leishmanina; c) Detección de amastigotes en macrófagos de lesión activa; d) Registro de ensayo de PCR en muestra de lesión activa.

de *Leishmania*, en muestras de saliva de los pacientes seleccionados para el estudio, el fluido salival fue colectado en tubos de vidrio y conservado a -20 °C, hasta su procesamiento (Figura 2). Para los fines del presente estudio, las muestras fueron colectadas y procesadas tiempo después del tratamiento, una vez las lesiones fueron consideradas como epitelializada o cicatrizada (Figura 3).



Figura 2. Toma de muestra de saliva post tratamiento en paciente con lesión causada por *Leishmania* tratada y cicatrizada (A) y en control negativo en paciente odontológico (B).

Para la extracción de ADN de *Leishmania*, a partir de la muestra de saliva, se procedió de la siguiente manera: 100 µL de saliva fueron colocados en un microtubo de centrifuga de 1,5 mL (Eppendorf®), añadiendo 250 µL de buffer Digsol® y 5 µL (20 mg/mL) de la enzima proteinasa K; la mezcla fue agitada con vórtex durante 30 seg y luego

incubada a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, fueron añadidos 300 µL de acetato de amonio (4M) y agitado vigorosamente con vórtex por 30 seg, lo cual se repitió durante 15 min, siendo luego centrifugado por 15 min a 14 000 RPM a 10 °C, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo microtubo de centrifuga estéril. Seguidamente, al sobrenadante fue agregado 1 mL de etanol al 100 %, el cual fue homogenizado invirtiendo el tubo muy suavemente para precipitar el ADN; luego fue centrifugado por 15 min a 14 000 RPM. Inmediatamente después, se descartó el sobrenadante, lavando el ADN con 1 mL de etanol frío al 70 %, centrifugando los microtubos 15 min a 14 000 RPM y descartando el etanol. El ADN de *Leishmania* en el pellet resultante, fue secado en un concentrador Speed-Vac® durante 15 min, diluido en 50 µL de buffer-TE (Tris-EDTA) y almacenado a -20 °C, para futuros análisis.

Para la identificación de *Leishmania* en las muestras procesadas, las condiciones de PCR fueron realizadas siguiendo la metodología de un multiplex de un solo paso, registrado por Harris *et al.* [14] para caracterizar los complejos de *Leishmania (V) braziliensis* y *Leishmania (L) mexicana* que circulan en el subcontinente latinoamericano, utilizando primers obtenidos de secuencias de los genes del minixón (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') y estandarizado para las leishmanias que circulan en la region andino-venezolana por Rojas *et al.* [15].

Resultados

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, revelaron en todos los casos positividad a la presencia de *Leishmania (Viannia) braziliensis* con la técnica utilizada (Figura 4).

Las muestras positivas mostraron bandas de 149 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 (Figura 1d).

Tal similitud fue observada en todas las muestras de pacientes muestreados entre un mes y ocho años post tratamiento, lo cual demuestra, además, el largo periodo de persistencia de la especie de *Leishmania* causante de las lesiones originales, en los pacientes estudiados a distintos tiempos después del tratamiento específico, quienes 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 (V) braziliensis* en las muestras de saliva de cada paciente incluido en el estudio, a diferente tiempo post tratamiento, además de un caso con lesión activa y otro positivo asintomático, sin lesiones aparentes, proveniente de área donde la leishmaniasis es endémica, tomados ambos como controles positivos de reacción, se muestran en la tabla 1. Los mismos se muestran junto con los resultados de un grupo de pacientes muestreados en la cátedra de cirugía de la Facultad de Odontología, todos sin lesiones aparentes y provenientes de distintos lugares de la ciudad de Mérida, quienes resultaron negativos para la amplificación de ADN de *Leishmania*. En la misma tabla, se presenta el tiempo estimado post tratamiento promedio de 41±31 meses y un rango de 1-96 meses, transcurridos antes del presente estudio, complementándose con los resultados de la caracterización de *Leishmania (V) braziliensis*, especie causante de las lesiones en los pacientes evaluados para el fin descrito en el estudio, mostrados en la figura 4.

Discusión

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



Figura 3. Lesiones ulceradas registradas en pacientes incluidos en el estudio antes de recibir tratamiento leishmanicida (a) y su correspondiente proceso de cicatrización a diferente tiempo post tratamiento durante detección de ADN de *Leishmania* en muestras de saliva (b).

que habían sufrido leishmaniasis cutánea (LC) y recibido tratamiento leishmanicida con cicatrización de lesiones, entre un mes y ocho 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 fue llevado a cabo en individuos inequívocamente infectados con *Leishmania braziliensis*, previamente diagnosticados clínica (presencia de úlcera cutánea), parasitológica (detección microscópica de amastigotes), inmunológica (IDR >5mm) y molecularmente (PCR positiva), quienes fueron regularmente reevaluados, a diferentes periodos post tratamiento, en la unidad diagnóstica antes identificada.

