

28
21

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



CLONACION DEL VECTOR PBR322 CON INSERTOS DE
MINICIRCULOS DE KDNA DE LEISHMANIA MEXICANA
MEXICANA, PARA LA CONSTRUCCION DE UNA SONDA
ESPECIE - ESPECIFICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

FELIX HERNANDEZ CORTES

ASESOR: Q.F.I. ANDREA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX., 1995

FALLA DE ORIGEN





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de tesis:
Clonación del vector pBR322 con insertos de minicírculos de kDNA de Leishmania mexicana mexicana, para la construcción de una sonda especie-específica.

que presenta el pasante: Félix Hernández Cortés
con número de cuenta: 8653119-1 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 25 de Mayo de 199 5

PRESIDENTE	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osaya</u>	<i>Andrea A. Becerril Osaya</i>
VOCAL	<u>M.V.Z. Pablo Martínez Labat</u>	<i>Pablo Martínez Labat</i>
SECRETARIO	<u>II. en C. Sandra Días Barriga Arceo</u>	<i>Sandra Días Barriga Arceo</i>
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revueltas Miranda</u>	<i>Esther Revueltas Miranda</i>
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	<i>Marcela Hernández Vargas</i>

UAE/DEP/VAF/01

FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a mis padres en especial a mi madre con quién he compartido más tiempo de mi vida y le doy gracias por todos los esfuerzos y sacrificios realizados ya que todo lo que soy es por ella.

A MIS HERMANOS , MACA; siempre dispuesto ha ayudarme sin esperar nada a cambio y por tú apoyo a todas mis decisiones. PILA; gracias por esos momentos que pasamos en la infancia y por los actuales. ROMAN; Estricto en su ayuda pero muy afectuoso. PEPE; De todos los hermanos mayores tú eres con quién he compartido más tiempo, gracias por tú apoyo. ELVIA, ALICIA, JUANA, LUIS, VICO, ARTURO, GENARO, gracias por esos momentos que hemos compartido.

A LOS PADRES CORONA LOEZA; Quienes me han dado apoyo y ayuda incondicional y siempre dispuestos a ayudarme les quiero y les agradeceré toda la vida. NENO, VIRTOR Y ANA; Quienes considero como mis hermanos.

A MI TIA ELO; Por el cariño, la paciencia y por los consejos regalados a mis momentos de necesidad.

A LILIANA, MI ESPOSA; Por esos momentos tan valiosos que compartimos como estudiantes y que ahora llenas mi vida de felicidad, te doy gracias por tú ayuda, consejos y por estar junto a mi en todo momento, te amo.

A MAURICIO, MI HIJO; Haz venido a dar un nuevo sentido a mi vida y lo eres todo para mi, te quiero mi chiquito.

A MIS SOBRINOS; Por la alegría regalada en los momentos familiares.

A MIS AMIGOS Y COMPADRES; Carina y Willi, Ruth y Martín, Eva y Víctor, Adriana y Slawek, Paquito, Rafa, Marce, Andrea, Camilo, Nacho y Taís Nopal.

A BRISTOL-MYERS SQUIBB; Por regalarme la oportunidad de conocer gente muy especial de los departamentos con los que he tenido relación en especial a polvos orales, acondicionamiento y al depto. de líquidos inyectables, Rosalia, Lilia, las magos, Gpe. Orozco y Gpe. García.

GERENCIAS DE BRISTOL MYERS SQUIBB; mil gracias doy a los señores: Joel Herrera Médina, Elias Martínez Melena, Juan Ramírez Adame y Luciano López Horcasitas por las oportunidades regaladas en mi desarrollo profesional.

INDICE GENERAL

	página
INDICE DE ABREVIATURAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE CUADROS	iv
PARTE TEORICA	
1.0. INTRODUCCION	1
1.1.0. ANTECEDENTES	1
1.1.1. VIEJO MUNDO	1
1.1.2. NUEVO MUNDO	2
1.2.0. LEISHMANIASIS EN MEXICO	3
1.3.0. DISTRIBUCION GEOGRAFICA	5
1.4.0. ESPECIAL REFERENCIA A MEXICO	10
2.0. CARACTERISTICAS DEL AGENTE	15
2.1.0. AGENTE ETIOLOGICO	15
2.1.1. FORMA DE AMASTIGOTE	15
2.1.2. CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	15
2.1.3. FORMA DE PROMASTIGOTE	18
2.2.2. CLASIFICACION	20
2.3.0. CARACTERIZACION ANTIGENICA	24
3.0. PATOGENESIS	29
3.1.0. FUENTES DE INFECCION, RESERVORIOS Y VECTORES	29
3.2.0. MECANISMOS DE TRANSMISION	33
3.3.0. PERIODO DE INCUBACION	35
3.4.0. MECANISMO DE PATOGENICIDAD	36
3.4.1. ENTRADA AL HUESPED VERTEBRADO	36
3.4.2. INTERACCION CON EL MACROFAGO	39
3.4.2.1. MECANISMO DE UNION	39
3.4.2.2. MECANISMO DE PENETRACION	42
3.4.2.3. MECANISMOS INTRACELULARES	43
4.0. DIAGNOSTICO	47
4.1.0. DIAGNOSTICO CLINICO DIFERENCIAL	47
4.2.0. DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO	48
4.2.1. EXAMENES PARASITOSCOPICOS	48
4.3.0. TRATAMIENTO	50
4.3.1. LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA	50
4.3.2. LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA, LEISHMANIASIS VISCERAL Y LEISHMANIASIS CUTANEA DIFUSA	51
5.0. PARTE EXPERIMENTAL	52
5.1.0. JUSTIFICACION	53
5.2.0. OBJETIVOS	55
5.2.1. PARTICULARES	55
5.2.2. GENERALES	55
6.0. METODO Y TECNICAS PARA LA ADAPTACION Y CRECIMIENTO DE LOS PARASITOS DE LEISHMANIA	56
6.1.0. DESCRIPCION DEL METODO	56
6.1.1. REACTIVOS Y MATERIALES	58

6.1.2. PREPARACIONES	59
6.1.3. SIEMBRA	60
6.1.4. OBTENCION DEL KDNA DE LOS PARASITOS DE LEISHMANIA	62
7.0. METODO Y TECNICAS PARA LA ADAPTACION Y CRECIMIENTO DE LA CEPA DE E. COLI	65
7.1.0. DESCRIPCION DEL METODO	65
7.1.1. REACTIVOS Y MATERIALES	66
7.1.2. PREPARACIONES	67
7.1.3. SIEMBRA	67
7.1.4. SIEMBRA DE E.COLI HB101 EN MEDIO LURIA LIQUIDO CON Y SIN ANTIBIOTICO	68
7.2.0. REPLICACION DEL PLASMIDO PBR322	70
7.2.1. SELECCION DE LA ENZIMA DE DIGESTION	72
8.0. RESULTADOS Y ANALISIS	74
8.1.0. ESTRATEGIA DE RESTRICCION	75
8.1.1. SELECCION DE LA CEPA DE E.COLI HB101	77
8.1.2. ANALISIS DE RESULTADOS	79
8.2.0. REPLICACION Y EXTRACCION DEL PLASMIDO PBR322	81
8.2.1. ANALISIS DE RESULTADOS	87
8.3.0. IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LOS MINICIRCULOS DE KDNA DE LEISHMANIA L. MEXICANA	94
8.3.1. ANALISIS DE RESULTADOS	100
8.4.0. CLONACION DEL VECTOR PBR322 DIGERIDO CON LA ENZIMA DRA I CON MINICIRCULOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA - POR EL METODO DE TAILING	106
8.4.1. TRANSFORMACION DE E.COLI HB101 CON LAS CLONAS DE PBR322-MC Y PBR322-GS	109
8.4.2. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS CLONAS DE PBR322-MC Y PBR322-GS	109
8.4.3. ANALISIS DE RESULTADOS	111
9.0. DISCUSION	114
10.0. CONCLUSIONES	118
11.0. ANEXOS	119
12.0. BIBLIOGRAFIA	134

INDICE DE ABREVIATURAS

KDNA	=	DNA DE KINETOPLASTO
L	=	LEISHMANIA
DRA I	=	ENZIMA DE RESTRICCIÓN
Φ X 174	=	MARCADOR DE PESOS MOLECULARES
PB	=	PARES DE BASES
KD	=	KILODALTONES
GP 63	=	GLICOPROTEINA DENOMINADA 63 POR SU PESO MOLECULAR
PM	=	PESO MOLECULAR
LCD	=	LEISHMANIASIS CUTANEA DISEMINADA
LCL	=	LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA
PMN	=	POLIMORFONUCLEARES
FC	=	FACTOR EXCRETOR
MG	=	MILIGRAMOS
KG	=	KILOGRAMOS
ML	=	MILILITROS
IM	=	INTRAMUSCULAR
CO ₂	=	DIOXIDO DE CARBONO
RPMI	=	MEDIO DE CULTIVO PARA LEISHMANIA
mM	=	CONCENTRACION MILIMOLAR
N	=	CONCENTRACION NORMAL
10 X	=	SOLUCION 10 VECES SU CONCENTRACION
μ n	=	MICRONES

GS = **PACIENTE GUSTAVO SOLIS**
MC = **PACIENTE MARICRUZ**
LB = **CALDO DE CULTIVO LURIA**
NM = **NANOMETROS**
NG = **NANOGRAMOS**
MCL = **MICROLITROS**
EB = **BROMURO DE ETIDIO**

INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA NO. 1	DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE LEISHMANIA EN MEXICO.	6
FIGURA NO. 2	DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS LEISHMANIASIS EN MEXICO.	7
FIGURA NO. 3	ZONAS DE LA REPUBLICA MEXICANA DONDE SE-EXPLOTABA EL CHICOZAPOTE, SEGUN EL INSTITUTO BIOTECNICO NACIONAL.	12
FIGURA NO. 4	ZONAS AGRICOLAS Y FORESTALES DE LA PENINSULA DE YUCATAN.	14
FIGURA NO. 5A	AMASTIGOTE.	16
FIGURA NO. 5B	PROMASTIGOTE.	19
FIGURA NO. 6	LUTZOMYIA SP.	31
FIGURA NO. 7	CICLO BIOLOGICO DE LA LEISHMANIA.	34
FIGURA NO. 8	MODELO DE RECEPTORES DE MACROFAGOS PARA-LEISHMANIA.	40
FIGURA NO. 9	CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS PARASITOS - DE LEISHMANIA.	61
FIGURA NO. 10	REPLICACION Y EXTRACCION DEL PLASMIDO - PBR322.	81
FIGURA NO. 11	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DEL - PLASMIDO PBR322 EN AGAROSA NORMAL AL 0.8%	82
FIGURA NO. 12	COMPROBACION DE LA CONCENTRACION DEL PLAS- MIDO PBR322 EN AGAROSA NORMAL AL 0.8%.	83
FIGURA NO. 13	CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PBR322 EN GEL LMP (LOW MELTING POINT) AL 1.5%.	84
FIGURA NO. 14	CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DEL PLASMIDO PBR322 TRATADO CON LA ENZIMA BAP EN GEL- DE AGAROSA NORMAL AL 0.8%.	86
FIGURA NO. 15	CORRIMIENTO ELECTROFORETICO EN AGAROSA - NORMAL AL 0.8% DE LOS MINICIRCULOS DE - KDNA.	95

FIGURA NO. 16	CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LOS MINICIRCULOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA PURIFICADOS EN AGAROSA NORMAL AL 0.8%.	96
FIGURA NO. 17	CURVA DE CALIBRACION DE X 174 VS MINICIRCULOS DE MC.	97
FIGURA NO. 18	CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS CLONAS DE PBR322-MC Y PBR322-GS.	110

INDICE DE TABLAS

		Página
TABLA NO. 1	= CRECIMIENTO DE E.COLI HB101 EN MEDIO LURIA LIQUIDO Y AGAR CON ANTIBIOTICO Y SIN ANTIBIOTICO.	77
TABLA NO. 2	= CRECIMIENTO DE E.COLI HB101 EN LURIA AGAR SIN AMPICILINA.	77
TABLA NO. 3	= CRECIMIENTO DE LA BACTERIA E.COLI - HB101 EN MEDIO LURIA LIQUIDO CON - ESTREPTOMICINA.	78
TABLA NO. 4	= DIFERENCIACION DE LA CEPA BACTERIANA POR TRANSFORMACION CON EL PLASMIDO PBR322.	78
TABLA NO. 5	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PBR322 EN AGAROSA NORMAL AL 0.8%.	81
TABLA NO. 6	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DEL PLASMIDO - PBR322 EN GEL DE AGAROSA NORMAL AL 0.8%.	82
TABLA NO. 7	= COMPROBACION DE LA CONCENTRACION DEL PLASMIDO PBR322 EN GEL DE AGAROSA NORMAL AL 0.8% DE CONCENTRACION.	83
TABLA NO. 8	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PBR322 - EN GEL LMP (LOW MELTING POINT) AL 0.8%.	84
TABLA NO. 9	= TRATAMIENTO CON LA ENZIMA BAP DEL PLASMIDO PBR322 DIGERIDO CON LA ENZIMA DRA I.	85
TABLA NO. 10	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DEL PLASMIDO PBR322 TRATADO CON LA ENZIMA BAP EN GEL DE AGAROSA NORMAL AL 0.8%.	85
TABLA NO. 11	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO EN AGAROSA - NORMAL AL 0.8% DE LOS MINICIRCULOS DE - KDNA.	94
TABLA NO. 12	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LOS MINICIRCULOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA PURIFICADOS EN AGAROSA NORMAL LA CONCENTRACION DEL 0.8%.	96
TABLA NO. 13	= REACCION DE TAILING PARA KDNA DE MC.	106

TABLA NO. 14	= REACCION DE TAILING PARA KDNA DE GS.	107
TABLA NO. 15	= REACCION DE TAILING PARA EL VECTOR - PBR322 DRAI/BAP	107
TABLA NO. 16	= REACCION ANNEALING ENTRE EL VECTOR - PBR322 Y LOS KDNA DE MARICRUZ (MC).	108
TABLA NO. 17	= REACCION ANNEALING ENTRE EL VECTOR - PBR322 Y LOS KDNA DE GUSTAVO SOLIS - (GS).	108
TABLA NO. 18	= CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS CLONAS DE PBR322-MC Y PBR322-GS.	109

INDICE DE CUADROS

		Página
CUADROS NO. 1 Y 2	TAXONOMIA DE LAS ESPECIES CONOCIDAS DE LEISHMANIA QUE PARASITAN AL HOMBRE.	22,23
CUADRO NO. 3	VECTORES CONOCIDOS DE LEISHMANIASIS CUTANEA EN MEXICO.	32
CUADRO NO. 4	DIAGRAMA DE FLUJO PARA LEISHMANIA	57
CUADRO NO. 5	DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PLASMIDO PBR322	64
CUADRO NO. 6	DIAGRAMA DE FLUJO PARA E. COLI	69

1.0. INTRODUCCION.

1.1. ANTECEDENTES.

1.1.1. VIEJO MUNDO.

Al Parecer la primera descripción de la Leishmaniasis-Visceral registrada en los anales de la historia es atribuida a EL-RAZI en Irak alrededor del año 1500 D.C. (43). En el 1885 Altouyan publicó un trabajo sobre el padecimiento en Aleppo, - Siria (122), y en ese mismo año Cunniggham observó por primera vez a los parásitos a los que supuso "Esporas Incluidas" en una amiba.

En 1898 Piotr Fokitca Boroky al estudiar casos de Leishmaniasis cutánea descubrió a su agente causal, pero al ser publicado su trabajo en ruso, pasó desapercibido para los científicos occidentales (122).

En 1903 Leishman hace una descripción del agente parasitario, dos meses antes de que Donovan hiciera lo mismo de forma independiente (121), ese mismo año Ross establece el género Leishmania en honor a Leishman (106,121), y Wright describe al parásito llamándolo Leishmania trópica causal del " Botón de Oriente " (122).

En 1904 Roger logró cultivar los parásitos del Kala-azar en sangre humana citrada, descubriendo la forma flagelar o promastigote. Cuatro años después Nicolle y Sincre logran obtener los cultivos a partir del " Botón de Oriente " (122).

Wenyon en 1911 sugirió que el flebotomo era el transmisor de la Leishmaniasis cutánea, hecho comprobado hasta 1921 por Sergent, Parrot y Bequet en el "Botón de Oriente" (122).

1.1.2. NUEVO MUNDO.

El primer dato histórico de la Leishmaniasis podría situarse en el período pre-clásico (2000-1800 A.C.) esta posibilidad se basa en la existencia de una urna de arcilla de la Cultura Olmeca descubierta en la región del Usumacinta en el Estado de Tabasco, la cual presenta "lesiones cutáneas" que podrían corresponder a la Leishmaniasis tegumentaria difusa (121)

En América Latina, la Leishmaniasis ya se conocía, una variedad de la forma Cutánea, era llamada desde épocas pre-clásicas como espundia o "uta" (del quechua: ut=roer). Los ceramistas del antiguo Perú representaron formas de "uta" en piezas de cerámica cocida, "llamadas huecos antropomórficos" (I). En 1788 Hipólito Ruiz, botánico español que se encontraba en Perú hizo una descripción sobre un padecimiento caracterizado por la presencia de "llagas corrosivas" en la cara y de lo cual comentó "los naturales atribuyen el origen de la enfermedad a la picadura de un pequeñísimo insecto llamado uta" (122)

En 1885 Cerqueira en Brasil comparó la Leishmaniasis Americana con el "Botón de Oriente" al observar importantes diferencias e Indalecio Camacho en Colombia, sostuvo que se trataba del mismo padecimiento, solo que únicamente modificado por el clima. (122)

Vianna en 1911, al notar las diferencias clínicas de la Leishmaniasis americana con las del "Botón de Oriente" creó una nueva especie la Leishmaniasis braziliensis para definir el agente etiológico específico de la Leishmaniasis americana- (122), y en el año 1912 utilizó por primera vez el Tartrato - Emético en el tratamiento de la Leishmaniasis americana. Debido al éxito consiguió que los antimoniales fueran el medicamento de elección hasta la actualidad ya que son eficaces para todas las formas clínicas presentadas por la Leishmania en el mundo.

1.2.0. LEISHMANIASIS EN MEXICO.

Seguramente las Leishmaniasis ya existían en América precolombina y desde luego en México, y Diego López de Colludo (121), en su historia de Yucatán, relató que los primeros franciscanos que intentaron convertir a los Itzaes del Petén, encontraron indígenas con las "Orejas Podridas".

En 1977 Padilla Bolaños (123), publicó el hallazgo de Idolillos con las "Orejas Podridas" mutilaciones que no parecían ser debidas al tiempo, sin embargo el primero que descubrió la Leishmaniasis tegumentaria en Yucatán y por ende en México fue Saidelin en 1912 (121), quien la llamó Ulcera de los Chicleros por encontrar las lesiones ulcerosas con mucha frecuencia en las orejas de estos trabajadores.

En 1913, Hernández Fajardo publicó un trabajo sobre esta parasitosis en Yucatán y ese mismo año Cervera describió un caso en la revista de la Escuela Médico Militar (123).

El Primer estudio epidemiológico mexicano sobre esta zoonosis fué realizado en 1942 por Beltrán y Bustamante (16), se hizo en campamentos Chicleros de la Península de Yucatán. En 1944 Millan y Chávez, describieron el primer caso de Leishmaniasis cutánea diseminada en el mundo, pero tuvieron la poca fortuna de etiquetarlo como Leishmaniasis cutánea infantil y publicarlo en una revista de escasa circulación, por lo que se reconoce internacionalmente a Prado Barrientos de Bolivia y a Convit y Lapena de Venezuela como los primeros en describirla (de manera independiente) a pesar de haberlo hecho hasta 1948.

En 1952, Báez - Villaseñor y Col., publicaron el primer caso de Leishmaniasis visceral mexicano: un niño nacido y residente del municipio de Huitzuco, Gro. en la cuenca del río balsas, aparentemente la única región endémica en México donde hasta la actualidad se han encontrado 8 casos más (2, 18, 123, 125) los últimos, un lactante mayor nativo de Chiautla de Tapia, Puebla y un adulto masculino parapléjico originario y residente de la Ciudad de México enviado a un centro de rehabilitación en Metepec, Puebla donde aparentemente adquirió la enfermedad que lo condujo a la muerte. En 1987 y 1988, se detectaron 2 casos más que murieron poco después: dos adultos uno proveniente de la costa de Oaxaca (el primero alejado de la confluencia de los estados de Puebla, Morelos y Guerrero) y el otro del estado de Morelos (123).

En 1953, Biagi durante su servicio social en Escar - cega Camp. Observó que la úlcera de los chicleros se comportaba en forma más parecida a la Leishmaniasis cutánea causada

por L.trópica que a la producida por L.Braziliensis, que se suponía entonces era la única especie que producía Leishmaniasis tegumentaria en América y, considerándola una subespecie de aquella, la llamo L.Trópica mexicana. Este criterio fue avalado por Garnham y Adler quienes la convirtieron en una nueva especie: L.Mexicana desde entonces se creía que junto a L.Chagasi eran las únicas especies existentes en México, hasta que en 1987 Velasco y Col. describieron a L.Braziliensis en el Istmo de Tehuantepec (117), respecto a ella se sospechaba su presencia ya que había sido observada en Belice causando úlcera de los chicleros (123).

En 1965, Márquez F. (90), publicó el estudio del primer caso de Leishmaniasis cutánea diseminada en México y cinco años después, Ramírez presentó en un congreso de dermatología 3 casos de Leishmaniasis cutánea diseminada descubiertos por Portales y colaboradores en Coahuila (103).

1.3. DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

Las Leishmaniasis en México se distribuyen al menos en 17 entidades, desde Coahuila, Nuevo León, y Tamaulipas por el norte, hasta la Península de Yucatán y Chiapas al sureste. Por el golfo involucra los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y por el pacífico los de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacan, Jalisco y Nayarit; - También afecta estados mediterraneos como San Luis Potosi, Morelos y Puebla (figuras 1 y 2).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE LEISHMANIA EN MEXICO



Leishmania mexicana mexicana



Leishmania braziliensis braziliensis



Leishmania donovani chagasi

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS LEISHMANIASIS EN MEXICO



-  *Leishmaniasis cutanea localizada*
-  *Leishmaniasis cutanea deseminada*
-  *Leishmaniasis visceral*
-  *Leishmaniasis muco-cutanea*

Las Leishmaniasis tienen una amplia distribución mundial afectando cuando menos, a 80 países de Europa, América, - Asia y Africa (35,87).

Las formas cutáneas han sido reportadas en 68 países aproximadamente, situados entre las latitudes 46 grados norte 30 grados sur, con una altura hasta de 3000 metros sobre el nivel del mar (119).

En el viejo mundo las especies asociadas con este tipo de manifestaciones clínicas son: L.Tropica en el norte de Africa y de Europa, particularmente en los países mediterráneos (82), y L.Major en el Norte, Oeste, Centro y Este de Africa y en la región meridional de la URSS (119), ambas especies se encuentran en varios países del Medio Oriente así como en la India (119). L.Aetiopica se ha encontrado en Etiopia y Kenia y se sospecha que posiblemente exista en la URSS (119).

En el Nuevo Mundo las formas cutáneas son producidas por subespecies relacionadas con el complejo L.Mexicana y por L.Braziliensis que afectan por lo menos a 24 países (119). La Leishmaniasis ha ido en aumento debido a la colonización con fines agropecuarios y mineros, presentándose frecuentemente en áreas selváticas, preselváticas y rurales.

En 1984, fueron notificados a la OPS cerca de 16,000 casos originarios de 14 países de América (14). Sin embargo, estos datos parecen no reflejar la verdadera magnitud del problema, debido posiblemente, a que la Leishmaniasis no es de notificación obligatoria.

Es hasta 1989 hasta que Grimaldi nos proporciona un panorama más claro al publicar una extensa revisión sobre la

distribución geográfica y epidemiológica de las Leishmaniasis en el nuevo mundo, en la que incluye más de 1000 cepas de *Leishmania* aisladas a partir de pacientes, reservorios y vectores de nuestro continente demostrándose que la enfermedad afecta, por lo menos a 24 países desde el sur de Texas, ya reportadas por otros autores (112,55) hasta el norte de Argentina (53).