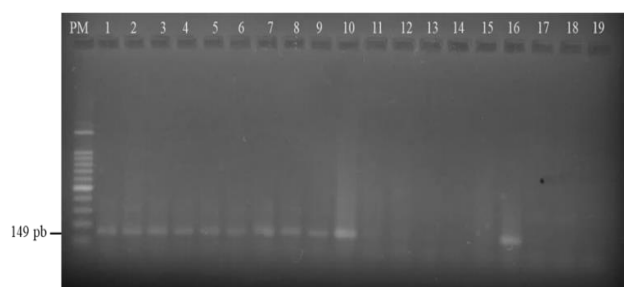


Figura 4. Demostración de la presencia del ADN de *Leishmania braziliensis* en muestras de saliva de pacientes a diferente tiempo post tratamiento. Gel de agarosa al 1,5 % coloreado con bromuro de etidio, mostrando el producto de la amplificación: PM: Peso molecular. Líneas 1-9: Muestras de saliva de pacientes post tratamiento. Línea 10: Paciente de área endémica positivo sin lesión. Líneas 11-15: Muestras de saliva negativas tomadas de pacientes en la Cátedra de Cirugía, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. 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).

Como lo revelan los resultados obtenidos, los ensayos de PCR realizados en los pacientes seleccionados para el muestreo de saliva, a diferentes tiempos post-tratamiento, demostraron la presencia de ADN de *L.(V)braziliensis* en todos, independientemente del tiempo transcurrido luego de producida la cicatrización de las respectivas lesiones. Este hallazgo, pareciera 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 [5,16,17]. Igualmente, 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 cual pertenece el género *Leishmania* [18,19].

Lo anteriormente expresado pareciera indicar que la presencia de ADN de *Leishmania*, en saliva de hospedadores humanos, es un fenómeno de larga duración, el cual puede ser detectado utilizando técnicas moleculares altamente sensibles y específicas, como los ensayos de PCR aquí demostrados. Por tal razón, basados en los presentes hallazgos, así como en la exactitud, facilidad de uso y el relativo bajo costo de la aplicación de esta prueba molecular en el fluido salival, esta podría considerarse una herramienta de rutina diagnóstica para la identificación específica del 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 desvelar infecciones ocultas de esta subestimada enfermedad en áreas geográficas donde la misma es endémica [13].

Conectado con nuestros hallazgos, existe un estudio realizado en la misma región en 10 pacientes con enfermedad periodontal crónica, quienes habían sido tratados por presentar LC entre cinco y 10 años, previo a la demostración de persistencia del ADN de *Leishmania* en 70 % de ellos [16]. En el mismo, los autores llaman la atención sobre la posibilidad de infección profesional a partir de pacientes infectados, recomendando se considere a la leishmaniasis como riesgo de infección oral cuando se practica el diagnóstico diferencial de infecciones orales y dentales, lo cual es confirmado con los resultados mostrados en el presente estudio.

Más recientemente, en un grupo de pacientes con lesiones activas causadas por *L. braziliensis*, fue detectada la presencia del ADN del parásito en muestras de saliva antes, durante y después del tratamiento leishmanicida, indicando la frecuente invasión al fluido salival, lo cual es corroborado aquí una vez ocurrido el proceso de cicatrización, sin haberse observado señales de recidivas o reinfecciones posterior a la infección primaria [19].

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 el 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 advierten la necesidad de estar

alerta sobre estas infecciones en el campo de estudio del profesional de la odontología en todas sus especialidades [8,10].

Tabla 1. Detección del 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 del paciente	Fecha de toma muestra de saliva	Tiempo de muestreo de saliva post-tratamiento	Característica de la lesión	Resultado del ensayo de PCR
JFT-MA-23	20.05.2024	1mes	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	20.03.2024	Control (+)	Lesión activa	+
JFT-YM-23*	15.12.2023	Sin tto/sin lesión	Subclínico*	+
JFT-GT-23	25.01.2024	(-) de AE	Control (-)	-
FOULA-1	24.04.2024	Pte. No AE	Sin lesión	-
FOULA-2	24.04.2024	Pte. No AE	Sin lesión	-
FOULA-3	24.04.2024	Pte. No AE	Sin lesión	-
FOULA-4	24.04.2024	Pte. No AE	Sin lesión	-
FOULA-5	24.04.2024	Pte. No AE	Sin lesión	-
		X: 41 ± 31		
Total: 17 muestras		meses (Rango: 1-96 meses)		

*: Paciente asintomático proveniente de área donde la leishmaniasis es endémica; (+) positivo; (-) negativo; AE: área endémica; Pte. No. AE: Paciente No área endémica; tto: tratamiento.

Conclusiones

1. El ensayo de PCR, permite detectar e identificar específicamente el ADN de *Leishmania* en muestras de saliva, años después del tratamiento leishmanicida y de la 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* pareciera ser una característica biológica para invadir el fluido salival, crevicular y otros tejidos de la cavidad bucal, que permite evadir la respuesta inmune del hospedador, logrando largos periodos de persistencia, fenómeno compartido con otras especies de la familia Trypanosomatidae, incluyendo *T. cruzi* y el género *Leishmania*, aquí demostrado.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los pacientes, los protagonistas, por su colaboración, paciencia y comprensión de su importancia durante el estudio.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés

Financiamiento

Se agradece el financiamiento recibido del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) durante la ejecución de los proyectos CFP-2023200084, CPF-2024000056 y CFP-2024000071 (NA).

Referencias

1. Steverding, D. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors. 2017; 10:82. DOI: [10.1186/s13071-017-2028-5](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5)
2. Scorza JV, Valera M, Moreno E, Jaimes R. Encuesta epidemiológica sobre leishmaniasis cutánea. Un estudio en Mérida, Venezuela. Bol Of Sanit Panam. 1983; 95:118-23. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/17052>
3. Añez N, Rojas A, Scorza-Dagert JV, Morales C. Successful treatment against American cutaneous leishmaniasis by intralesional infiltration of a generic antimonial compound-lidocaine combination. A follow up study. Act Trop. 2018, 185:261-6. DOI: [10.1016/j.actatropica.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.001)
4. Corvalan FH, Sampaio RNR, Brustoloni YM, Andreotti R, Lima Júnior MSC. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. J Ven Anim Tox inc Trop Dis. 2011; 17:98-102. DOI: [10.1590/S1678-91992011000100013](https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000100013)
5. Felinto de Brito ME, Lima Almeida E, Rapela Medeiros AC, Pereira Werkhäuser R, de Almeida Alexandre JL, Santos Lima-Figueiredo B, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 113:e170250. DOI: [10.1590/0074-02760170250](https://doi.org/10.1590/0074-02760170250)
6. Añez N. *Trypanosoma cruzi* y Enfermedad de Chagas. Con especial referencia a la problemática en Venezuela. Moldova:Generis Publishing; 2025. <https://n9.cl/hiiie>
7. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60:726-32. <https://pdfs.semanticscholar.org/9bb7/b6e1fd0600458d5b66159ab8404c5ba4408a.pdf>
8. Añez N, Crisante G, Caraballo F, Delgado W, Parada H. *Trypanosoma cruzi* persistence at oral

- inflammatory foci in chronic chagasic patients. Act Trop. 2011; 117:207-11. DOI: [10.1016/j.actatropica.2010.12.010](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.12.010)
9. Añez N, Crisante G, Araujo S, Añez M, Rojas A, Parada H. Detection and significance of *Trypanosoma cruzi* persistence in inflamed gingival foci in Chagas disease. Int J Clin Med Res. 2015; 2:8-13. <http://article.aascit.org/file/pdf/9060783.pdf>
 10. Añez N, Crisante G, Khoudeir S, Davila J, Liuzza A, Parada H. *Trypanosoma cruzi* persistence in crevicular fluid from inflamed gum of chronic chagasic patients. J Den Oro Surg. 2016; 1:123. <https://n9.cl/805yo>
 11. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60:726-32. <https://pdfs.semanticscholar.org/9bb7/b6e1fd0600458d5b66159ab8404c5ba4408a.pdf>
 12. Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol. 1997; 60:49-54. DOI: [10.1016/S0167-5273\(97\)02952-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(97)02952-5)
 13. Lee Y-H, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. Am J Dent. 2009; 22:241-8. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2860957/>
 14. Harris E, Krop G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol. 1998; 36. DOI: [10.1128/jcm.36.7.1989-1995.1998](https://doi.org/10.1128/jcm.36.7.1989-1995.1998)
 15. Crisante G, García P, Rojas A, Graterol D, Contreras V, Añez N. Validation of *Trypanosoma cruzi*-GPI anchored membrane proteins for specific sero-diagnosis of Chagas Disease. Am J Microbiol Biotech. 2015; 2:26-37. <http://article.aascit.org/file/pdf/9190748.pdf>
 16. Premoli-de-Percoco G, Gonzalez N, Añez N, Guevara P, Ramirez JL. PCR detection of specific *Leishmania*-DNA in patients with periodontal disease. Pathologica. 2002; 94:28-31. <https://n9.cl/4w2m3>
 17. Guevara P, Ramírez JL, Rojas E, Scorza JV, González N, Añez N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. Lancet. 1993; 341:1341. DOI: [10.1016/0140-6736\(93\)90845-8](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90845-8)
 18. Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Añez N, Valera M, Ramírez JL. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. Clin Diag Lab Immun. 1994; 1:385-9. DOI: [10.1128/cdli.1.4.385-389.1994](https://doi.org/10.1128/cdli.1.4.385-389.1994)
 19. Añez N, Crisante G, Rojas A. Use of PCR assay to detect *Leishmania*-DNA in saliva from patients suffering American Cutaneous Leishmaniasis. Biomed. 2023; 34:43-50. DOI: [10.32776/revbiomed.v34i2.1104](https://doi.org/10.32776/revbiomed.v34i2.1104)

NAR ORCID: [0009-0003-9336-9025](https://orcid.org/0009-0003-9336-9025)



Este artículo está bajo licencia CC BY-NC-SA 4.0