Respecto a la distribución de las Leishmaniasis cutáneas asociadas con parásitos del complejo *Leishmania braziliensis* tenemos que esta es la más ampliamente distribuida en América encontrándose presente en 5 países de América Central: Belice, Costa Rica, Guatemala, Honduras y Panamá y en 7 países Sudamericanos: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Paraguay, Perú y Venezuela (53).

L. Guyanensis: se ha encontrado en Guyana, Guyana Francesa, en el Norte de Brasil principalmente en la cuenca del Amazonas (80,124), Surinam y Colombia.

L. Panamensis: se ha encontrado distribuida principalmente en Centro América, Costa Rica, Honduras, Nicaragua y Panamá así como en Colombia y la Costa de Ecuador (52).

L. Peruviana: ha sido reportada en los Andes Peruvianos y en Argentina.

L. Amazonensis: se distribuye principalmente en Sudamérica, en la Cuenca Amazónica (75,76), y en el Matogroso en Brasil, Trinidad, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Perú y Venezuela, así como en los países centroamericanos de Costa Rica y Panamá (52).

L. Venezuelensis: es transmitida en alrededor de 54 países entre las latitudes 45 grados Norte y 30 grados Sur y has -

ta 2400 metros de altura sobre el nivel del mar (83). Es considerada como una enzootia en Africa, América, Asia y Europa con excepción de Australia (119).

En el viejo mundo son L. Infantum, en el Norte de Africa parte del Oriente Medio, India y países Mediterráneos de Europa y L. Donovanii en el Este, Oeste, Centro de Africa y Noroeste de China, India, Asia Central y Oriente Medio, las especies que se encuentran infectando vectores, reservorios y humanos en zonas rurales y periurbanas (14, 119).

En el Nuevo Mundo L. Chagasi ha sido aislada e identificada sólo en cuatro países: Bolivia, Brasil, Colombia y Honduras sin embargo la L. Visceral se encuentra ampliamente distribuida en Argentina, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Martinitica, México, Nicaragua, Paraguay, Surinam, Estados Unidos y Venezuela (52).

1.4. ESPECIAL REFERENCIA A MEXICO.

En México la Leishmaniasis afecta, por lo menos a 17 entidades federativas, las formas cutáneas en general se extienden desde la faja fronteriza de Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León, - hasta la frontera con Guatemala, afectando además a los estados de San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Morelos, Michoacán, Jalisco y Nayarit - (123).

Aunque algunas cepas aisladas de pacientes con LCL han sido tipificadas como L. Mexicana, en un caso originario de Oaxaca

ta 2400 metros de altura sobre el nivel del mar (83). Es considerada como una enzootia en Africa, América, Asia y Europa con excepción de Australia (119).

En el viejo mundo son L. Infantum, en el Norte de Africa parte del Oriente Medio, India y países Mediterráneos de Europa y L. Donovanii en el Este, Oeste, Centro de Africa y Noroeste de China, India, Asia Central y Oriente Medio, las especies que se encuentran infectando vectores, reservorios y humanos en zonas rurales y periurbanas (14, 119).

En el Nuevo Mundo L. Chagasi ha sido aislada e identificada sólo en cuatro países: Bolivia, Brasil, Colombia y Honduras sin embargo la L. Visceral se encuentra ampliamente distribuida en Argentina, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Martinica, México, Nicaragua, Paraguay, Surinam, Estados Unidos y Venezuela (52).

1.4. ESPECIAL REFERENCIA A MEXICO.

En México la Leishmaniasis afecta, por lo menos a 17 entidades federativas, las formas cutáneas en general se extienden desde la faja fronteriza de Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León, hasta la frontera con Guatemala, afectando además a los estados de San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Morelos, Michoacán, Jalisco y Nayarit (123).

Aunque algunas cepas aisladas de pacientes con LCL han sido tipificadas como L. Mexicana, en un caso originario de Oaxaca

se identificó a L. Braziliensis como etiológico de la forma localizada.

La forma anérgica o Leishmaniasis cutánea localizada se ha reportado en 5 diferentes estados: Tabasco (47,85,124,86,88-118,64), Nuevo León (112), Michoacán, Oaxaca y Veracruz (124) y ha sido atribuida en algunos casos a L. Mexicana (120).

Respecto a L. Mucocutánea o espundia, sólo se han encontrado casos aislados en los estados de Jalisco (56), Campeche (123), y Tabasco (47,64,86,88,89,118).

La L. Visceral o kala-azar parece estar restringida a la Cuenca del Río Balsas (18,19,123), abarcando regiones de los estados de Puebla (2), Guerrero (15), Morelia, Michoacán, Oaxaca (123), en el estado de Tabasco existen todas las formas cutáneas (LCL, LCD, LCM), particularmente en la región de la Chontalpa que parece ser la mayor y más variada zona endémica del País (16,29,-47,64,88,118).

En esta región se ha observado una tendencia a la adquisición peridomiciliaria de la enfermedad afectando de esta manera y con mayor frecuencia a la población infantil (29).

En un estudio realizado por Bustamante (16), hace mención a zonas donde existen en el País de Chicozapote donde eran frecuentes los casos de Leishmaniasis, como se apresia en la figura 4, además de la faja de la Península de Yucatán los bosques de Chicozapote cubren areas relativamente extensas en las 2 costas casi en toda su extensión. En algunas de estas zonas especialmente en la parte limítrofe en los Estados de Tamaulipas y Veracruz en el Golfo, antiguamente se explotó el chicle con cierta intensidad pero a la fecha tales explotaciones estan prácticamente abandonadas (figura no. 3).

FIGURA NO. 3

ZONAS DE LA REPUBLICA MEXICANA DONDE SE EXPLOTABA EL CHICOZAPOTE, SEGUN EL INSTITUTO BIOTECNICO NACIONAL.

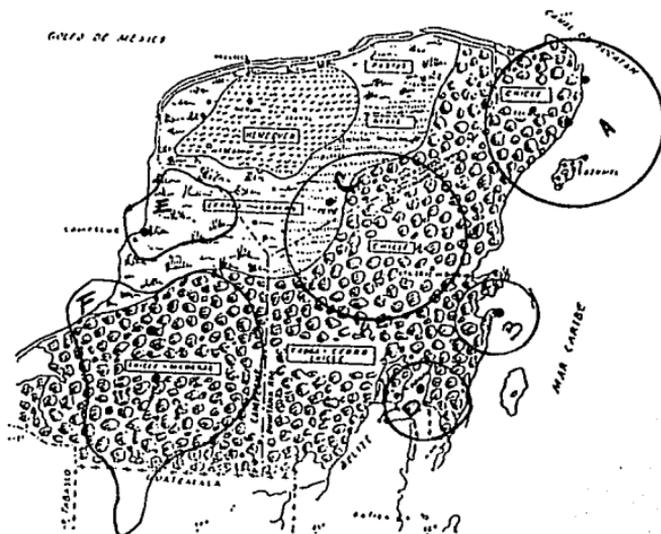


Beltrán, E. y Bustamante, M. "Datos epidemiológicos - acerca de la úlcera de los chicleros en México". 1992 p.p. 1-28

Se puede decir que la zona clásica donde existe la *Leishmaniasis americana* es la bien conocida parte boscosa de la Península de Yucatán, aunque hay posibilidades de otros focos fuera de ella (mapa 4), el propósito era establecer con la mayor precisión los límites del padecimiento en la Península de Yucatán confirmando de que la *Leishmaniasis americana* se presenta preferentemente en las partes bajas, donde existen bosques húmedos, en las regiones Orientales y Sudoccidentales de la península (figura 4) con la finalidad de observar más claramente la superposición de los campamentos chicleros en la Península de Yucatán, por lo que fué dividida en 5 zonas distintas. La zona A comprende el extremo NE de la Península con los campamentos situados en las proximidades de Santa María y Puerto Morelos y los campamentos ubicados en Isla de Mujeres. La zona B situada un poco más sobre la costa comprende los campamentos ubicados en los alrededores de la Bahía del Espíritu Santo. La zona C está situada en la parte central del territorio de Quintana Roo, colindando con el estado de Yucatán en las inmediaciones de la población de Peto y se extiende desde esos límites hasta Carrillo Puerto. La zona D comprende campamentos situados en las proximidades de Bacalar y Riohondo, cerca de los límites con Belice, por último la zona E se sitúa en el Estado de Campeche, teniendo como puntos centrales los pueblos de Matamoros, Mamantel y la finca de San Rafael, extendiéndose hacia los límites con el estado de Tabasco y la República de Guatemala.

FIGURA NO. 4

ZONAS AGRICOLAS Y FORESTALES DE LA PENINSULA DE YUCATAN



Las zonas afectadas por *Leishmania l. mexicana* son las identificadas como A, B, C, D, E, y F.

Beltrán, E. y Bustamante, M. "Datos epidemiológicos - acerca de la úlcera de los chicleros en México". 1992 p.p. 1-28

2.0.- CARACTERISTICAS DEL AGENTE

2.1.- AGENTE ETIOLOGICO.

El agente etiológico de las Leishmaniasis, son protozoarios intracelulares del género *Leishmania* morfológicamente idénticos entre sí. Las Leishmaniasis son causadas por varias especies y subespecies del complejo de *Leishmania*. Es un protozoario que no solo parasita al hombre sino también a mamíferos domésticos y silvestres.

El género *Leishmania* comprende las formas de amastigote y promastigote.

2.1.1).- FORMA DE AMASTIGOTE.

Es la forma parásitaria y proviene de la forma infectiva o promastigote, se observan en los tejidos de los vertebrados infectados o en cultivos de tejidos, los amastigotes en las Leishmaniasis cutáneas se encuentran infectando células del SRE de la piel y los amastigotes de la Leishmaniasis visceral se encuentran parasitando el SRE de bazo, hígado y médula ósea.

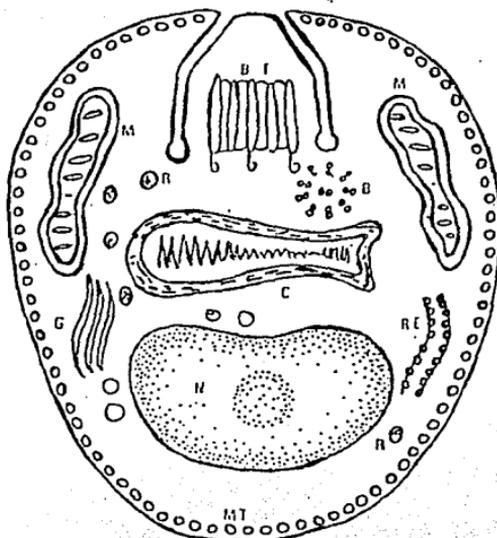
2.1.2).- CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS.

La forma de amastigote del protozoario es ovoide, mide 2-6 micrones de longitud por 1-3 micrones de ancho, carece de flagelo y de membrana ondulante, consta de núcleo excéntrico (N) y de un citoplasma claro en el que resulta una estructura muy basófila y elongada, el citoplasma (C), (106).

El núcleo se encuentra en su extremo posterior, es compac

AMASTIGOTE

FIGURA NO. 5A



Componentes de la forma de Amastigote : BF (bolsaflagelar), M (mitocondia), R (ribosomas), C (kinetoplasto), N (núcleo), RE (retículo endotelial), MT (microtubulos) B (blefaroplasto), G (aparato de Golgi).

Proporcionado por Martínez Marañón, R. INDRE 1993

to y con cromatina granulosa (103,121), por microscopía electrónica es posible observar numerosos microtúbulos (MT) por dentro de la membrana que sirven de citoesqueleto (106).

El citoesqueleto se localiza por encima del núcleo y se asemeja a una mitocondria. Tiene forma basilar aunque puede extenderse circularmente por la mayoría del parásito (106,121).

El citoesqueleto contiene también un DNA concatenado denominado kDNA y consta de dos componentes:

EL MAXICIRCULO: Que tiene de 20,000 - 40,000 pares de bases (pb), que codifican para las proteínas mitocondriales y se presentan de 10 - 20 copias por célula.

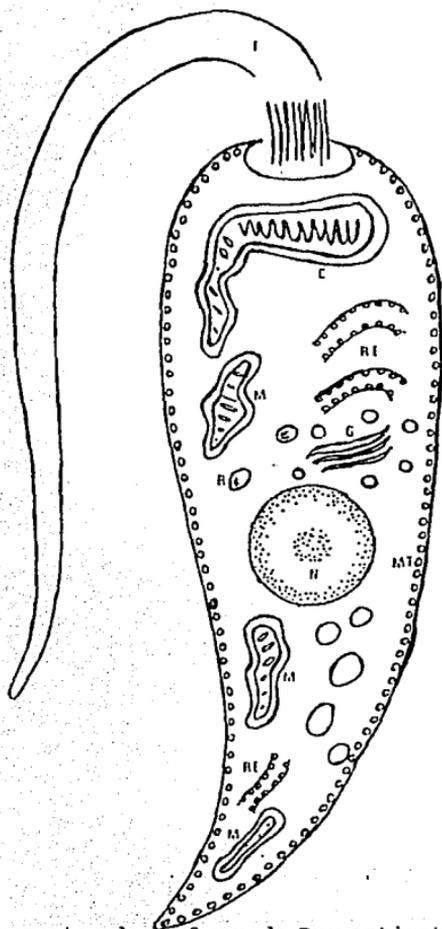
EL MINICIRCULO: Tiene de 500 - 2,500 pares de bases (pb) y esta presente en 10,000 copias por célula del cual no se conoce su función y tiene diferentes clases de secuencia y este número de clases de secuencia depende de la especie.

Este kDNA y especialmente el DNA de los minicírculos, - fué el primer componente usado como herramienta molecular en la caracterización de los tripangosomátidos debido a la relativa abundancia y facilidad de obtención. (4)

En 1980 Morel y Simpson describen el análisis de esquizodemas (huella digital), para la caracterización de hemoflagela dos patógenos (6), este análisis consistía en la digestión por endonucleasas de restricción de los minicírculos de kDNA de diferentes aislados de T.Cruzy.

Cercano al citoesqueleto existe una estructura llamada hendidura flagelar o blefaroplasto (B), a partir de la cual se originará el flagelo, tiene la forma característica de 9 pares -

FIGURA NO. 5B



Componentes de la forma de Promastigote : F (flagelo), M (mitocondria), R (ribosomas), C (kinetoplasto), N (núcleo), RE (retículo endotelial), MT (microtubulos), G (aparato de Golgi)

Proporcionado por Martínez Marañón, R. INDRE 1993

de túbulos periféricos y un par central (106).

Del blefaroplasto se extiende la bolsa flagelar (BF), - que albergará al flagelo en formación. En el citoplasma hay ribosomas libres (R), y un aparato de Golgi (G), junto con granulos densos y claros, variables según la especie (106), es posible observar también mitocondrias (M) y el retículo endotelial (RE).

Los amastigotes se dividen por fisión binaria y pueden verse libres cuando el macrófago se desintegra (106).

2.1.3).- FORMA DE PROMASTIGOTE.

Los promastigotes se encuentran en el insecto vector y en los medios de cultivo libres de células. Son fusiformes y miden de 15 - 40 micrones de largo por 3 micrones de ancho y el cinetoplasto se encuentra desplazado hacia el extremo anterior del cual emerge un flagelo (F), sin formar membrana ondulante previa (103,106,121).

La Bolsa Flagelar o blefaroplasto es pequeña y posee a diferencia del amastigote una estructura en forma de barra con distribución paraxial situada dentro del blefaroplasto la que parece estar relacionada con el movimiento del flagelo (95).

El promastigote en el cinetoplasma posee un gran número de microtúbulos submembranosos (MT), los cuales tienen una distribución homogénea y una variedad de gránulos de densidad variable, se observan ribosomas (R) y acúmulos de vesículas paraflagelares o vecinas al aparato de Golgi (G) el cual es muy prominente (106).

Es posible observar mitocondrias (M) y un cuerpo mitocondrial que se prolonga a partir del cinetoplasto, así como un retículo endoplásmico (RE).

2.2.0.- CLASIFICACION.

En 1974, Laison y Shaw (53), utilizan como criterios de clasificación al vector, la localización anatómica en el mismo, la patogenicidad en la piel del hamster y el crecimiento en los medios de cultivo para dividir al género *Leishmania* en dos grupos: Los complejos *L. mexicana* y *L. braziliensis*.

Cinco años después, estos mismos autores (54) dividen las *Leishmanias*, de acuerdo a la región anatómica del vector en el que se desarrollan:

A). Hypopyliaria: en el intestino posterior; píloro, íleon y recto.

B). Peripyliaria: en el intestino posterior, medio y anterior.

A). Suprapiyliaria: solamente en el intestino medio y anterior.

Los parásitos relacionados con el complejo *Leishmania braziliensis* pertenecen al grupo peripyliaria; los del complejo *L. mexicana*, *L. tropica*, y *L. donovani* al Suprapiyliaria, las especies pertenecientes al hipopyliaria no infectan al hombre.

Sin embargo esta metodología no está exenta de discusión.

nes, ya que algunos aislados de *Leishmania* presentan patrones enzimáticos tan similares que originan resultados contradictorios; Al inicio de la década pasada el desarrollo de anticuerpos monoclonales permitió distinguir a *L. mexicana* de *L. braziliensis* (92) mediante la reactividad de éstos con antígenos especie-específicos del parásito (análisis de serodemas), (53).

Posteriormente, fue posible contar con monoclonales, capaces de reconocer epítomos a nivel de subespecie (53,92), e incluso entre promastigotes y amastigotes de éstas (53,92). A pesar de los avances en la tipificación de cepas, aún existen discrepancias. Por ejemplo, estudios moléculares han demostrado que *L. pifanoi* y *L. garnhami* no han sido realmente diferenciadas de *L. mexicana* de *L. amazonensis* respectivamente. Así mismo, se ha encontrado similitud entre *L. braziliensis* y *L. peruviana*, por lo que se sospecha que esta última es una variante de *L. braziliensis* y no una especie. Por otra parte, el análisis de zimodemas y serodemas demuestran que *L. chagasi* y *L. infantum*, están tan fuertemente relacionadas, que podrían representar la misma especie (52).

Sin embargo, en 1987 Laison y Shaw (78), retomaron el criterio de clasificación de acuerdo al sitio de localización en el vector y proponen que aquellas especies que pertenecen al grupo peryfiliaria sean asignadas a un nuevo subgénero, denominado *VIANNAYA*, y las del grupo suprapyliaria al subgénero *LEISHMANIA* (80). Esta nueva clasificación ha sido aceptada por algunos autores (80,113), para evitar confusiones, en las páginas siguientes se utiliza la nomenclatura propuesta en 1986 durante el

segundo simposium sobre taxonomía y filogenética de *Leishmania*
(ver cuadros No. 1 y 2).

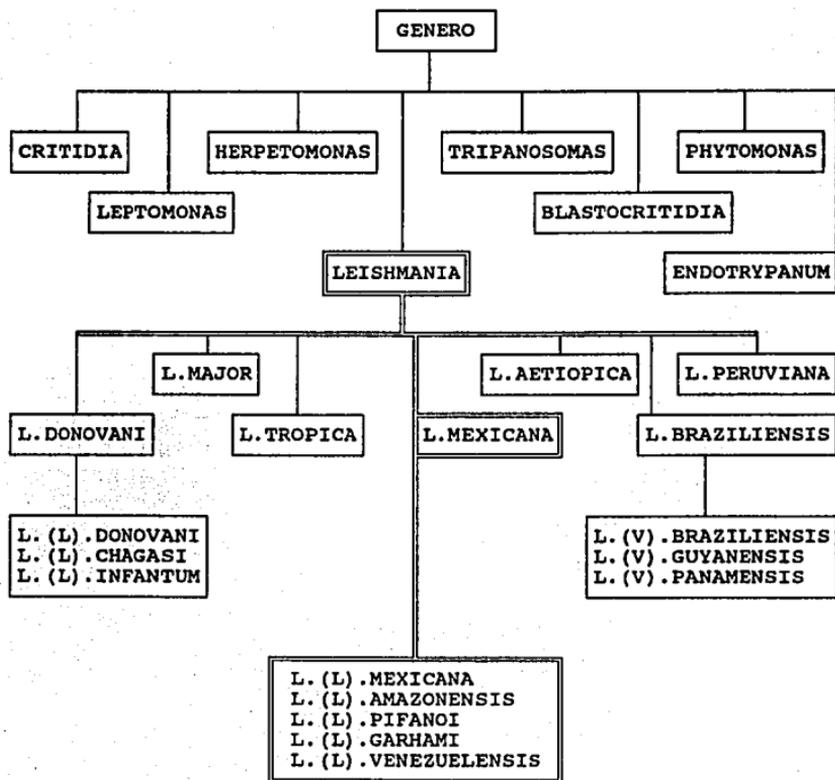
CUADRO NO. 1

TAXONOMIA DE LAS ESPECIES CONOCIDAS DE *LEISHMANIA*
QUE PARASITAN AL HOMBRE

PROTOZOA

PHYLUM	SARCOMASTIGOPHORA
SUBPHYLUM	MASTIGOPHORA
CLASE	ZOMASTIGOPHORA
ORDEN	KINETOPLASTIDA
SUBORDEN	TRIPANOSOMATIDA
FAMILIA	TRIPANOSOMATIDAE
GENERO	<i>LEISHMANIA</i>

CUADRO NO. 2



Leishmaniasis en México, manual INDRE 1992.

En los últimos años se han desarrollado otros métodos de identificación como son; serotipificación del factor excretor, análisis de moléculas glicosiladas de superficie mediante aglutinación con lecitinas, radiorespirometría, tipificación de ácidos grasos, hibridación del kDNA ESPECIE-ESPECIFICO por southern y dot-blot (52,58), determinación de las densidades de flotación del kDNA mediante endonucleasas de restricción (48,57).

En la actualidad la hibridación con sondas de kDNA ESPECIE-ESPECIFICOS (SOUTHERBLOT), representa una metodología prometedora (111).

En México se han realizado estudios encaminados a la identificación de *L. mexicana* mediante el uso de sondas de kDNA permitiendo en un futuro muy próximo, contar con la metodología necesaria para una correcta tipificación de cepas nacionales(79).

2.3.0.- CARACTERIZACION ANTIGENICA.

El estudio de antígenos superficiales de *Leishmania* se ha expandido considerablemente desde la aplicación de iodo 125 para marcar la superficie de estos parásitos. Mediante autoradiografía a partir de gel bidimensional con superficie yodada ha podido determinarse que existe sobre los promastigotes de *Leishmania mexicana* un polipéptido de P.M. 63 kd (121), de manera abundante. Este polipéptido ha sido también encontrado abundantemente en promastigotes de *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica*, estudios inmunológicos de reacción cruzada de diferentes especies de *Leish*

manja sugieren que el polipéptido de 63 kd se encuentra presente en Leishmanias del Nuevo y del Viejo Mundo (121).

La reciprocidad de la respuesta de hipersensibilidad retardada manifiesta entre animales inmunizados con L. mexicana y retados con L. mexicana, L. (L.) amazonensis, L. braziliensis, L. garnhami sugiere la presencia de antígenos compartidos por todas estas cepas capaces de fomentar una respuesta de hipersensibilidad retardada contra el parásito.

Se ha comunicado también la presencia de antígenos compartidos entre L. mexicana y L. tropica con reciprocidad inmunológica en cuanto a linfoblastogénesis in vitro, hipersensibilidad tardía y protección contra la infección, pero poco se conoce acerca de la reciprocidad inmunológica que en términos de protección existe entre las Leishmaniasis americanas (99,121).

La existencia de carbohidratos sobre la superficie de promastigotes fué inicialmente indicada por la habilidad del parásito para aglutinar con varias lectinas. A partir de este hallazgo ha sido demostrado que los promastigotes en su superficie poseen residuos de azúcares.

Posteriormente se encontró que el polipéptido identificado en L. mexicana, es una glicoproteína de 63 kd (GP 63) y que contiene manosa y residuos de N-acetil-glucosamina y N-acetil galactosamina (121).

Una consecuencia interesante de la interacción con las lectinas ha sido la identificación de subpoblaciones de promastigotes altamente infectivos, se ha demostrado que los promastigotes no son en realidad una población simple y homogénea, sino que experimentan una diferenciación tanto en cultivo como en el

mosquito, pasando de un estado no-infectivo a uno infectivo. esto quiere decir que el contenido de carbohidratos y por lo tanto su mosaico antigénico cambia para lograr su máxima infectividad.

Por medio de western-blot e inmunoprecipitación, fué posible determinar la existencia de un antígeno superficial de aproximadamente 116 kd, presente en formas infectivas exclusivamente (121).

Los antígenos de superficie del amastigote no han sido muy estudiados. Sin embargo, Handman y Curtis publican un estudio comparativo de proteínas superficiales de promastigotes y amastigotes de *L. major*, en el cual encuentran que el patrón generado por los amastigotes es de gran complejidad y que el antisuero anti-promastigote inmunoprecipita proteínas superficiales del amastigote, indicando que la mayoría de los antígenos son comunes a ambos estados del parásito.

Sin embargo, existen antígenos específicos de estado, en *L. major* se han encontrado polipéptidos de 43 y 94 kd característicos de amastigotes y un polipéptido de 50 kd exclusivo de promastigotes (121).

Se han reportado también dos anticuerpos monoclonales contra polipéptidos de 43 y 92 kd presentes en promastigotes de *L. mexicana*.

Respecto a su contenido de carbohidratos, también se han observado diferencias. Un estudio de *L. donovani* con aglutininas específicas indica una unión selectiva de los promastigotes a determinadas lectinas, diferentes a las que se unen los amastigotes

si esta alteración de azúcares superficiales es debida a los cambios en los azúcares que forman parte de las glicoproteínas, esto todavía no ha sido investigado .

Adicionalmente, los promastigotes de *L. donovani* poseen un glicoconjugado rico en carbohidratos unido a la superficie y conocido como Factor Excretor (FE) que es vertido hacia el medio-externo.

Comparando la parte soluble y la parte unida a la membrana, se determinó por electroforesis de intercambio iónico que la porción unida a la membrana posee una región hidrofóbica, posiblemente un lípido o pequeñas proteínas hidrofóbicas, pero el mecanismo de vertido aún es desconocido.

Otros autores, han demostrado moléculas similares pero inmunológicamente distintas, liberadas de promastigotes de *L. mexicana* y *L. major*.

La existencia de una variedad de enzimas asociadas a la membrana de promastigotes ha sido recientemente reportada por algunos investigadores. Glew y colaboradores aislaron a partir de *L. donovani* una glicoproteína que contiene manosa y que tiene un P.M. de 170 kd; Es una hidrolasa ácida con una especificidad de sustrato muy amplia (121).

Dwyer y Gottlieb reportaron una fosfatasa ácida con diferente especificidad de sustrato que puede ser excretada por el amastigote dentro de la vacuola parasitófora. Estos mismos investigadores han demostrado actividad de 3' y 5' nucleotidasa asociada a la membrana de promastigotes de *L. donovani*. Estas enzimas son capaces de hidrolizar 3' y 5' AMP.

Tinciones citoquímicas de membranas demuestran que las enzimas están orientadas hacia la superficie externa de la membrana, por lo cual puede representar el paso inicial de la defosforilación, facilitando el transporte de los nucleótidos a través de la membrana.

Han sido también aislados tres antígenos a partir de promastigotes de *L. donovani*, los cuales pueden ser distinguidos de acuerdo a su termoestabilidad.

3.0.- PATOGENESIS

3.1.0.- FUENTES DE INFECCION, RESERVORIOS Y VECTORES.

La Leishmaniasis es una enfermedad primaria de pequeños mamíferos, principalmente roedores silvestres, desdentados y marsupiales (*L.cutánea*, *L.mucocutánea*), así como de cánidos silvestres y domésticos (*L.visceral*), (93,106,121 y 123).

Los Seres Humanos afectados por la parásitosis son también reservorios y fuentes de infección.

En México los reservorios de Leishmaniasis cutánea son roedores silvestres de hábitos arbícolas (121), al igual que en Belice, estos podrían ser: *Ototylomys phyllotis*, *Heteromys-desmarestyanus*, *Nyctomys sumichrasti* y *Sigmidon hispidus*. (123).

Se sospecha que en México, el perro doméstico pueda ser el reservorio de la Leishmaniasis visceral, aunque no hay ningún estudio concluyente al respecto. Se han observado lesiones muy sugestivas en estos animales, pero el aislamiento del parásito no ha sido posible en la mayoría de los casos (123), los roedores a diferencia del hombre, solo sufren lesiones superficiales muy difíciles de observar (121).

En un estudio efectuado por Velasco y Col. en Santiago Halahui, Oax. en 1981, de un total de 139 perros estudiados se encontraron 7 con lesiones ulcerosas típicas en nariz y orejas y aunque el aspecto histopatológico sugería fuertemente el diagnóstico de Leishmaniasis solo se identificó el parásito en un perro (123).

En 1987, Velasco y Lebrija aislaron *Leishmania sp.* de un coatí o tejón (*Nassua narica*) con lesiones mucocutáneas nasales tres años antes, al mismo coatí se le habían recortado las orejas por padecer lesiones ulcerosas (123), las lesiones del coatí fueron muy resistentes a los antimoniales y en el cultivo y en el hamster mostraron conducta similar a *L. braziliensis*. Desafortunadamente no se realizaron en este caso los estudios taxonómicos bioquímicos y/o inmunológicos adecuados, sin embargo, por su conducta en el tejón, el hamster, y el medio de cultivo y por su resistencia a la terapia con antimoniales, pareció tratarse de *Leishmania braziliensis* (123).

La transmisión la realizan pequeños dípteros de 3 - 5 mm de longitud, pertenecientes a varios géneros, principalmente *FLEBOTOMUS* que transmiten la Leishmaniasis en el Viejo Mundo y *LUTZOMYA* que lo hace en el nuevo mundo (4,106,107,118,121).

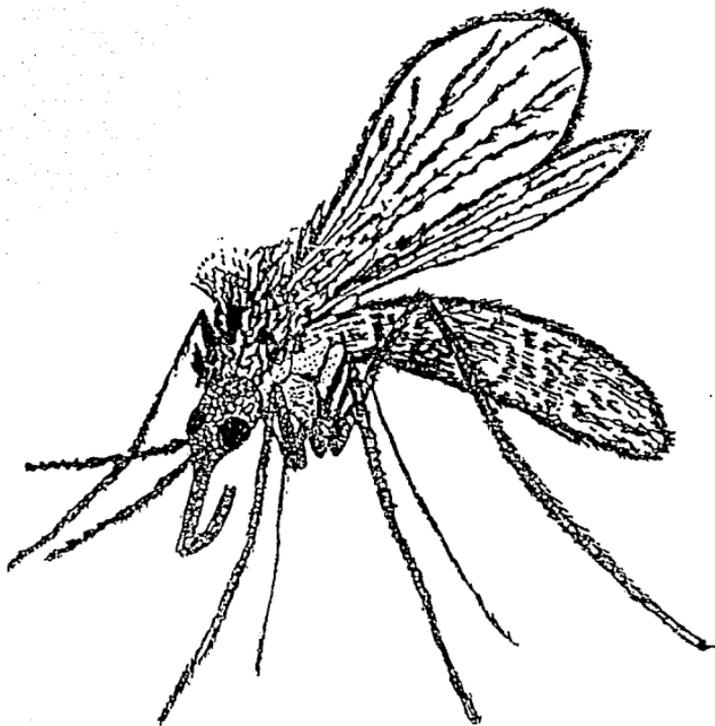
La transmisión la realizan mediante vuelos cortos de aproximadamente 6 a 10 metros y tienen un perímetro de ataque de 300 metros a partir de sus criaderos (123).

Los insectos tienen hábitos selváticos, rurales o suburbanos y diferentes grados de afinidad por diferentes hospedadores, lo cual origina características epidemiológicas definidas de la enfermedad. Solo la hembra es antropofílica y hematófaga (106). Después de haber succionado sangre, depositan de 40 a 70 huevos en suelos húmedos ricos en detritos orgánicos, de los que se alimentan las larvas al eclosionar.

Los huevos largos y ovoides después de 6 - 17 días eclosionan, son necesarios 4 estadios larvarios y uno pupal para que el adulto se desarrolle (60,121). Estos ciclos están fuertemente

FIGURA NO. 6

LUTZOMYIA SP



Leishmaniasis en México, manual INDRE 1993

relacionados con la temperatura ambiental, ya que se ha observado que en climas fríos o templados las larvas pueden experimentar un espaciamento entre los estadios (121), en las regiones trópicas esto puede ocurrir durante la época de sequía. Según Biagi, la mayor actividad del díptero en las zonas endémicas de México, la alcanza de las 16:30 a las 22.00 horas.

En México, el único transmisor comprobado es *Lutzomyia olmeca*, aunque se supone que *L. longipalpis*, *L. diabolica*, y *L. cruziata* transmiten respectivamente: Kala-azar en la Cuenca del Río Balsas, Leishmaniasis cutánea localizada y difusa en el norte así como Úlcera de los Chicleros en Oaxaca. (125)

Los Elutzonidos que aparentemente transmiten la *Leishmaniasis* en México aparecen en el cuadro no.3.

CUADRO NO. 3

VECTORES CONOCIDOS DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN MÉXICO

ESPECIE	TIPO DE LEISHMANIASIS	REGION
<i>Lutzomyia olmeca</i>	Cutánea	Península de Yucatán
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Kala-azar	Cuenca de Balsas
<i>Lutzomyia cruziata</i>	Cutánea	Oaxaca
<i>Lutzomyia diabolica</i>	Cutánea	Noreste de México

Leishmaniasis en México, manual INDRE 1993

3.2.0.- MECANISMO DE TRANSMISION.

La *Leishmaniasis* es considerada como una zoonosis que afecta a los seres humanos cuando estos penetran en el foco enzootico o cuando se altera la ecología del área y tanto vectores como reservorios entran en contacto más estrecho con las personas.

La transmisión se realiza mediante la picadura de un pequeño díptero de la Familia *Psychodidae* y Subfamilia *Phlebotominae* que al alimentarse de la sangre del hospedero vertebrado infectado ingiere la forma de *Amastigote*, en su intestino después de 20 a 30 días se convierte en un *Promastigote*. Estos se multiplican en el tubo digestivo del insecto, en el cual ocupan zonas definidas. Por ejemplo, las cepas de *Leishmania braziliensis* se desarrollan en los tres segmentos del tubo digestivo (anterior, medio y posterior). La cepas de *Leishmania mexicana* se desarrollan solo en los dos primeros (106).

Estas formas migran a través del intestino, probablemente por gradientes químicos, hacia la faringe hasta llegar a la cavidad bucal, donde son expulsados mediante el esfuerzo del insecto para alimentarse de sangre (4).

Cuando los *Promastigotes* entran en el hombre, penetran y se multiplican dentro de Células Mononucleares y Polimorfonucleares, perdiendo su flagelo y convirtiéndose en *amastigotes*.

Según la especie de que se trate pueden invadir órganos profundos, piel y mucosas. Al lisarse las células parasitadas, los *Amastigotes* pueden penetrar en otras células o ser succionadas por el díptero, iniciándose un nuevo ciclo.

3.3.0.- PERIODO DE INCUBACION.

En la Leishmaniasis cutánea localizada, el período de incubación, después de una picadura infectante, oscila generalmente entre 20 y 90 días, aparentemente de acuerdo con la susceptibilidad del hospedero (121).

Aunque puede ser variable, comúnmente el período es de tres semanas. En término medio es de 10 a 12 semanas (106).

La Leishmaniasis mucocutánea y la Leishmaniasis cutánea-diseminada (LCD), puede ocurrir por extensión directa de una lesión cutánea inicial o ser concomitante con una úlcera cutánea a distancia; considerando relacionado su tiempo de incubación con la úlcera primaria. Se han reportado casos en que la Leishmaniasis mucocutánea se manifiesta hasta 30 años después de la aparición de la lesión cutánea (106).

En la Leishmaniasis cutánea diseminada se ha establecido un periodo de incubación de 3 a 12 meses (69). En la Leishmaniasis visceral, el periodo de incubación puede ser de 10 días a un año; por término medio es de tres meses (121). Sin embargo, existen datos en los que se considera que su período de incubación podría oscilar de 2 meses a 2 años (69).

3.4.0.- MECANISMO DE PATOGENICIDAD.

3.4.1.- ENTRADA AL HUESPED VERTEBRADO.

Inmunidad innata e interacciones con células polimorfonucleares.

La penetración del parásito dentro del huésped se realiza mediante un piquete del díptero, a través del cual libera la forma flagelar o promastigote. Aunque se ha aceptado que los promastigotes son infectivos para vertebrados susceptibles, algunos autores sugieren, que durante ciertos estados de su ciclo de vida el parásito no es necesariamente infectivo. Consideran que en la fase de crecimiento logarítmico presentan una baja infectividad y que en la fase estacionaria su infectividad es un poco mayor. Esto no deja de estar relacionado con cambios en su mosaico antigénico (4).

La dosis inóculo juega un papel muy importante en las Leishmaniasis. Los estudios de Pérez y Col. realizados en ratones sugieren que una dosis inóculo grande puede ser causa de Leishmaniasis diseminada (121).

Una vez que los promastigotes son inoculados entran en contacto con los mecanismos defensivos inespecíficos del huésped. Se ha demostrado que, sueros de pacientes de áreas endémicas y no endémicas son capaces de matar promastigotes de diferentes especies de Leishmanias (93). Esto puede ser explicado por el hecho de que en los sueros puede haber anticuerpos de reacción cruzada, inducidos por antígenos comunes presentes en algún miembro de la

familia Trypanosomatidae o en otros protozoarios; lo cual se refleja en la especificidad relativa de ciertas pruebas serológicas usadas para el diagnóstico (25,93).

Es posible que el origen de estos anticuerpos estén relacionados con otros géneros como Mycobacterium, o con glóbulos rojos humanos (54). Greenblatt y Col. encontraron semejanzas inmunoquímicas entre los antígenos de los grupos sanguíneos del sistema ABO y los del parásito (93).

Se ha demostrado que Leishmania mexicana es capaz de activar complemento por la vía alterna *in vitro* (93).

Promastigotes de Leishmania l. mexicana, L. enrietti y L. major son rápidamente lisados por complemento; Pero, 40% de los amastigotes de L. leishmania mexicana y sobre el 30% de amastigotes L. braziliensis así como el 10% de promastigotes de L. donovani son resistentes al complemento humano (4).

La activación del complemento por vía alterna, aunque puede conducir a la lisis por complemento, dá lugar a la fijación de C3b y/o C5b sobre el parásito (4). Esto hace que se produzcan fracciones quimiotácticas, tales como : C3a, C5a o el complejo C567 que atrae mononucleares o polimorfonucleares. Los fragmentos liberados de C3 y C5 pueden actuar como anafilotoxinas, produciendo una reacción inflamatoria localizada.

Entre los factores celulares inespecíficos, se ha encontrado, *in vitro*, que PMN de donadores humanos ingieren y matan promastigotes de L. donovani, aún en ausencia de complemento. En experimentos *in vitro*, los amastigotes son también susceptibles a la ingestión y destrucción mediante mecanismos oxidativos por los polimorfonucleares (especialmente eosinófilos), (93).

Recientemente, Remaley y Col. reportan que la fosfatasa-ácida del parásito es capaz de suprimir la producción de radicales libres del oxígeno en neutrófilos humanos. Ellos calculan que

cada promastigote posee suficiente fosfatasa como para reducir la producción de aniones superóxido de tres neutrófilos en un 50%

Dependiendo de la especie del hospedero y de la Leishmania los mecanismos de defensa inespecíficos del hospedero pueden ser suficientes para matar una cantidad importante de parásitos y evitar que la enfermedad progrese (93).

3.4.2.- INTERACCION CON EL MACROFAGO.

3.4.2.1.- MECANISMOS DE UNION.

Si los promastigotes son capaces de evadir los factores humorales inespecíficos y a los PMN, entran en contacto con los macrófagos que fueron atraídos por factores quimiotácticos liberados por la activación de la vía alterna del complemento. Algunos de ellos pueden haber estado presentes en el sitio de la inoculación. Se ha especulado que el parásito podría atraer los mediante una substancia quimiotáctica para macrófagos (93).

El contacto o unión al macrófago puede realizarse mediante varios mecanismos:

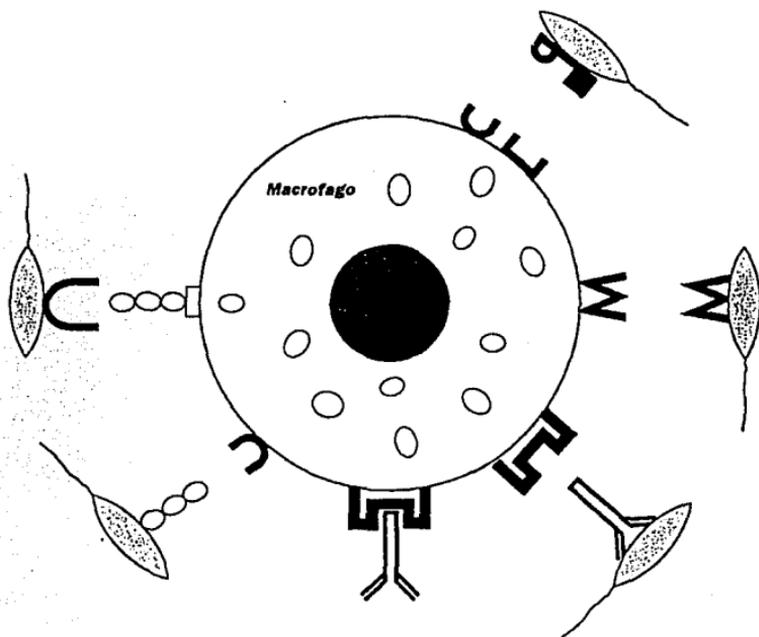
A).- Unión del parásito a través de un receptor presente en el macrófago, parecido a una lectina. El contrareceptor es un ligando del parásito que puede ser una glucoproteína o un glicolípido.

B).- Mediante la unión de una opsonina al parásito. Puede ser IgG1 o IgG3 que se unen por su porción Fab al promastigote. El macrófago al tener un receptor para la porción Fc de estas inmunoglobulinas, permite el contacto. Es de poca relevancia.

C).- El parásito una vez opsonizado por fragmentos del complemento, se puede unir a macrófagos, mediante su receptor CR3

D).- Alternativamente, en la respuesta inmune del huésped, existen anticuerpos citofílicos que pueden unirse a la célula hospedero mediante sus receptores Fc, y de esta manera permiten la exposición de su región Fab para que el parásito se una.

MODELO DE RECEPTORES DE MACROFAGO PARA LEISHMANIA



CR₃

Receptor de Fucosa - Manosa

Receptor de Fibronectina

Receptor de FC

Receptor de Tipolectina

Las glicoproteínas o glicolípidos que actúan como contra receptores en la superficie del parásito, poseen azúcares característicos terminales o residuos de ácido siálico (4).

Inicialmente se encontró que los promastigotes de *L. donovani*, tenían manosa, glucosa, N-acetil-glucosamina terminal o residuos de ácido siálico (4,93). Recientes estudios demuestran la existencia de un ligando manosa/fructuosa terminal en promastigotes, pero no presentes en amastigotes. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en los que se demuestra la existencia de glicoconjugados ricos en manosa sobre la superficie de promastigotes de *L. donovani*. Zehavi y Col. han presentado evidencias de que el ligando de *L. tropica* tiene una galactosa terminal (4).

L. mexicana puede unirse al macrófago mediante un ligando de glicoproteína (Gp), con N-acetilglucosamina terminal (4,93).

Handman y Goding reportan que el factor excretor (FC), de promastigotes de *L. major* es capaz de unirse especialmente a macrófagos. Este factor tiene una región hidrofóbica que se encuentra insertada dentro del parásito y una región rica en carbohidratos orientada sobre la superficie y que actúa como contrareceptor del parásito (4).

Otros estudios sobre la interacción macrófago promastigote, han podido demostrar la naturaleza del contrareceptor de *L. mexicana*. Es una glicoproteína de 63 Kd (Gp 63), que no muestra actividad cruzada con FE (4).

3.4.2.2.- MECANISMO DE PENETRACION.

La entrada del amastigote en el macrófago parece ser dominante por el llamado proceso "Zipper" de fagocitosis, aunque un papel activo del promastigote y amastigote no debe ser excluido (4). Los contrareceptores del promastigote son presumiblemente usados por el parásito para el reconocimiento del macrófago y su invasión en un proceso llamado "fagocitosis facilitada" (51).

La interacción de promastigotes y amastigotes es inhibida por la penetración de yodoacetamida en los macrófagos, este es inhibidor de la glucólisis, lo que sugiere una participación activa del macrófago (28,93).

Durante este proceso existe una perturbación de la membrana del macrófago, lo que conduce a una activación de la NADPH-oxidasa disparando la cadena respiratoria, la cual activa la cadena del ciclo de las pentosas y por consiguiente la producción de radicales tóxicos provenientes del oxígeno (4,28,51,93).

Los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*, disparan la cadena respiratoria más marcadamente que los amastigotes (4).

Los promastigotes son más susceptibles a morir por el peróxido de hidrógeno que los amastigotes (4,93).

Channon y Col. Han demostrado que esta diferencia se debe a que los amastigotes poseen un mecanismo azida-sensible que compete por los aniones superóxido o que causa una inactivación localizada de la cadena respiratoria (4). Murray encontró que los amastigotes contienen más catalasa y glutatión peróxidasa que los promastigotes y son cuatro veces más resistentes al peróxido de -

hidrógeno; además que no estimulan continuamente la actividad oxidativa del macrófago (93).

La unión y la fagocitosis pueden ocurrir sin que se dispare la cadena respiratoria. Esto ha sido demostrado en macrófagos humanos que tienen receptores para C3b (4). Es importante mencionar que de la rapidéz del paso de la forma promastigote a la forma amastigote, depende la posibilidad de sobrevivencia del parásito, ya que ha sido observado que no se inhibe la fusión fagosome-lisosoma.

3.4.2.3.- MECANISMOS INTRACELULARES.

Estudios in vivo e in vitro han demostrado que las Leishmanias residen dentro del fagolisosoma potencialmente hóstil. Numerosas teorías han sido propuestas para demostrar que el parásito sobrevive dentro de las vacuolas parasitóforas.

Tratando macrófagos con inhibidores de la fusión fagosome-lisosoma, solamente se incrementa moderadamente la supervivencia del amastigote de L. leishmania mexicana, pero se incrementa dramáticamente la supervivencia del promastigote (4).

Scott y Col. en estudios con macrófagos de ratón y cepas de L. tropica y L. l. amazonensis, observarán que los parásitos eran más susceptibles a la digestión por macrófagos a 37 grados que a 35 grados y postularon que esta susceptibilidad podría contra la visceralización.

La capacidad de los promastigotes para sobrevivir y multiplicarse en los fagolisosomas del macrófago, puede deberse tal-

ves a que sean resistentes a las enzimas o a que se protejan de alguna manera (93).

La sobrevivencia del parásito ha sido relacionada con la inactivación de enzimas hidrolíticas lisosomales, con la liberación de metabolitos y de factores excretores, así como la naturaleza de la superficie membranal. Esto último ha sido asociado especulativamente con glicoproteínas de 68 y 43 Kd presentes en la superficie del promastigote (4).

Para que la *Leishmania* sea infectante necesita tener la capacidad para inhibir enzimas lisosomales de la células fagocíticas, propiedad que caracteriza a las cepas virulentas. Esto puede ocurrir por liberación de proteasas (Factores de excreción), que tienen una carga negativa importante (121).

Handman y Greenblat, encontraron que los promastigotes y los amastigotes liberan in vivo un polisacárido complejo, llamado Factor Excretor que puede intensificar el crecimiento de amastigotes en macrófagos peritoneales de roedores resistentes; Es posible que este sea un factor de protección intracelular (93)

En un trabajo realizado por Scorza y Col. Fué posible obtener una descripción ultraestructural (por microscopía electrónica) de las relaciones entre amastigotes de *L. garnhami* e histiocitos de lesiones subcutáneas de hámsters infectados experimentalmente. En secciones ultrafinas se pudieron reconocer amastigotes desde cuya bolsa fragelar se segrega hacia el interior de la vacuola parasitófora un fluido electrodensó. Este fluido aísla rápidamente al parásito de su contacto inmediato con la membrana de la vacuola. Esta secreción aunque distiende la membrana, no impide que el amastigote pierda contacto con ella,

en su parte posterior. La densidad de la secreción es mayor al comienzo de ésta.

En las vacuolas de mayor tamaño se observa una menor densidad. Es posible que en ellas ocurra la multiplicación de los amastigotes. Existen parásitos que muestran signos de autó-lisis dentro de vacuolas parasitoforas pequeñas o con escasa secreción. Estas vacuolas a menudo se ven rodeadas o en contacto con organelos similares a los lisosomas. En estos casos, se sugiere que el parásito sucumbe a la acción de enzimas lisosomales sin tener tiempo de aislarse mediante su secreción fragelar.

Las vacuolas parasitoforas que contienen dos o más amastigotes producto de sus divisiones celulares, pierden sus contornos y las membranas que las delimitan. Es especulable que tal fenómeno forma parte del proceso progresivo de colonización.

En estudios hechos *in vitro* sobre la fusión de lisosomas secundarios de macrófagos peritoneales de ratón con vacuolas parasitoforas que contienen amastigotes de *L. mexicana*; se han podido observar dentro de una misma vacuola, tanto parásitos intactos como dañados.

Otros autores expresan la posibilidad de que productos segregados desde la bolsa fragelar de *Leishmania* puedan inhibir la acción de enzimas lisosomales de la célula hospedero y discutir la posibilidad de que la distensión de la vacuola pueda interferir en la acción de las enzimas lisosomales.

Chang y Dwyer, utilizando amastigotes de *L. donovani* y macrófagos peritoneales de hámster, han descrito: Amastigotes rodeados por apretadas membranas, vacuolas parcialmente llenas por material amorfo electrodensó y amastigotes localizados en grandes

vacuolas. Estos tres tipos han sido observados dentro de una misma célula.

Después de la multiplicación del amastigote, la vacuola parasitófora se rompe y los parásitos adquieren una localización citoplasmática temporal, que puede ser menor de una hora. Enseguida se forma una membrana que limita la vacuola parasitófora, desde el momento de la formación de la vacuola, hasta la segregación de su Factor excretor, el parásito está expuesto a las enzimas lisosomales del hospedero. Es por esto que se observan parásitos con signos de autólisis dentro de vacuolas con escasa secreción.

La naturaleza de la secreción podría ser de tipo de la fosfatasa ácida, o cualquier otro tipo de enzima secretada a través de la bolsa fragelar que pudiera inhibir, desnaturalizar o digerir enzimas lisosomales de la célula hospedero. La secreción distiende a la vacuola parasitófora y más las enzimas lisosomales inhibidas, producen una condición hipertónica con afluencia de fluidos. Lewis y Peters suponen que el gradiente osmótico es beneficioso para el parásito.

Es importante considerar la persistente tendencia de los parásitos a unirse a la vacuola parasitófora por su extremo posterior. Pudiera ser que esta adhesión esté relacionada con la unión a receptores de membrana (117).

4.0.- DIAGNOSTICO.

4.1.- DIAGNOSTICO CLINICO DIFERENCIAL.

En las *Leishmaniasis* cutáneas la diversidad de formas clínicas es muy grande: Incluyen formas ulceradas nodulares, verrucosas, lupoides, papulosas, linfagíticas, que obligan al diagnóstico diferencial con esporotricosis, cromomicosis, paracoccidioidomicosis, tuberculosis cutánea verrucosa, carcinomas, sarcoidosis, etc. En general las úlceras cutáneas curan espontáneamente entre los 5 y los 12 meses de iniciadas (106).

La fase cutánea de la blastomicosis presenta formas parecidas, pero en la actualidad es aún más rara que la LCD en México en la LCD existe formación de nódulos muy semejantes a los de la lepra lepromatosa. Y es perfectamente compatible, ya que incluso en nuestros días, y aún para el médico especializado, es el primer diagnóstico que se plantea y no puede diferenciarlo con seguridad más que con exámenes de laboratorio (10).

La biopsia es útil, sobre todo para diferenciar al padecimiento con las neoplasias. En el caso de *Leishmaniasis* mucocutánea, otras enfermedades pueden originar cuadros de infiltración o ulceración y destrucción nasofaríngea, como la lepra lepromatosa, el escleroma, el pian, la paracoccidioidomicosis y diversas lesiones tumorales y vasculíticas. Siempre se deben realizar procedimientos pertinentes para un diagnóstico diferencial adecuado; que además de la clínica y la epidemiología, deben incluir biopsias, cultivos, intradermoreacciones y titulaciones

de anticuerpos (106). Es conveniente señalar que el pian nunca se ha encontrado en México (84).

4.2.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

4.2.1.- EXAMENES PARASITOSCOPICOS.

En Leishmaniasis cutáneas, la presencia del parásito puede demostrarse mediante un frotis realizado por raspado o punción de lesiones durante los primeros meses de evolución, teñidos por Giemsa o por Wright para su observación microscópica en casos antiguos es menos frecuente demostrar la presencia del parásito (69,121). La muestra puede tomarse aspirando a través de una aguja, en el margen de la lesión indurada (31).

Se puede también puncionar para obtener líquido exudado la muestra se extiende en la laminilla y se colorea con Giemsa, otro procedimiento para la toma de muestra, útil y fácil de realizar consiste en: Con pinzas atraumáticas o con los dedos, presionar la úlcera hasta producir isquemia. En un borde activo de la misma, se hace una pequeña incisión de 3 a 4 mm con un bisturí se hace un raspado suave, con lo cual se obtiene un buen número de células del tejido inflamado que se extiende en varias laminillas, las cuales se pueden colorear por Giemsa o por Wright (69,107).

En cuanto a la Leishmaniasis cutánea difusa, la parasitoscopia se realiza por raspado o punción y aspiración de una pápula o nódulo, realizando un extendido sobre una laminilla y coloreando la muestra con Giemsa y Wright (69).

Las muestras se observan al microscopio de luz y con objetivo de 100 X (107). La tinción de Giemsa revela amastigotes de 2 a 3 micras de color azul claro con un cinetoplasto rojo, localizados intracelularmente (31). En la Leishmaniasis visceral el examen parasitoscópico se efectúa tomando muestra por punción dérmica y aspiración del bazo (positividad del 98%), de médula ósea (positividad del 54-86%) o de ganglios linfáticos crecidos (positividad del 64%), extendiendo la muestra sobre un porta objetos y coloreandola por las tinciones características (93).

En los aspirados de médula ósea las Leishmanias pueden predominar sobre las fagocitadas (106), aunque la punción esplénica es la que da mayor porcentaje de positividad, es la más arriesgada y es aconsejable su realización en medio hospitalario.

En general, después de 5 semanas de enfermedad, las positivities de demostrar al parásito en las biopsias disminuye pero las excepciones son numerosas. Las cepas de Leishmania l. - Braziliensis son las más difíciles de demostrar. La Leishmaniasis visceral, presenta un gran número de parásitos dentro de los macrófagos de todo el SRE, con ocasionales granulomas en el hígado bazo, y ganglios linfáticos (106).

4.3.0.- TRATAMIENTO.

Los antimoniales pentavalentes son las drogas de elección (31,104,107). El Glucantime (Antimoniato de Meglumina o N-metil glucantime) y el Estibogluconato de Sodio (Pentostam) son los de más amplia difusión y utilidad comprobada.

La solución de antimoniato de meglumina contiene 85 miligramos por mililitro de antimonio pentavalente para inyección muscular o intravenosa. La solución de estibocluconato de sodio contiene alrededor del 10% de antimonio pentavalente (100 mg/ml) y se emplea también por vía parenteral, hasta la fecha ninguno de los medicamentos mencionados se produce en México (69).

4.3.1.- LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA.

Se debe aplicar una dosis diaria de 60 mg/kg de peso corporal de antimoniato de meglumina, equivalente a 20 mg antimonio, por vía intramuscular profunda, por un periodo de 10 a 15 días, de preferencia dividiendo la dosis diaria en dos aplicaciones (cada 12 horas), sin rebasar la dosis diaria de antimonio de 850 mg, equivalente a tres gramos de antimoniato de meglumina (69). Se ha demostrado que este tratamiento produce una curación completa en el 88% de los casos, alcanzándose el 100% con un segundo tratamiento (103).

Para el estibogluconato de sodio, la dosis diaria es también de 20 mg de antimonio por kg de peso corporal por vía parenteral, sin rebasar los 250 mg por día y deberá aplicarse por un periodo de 10 a 15 días (69).

4.3.2.- LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA, VISCERAL Y LEISHMANIASIS CUTANEA DIFUSA.

Se debera aplicar la dosis diaria de 60 mg/kg de peso corporal, durante 20 días (69). Se ha recomendado el uso de Isotionato de Pentamidina, a razón de 2-4 mg/kg de peso corporal diariamente por vía IM durante un máximo de 15 días (121).

La Anfotericina B ha resultado eficaz en el tratamiento de lesiones mucosas graves y crónicas, rebeldes a los tratamientos usuales (69,106,121). Otras drogas como Rifampicina, Alopurinol, Nifurtimox y Metronidazol tienen eficiencia variable y discutida.

La termoterapia puede ser de gran valor como coadyuvante en las lesiones cutáneas rebeldes y en las lesiones del pabellón auricular. Esta deberá ser de 41 grados centígrados y aplicada en varias sesiones diarias (103,123). Se recomienda que sea en forma de vapor de agua, dos veces al día y por un periodo de 15 a 20 días, lo deseable es que el vapor aplicado a la lesión tenga una temperatura no mayor de 60 grados centígrados.

La crioterapia con CO2 también ha dado buenos resultados más sin embargo no se excluye la aparición tardía de lesiones mucosas (106). El uso de Factor de Transferencia todavía se encuentra en etapa experimental (121).

5.0.- PARTE EXPERIMENTAL

5.1.0.- JUSTIFICACION.

Las Leishmaniasis son un grupo de entidades clínicas causadas por diferentes especies y subespecies de parásitos pertenecientes al género Leishmania.

En la actualidad se considera un problema de salud pública y la Organización Mundial de la Salud la incluye dentro de las 6 enfermedades tropicales de mayor importancia. Son zoonosis de distribución cosmopolita, con excepción de Australia y que afectan a 12,000,000 de individuos, pertenecientes a 80 países de los cuales enferman cada año alrededor de 400,000 y ponen en riesgo a más de 350,000,000 incrementándose año con año el número de afectados.

En Latinoamérica se ha considerado que posiblemente ocupen el segundo lugar, en importancia, dentro de las enfermedades causadas por protozoarios. Sin embargo en América la verdadera magnitud del problema no se conoce, debido a que se carece de un sistema adecuado para calcular su frecuencia real. En países que cuentan con un programa de control como Guatemala y Costa Rica se estima una incidencia anual de 2,000 casos.

A pesar de la frecuencia con que se registran en México, la Leishmaniasis siempre ha sido considerada como una enfermedad rara y de escasa importancia en salud pública. Sin embargo trabajos recientemente realizados en el departamento de Parasitología del INDRE de la Secretaría de Salud, se observa un marcado incremento en su distribución geográfica y en la prevalencia de Leishmaniasis cutánea localizada (LCD). Así mis

mo, se ha incrementado los casos de Leishmaniasis mucocutánea y visceral.

El impacto económico que tiene este padecimiento se refleja en las dificultades para la realización de actividades agropecuarias o en la introducción de complejos industriales en zonas consideradas endémicas, constituyendo una limitación importante en el desarrollo de la comunidad e inclusive puede alejar a los visitantes de las áreas turísticas enclavadas en zonas endémicas de las regiones tropicales. Finalmente depauperan al campesino al que con frecuencia incapacitan y le hacen perder sus cosechas que aunque muchas veces son de autoconsumo y su merma no afecta la producción nacional, a él lo sumen en la miseria.

Este trabajo tiene como finalidad la construcción de una sonda especie-específica que facilite y agilice el diagnóstico de leishmania mexicana, se cuenta para este estudio con el vector que es PBR322 en el cual mediante la enzima DRA I que realiza cortes muy específicos sobre el vector, facilitará la inserción de fragmentos de KDNA de Leishmania mexicana que serán ligados al vector por el método de Tailing, las clonas construidas serán multiplicadas en la cepa bacteriana de E. Coli HB101 para que se determine la secuencia de la nueva clona y compararla con las cepas de Leishmania conocidas.

5.1.- OBJETIVOS

5.1.2- PARTICULARES

A).- OBTENCION Y CRECIMIENTO DE PARASITOS DE DIFERENTES PACIENTES CON LEISHMANIA L. MEXICANA EN MEDIOS DE CULTIVO APROPIADOS.

B).- EXTRACCION Y DIGESTION DE MINICIRCULOS DE KDNA DE LEISHMANIA L. MEXICANA PARA LA DETERMINACION DE IDENTIDAD Y CONCENTRACION.

C).- REPLICACION DEL PLASMIDO PBR322 MEDIANTE LA TRANSFORMACION DE E. COLI CEPA HB101 PARA LA EXTRACCION, PURIFICACION Y DIGESTION CON LA ENZIMA DRA I.

D).- CLONACION DEL VECTOR PBR322 CON INSERTOS DE MINICIRCULOS DE KDNA DE LEISHMANIA L. MEXICANA POR EL METODO DE TAILING.

5.1.3.- GENERALES.

A).- CONSTRUCCION DE UNA SONDA ESPECIE - ESPECIFICA UTILIZANDO INSERTOS DE MINICIRCULOS DE KDNA DE LEISHMANIA L. MEXICANA EN EL VECTOR PBR322.

B).- UTILIZACION DE LA SONDA ESPECIE-ESPECIFICA PARA UNA POSIBLE DIFERENCIACION ENTRE LA LEISHMANIA L. MEXICANA Y OTRAS ESPECIES.

6.0.- METODO Y TECNICAS PARA LA ADAPTACION Y CRECIMIENTO DE LOS PARASITOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA.

6.1.- DESCRIPCION DEL METODO.

Con la finalidad de mejorar la adaptación y cantidad de los parásitos de Leishmania L. mexicana fue conveniente la comparación del comportamiento de los parásitos en el medio RPMI y el medio RPMI enriquecido como medio de mantenimiento, esto motivado por la cantidad de parásitos cosechados después de que son pasados del medio de SENEKJIE al medio de RPMI.

Existen dos puntos a destacar en dicha comparación :

A).- El medio de RPMI enriquecido facilita la adaptación y mejora la cantidad de los parásitos de Leishmania L. mexicana manifestado esto en la cantidad de parásitos cosechados.

B).- Facilita el trabajo ya que los cambios sufridos por el medio RPMI enriquecido en cuanto a su coloración que es una manifestación directa del uso de las fuentes de energía por parte del parásito, son más notorios originados en cierto modo por la adaptación y crecimiento del parásito, al segundo día de realizado el inóculo el medio de cultivo vira de un color durazno a un color rojizo y una vez que el crecimiento es abundante el medio vira a un color café.

Una vez teniendo los parásitos de preferencia en la fase logarítmica, el kDNA de los minicírculos es extraído por la técnica de purificación de minicírculos y se procede a la digestión con la enzima DRA I, la cuantificación y la calidad de la diges -

CUADRO NO. 4

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LEISHMANIA



ti6n fu6 realizada por una el6ctroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % .

Para la realizaci6n del trabajo se eligieron 2 cepas de par6sitos de las 8 que fueron probadas, esta fuer6n deminadas como MC (MARICRUZ), que produce Leishmaniasis cut6nea localizada y con la cepa GS (GUSTAVO SOLIS), que produce Leishmaniasis cut6nea diseminada ambas fueron cepas obtenidas de pacientes con manifestaciones cl6nicas en el Instituto de Diagn6stico y Referencia Epidemiol6gica (INDRE).

6.1.1.- REACTIVOS Y MATERIALES.

- 1).- Bacto Beef
- 2).- Bacto Peptona
- 3).- Bacto Agar
- 4).- Sangre Completa
- 5).- Buffer 10X Eco R1
- 6).- Bicarbonato de Sodio 1 M
- 7).- Cloruro de Sodio 1 M
- 8).- Cloruro de Calcio 1 M
- 9).- Cloruro de Potasio 1 M
- 10).- EDTA 20 mM
- 11).- Enzima Dra 1
- 12).- Glucosa
- 13).- HCL 1 N (Ac. Clorh6drico)
- 14).- NaCl 1 N (Cloruro de sodio)
- 15).- Proteinasas K
- 16).- SSC 1X (Soluci6n Salina de Carbonatos)

- 17).- SDS 1*
- 18).- Spermidina
- 19).- Tris-HCL 0.5 M, pH 8.0
- 20).- TE 1X
- 21).- Microcentrifuga
- 22).- Matraz Erlenmeyer de 0.5 y 1.0 lts
- 23).- Membranas Millipor de 0.22, 0.45 Micras y Equipo de Filtración Millipor
- 24).- Probeta de Vidrio de 50, 100 y 500 ml
- 25).- Pipetas graduadas de 1, 10, 25 ml
- 26).- Retapas de Aluminio y Engargoladora
- 27).- Tapones Butiricos
- 28).- Balanza De Presición Sartorius y Balanza Granataria
- 29).- Botellas de Plastico Desechables de 50 y 100 ml
- 30).- Botellas de Vidrio Esteriles de 100 ml
- 31).- Jeringas de 1, 5, y 10 ml
- 32).- Congelador Revco

6.1.2.- PREPARACIONES.

- A).- Preparar la solución de LOCKE de acuerdo al anexo número 12.
- B).- Preparar el medio de SENEKJIE de acuerdo al anexo número 12.
- C).- Preparar el medio RPMI-1640 y RPMI enriquecido de acuerdo al anexo número 12.

6.1.3.- SIEMBRA.

A).- Se realiza primero una impronta del area afectada en el paciente, esta impronta puede ser con el liquido extraído de la lesión con una jeringa o en forma directa de biopsias de piel de la herida, la muestra es teñida con Giemsa y observadas al microscopio en donde se buscan células histocititarias grandes con leishmanias incluidas.

B).- Para facilitar su multiplicación de los parásitos se inocularón ratones cepa L.M. 15 , en el colchoncillo de las patas delanteras.

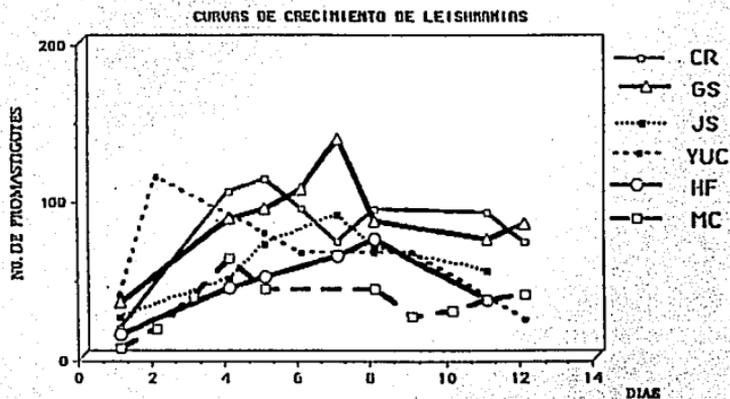
C).- El periodo de incubación del parásito en el ratón es de 4 - 6 meses hasta el momento de presentarse las lesiones en los ratones infectados.

D).- Confirmada la existencia de los parásitos en las lesiones mediante el análisis microscópico, los ratones son sacrificados y se les cortan las patas las cuales son tratadas de acuerdo a la técnica de extracción de Lishmanias (anexo no.4).

E).- Se inocular el medio de cultivo de SENEKJIE y después el medio RPMI Enriquecido y esperar por un periodo de tiempo el cual es variable dependiendo de la especie de que se trate como se observa en la figura 9, en este momento el crecimiento es notorio en el medio de cultivo.

F).- Una vez que el parásito se encuentre en una cantidad suficiente caracterizado por la coloración del medio de crecimiento (café), sin ser necesario un conteo exacto del parásito, se procede a la extracción del kDNA y a tratarlo de la ma-

FIGURA NO. 9



Las cepas seleccionadas fueron MC (Maricruz) y GS (Gustavo Solis)

Asunción Sosa, Determinación del tiempo de crecimiento y propagación de cepas de *Leishmania l. mexicana*. Reporte final de servicio social, INDRE 1992.

nera conveniente para la obtención de los minicírculos, en este momento también se realiza un pase a un medio de cultivo nuevo de RPMI Enriquecido para mantener los parásitos en crecimiento o bien como reserva para necesidades posteriores.

G).- Los pases de los parásitos a un medio de mantenimiento nuevo (RPMI Enriquecido), deberán hacerse en un periodo máximo de 6 días o bien si es antes al momento de que se formen rosetas que son acumulos de parásitos originadas por la misma cantidad de parásitos o por el agotamiento paulatino de los nutrientes.

6.1.4.- OBTENCION DEL kDNA DE LOS PARASITOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA.

Una vez que los parásitos han sido crecidos hasta saturación en los medios adecuados para parásitos, estos colectados en tubos para centrifuga de 50 ml son centrifugados para la extracción del kDNA de acuerdo a la técnica de purificación de minicírculos (ver anexo no. 4).

Al inicio del proyecto se extrajo el kDNA de todas las muestras parásitarias con que se contaba pero para nosotros solo elegimos un caso de cada manifestación clínica y fueron GS y MC posterior a la extracción de los kDNA's se corrió un gel de agarosa al 1.2 % en el cual estaría incluidos dos Marcadores de peso Moléculare de diferente rango de pesos con el fin de identificar bandas de pesos moleculares desde 300 pb hasta 23.130 kb (kilobases). Esto con el fin de poder identificar cada una de las bandas obtenidas en la digestión con la Enzima Dra I según la técnica

de purificación de minicírculos, contando con la cantidad adecuada de los minicírculos elegidos ya purificados en base a la técnica de precipitación de DNA (ver anexo no. 6).

Se ha considerado que la cantidad adecuada de kDNA de Leishmania en la realización del proyecto deberá de ser como mínimo 1 mcg (microgramo), en caso de no contar con dicha cantidad sera conveniente realizar las extracciones necesarias de kDNA, esto con el fin de que una vez de que se arranque con el tren de trabajo del protocolo de ligación y cuantificación de la clona no tenga que ser suspendida por falta de minicírculos o por falta del vector PBR322 digerido.

CUADRO NO. 5

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PLASMIDO PBR322



**7.0.- METODO Y TECNICAS PARA LA ADAPTACION Y CRECIMIENTO
DE LA CEPA BACTERIANA E. COLI HB 101 Y REPLICACION
DEL PLASMIDO PBR322.**

7.1.- DESCRIPCION DEL METODO.

Se probarón dos cepas de E. Coli, una de ellas proveniente del cepario del INDRE (HB101) y la otra proveniente del departamento de Bioquímica de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN (HB101*), con el único fin de constatar por características morfológicas y su crecimiento en Medio Agar Luria (LB), y se trataba de la cepa bacteriana requerida para llevar a cabo la replicación del plásmido PBR322.

Ambas cepas bacterianas (HB101 y HB101*), fueron crecidas inicialmente en medio luria líquido sin antibiotico y posteriormente se realizó un pase a medio luria agar en placa sin antibiotico y se incubaron a 37 grados centígrados por 24 horas en una estufa a temperatura controlada.

Se hizo necesario comparar el comportamiento de las dos cepas de E. Coli (HB101 y HB101*) en medio luria líquido y agar en placa sin antibiotico debido a que al inicio del proyecto solo se contaba con la cepa HB101 y los resultados obtenidos a partir de esta cepa nos hacían dudar de la veracidad de los mismos resultados.

Fuerón conservadas solamente las cepas de E. Coli (HB101 y HB101*), crecidas en medio luria agar sin antibiotico, de ambas cepas se guardó también una muestra en glicerol a una temperatura

tura de -35 grados (ver anexo 16), con el fin de contar con cultivos lo más reciente que fuera posible.

Para la replicación del plásmido PBR322 las bacterias de E.Coli se hicieron Competentes por 2 técnicas distintas (Anexos 1 y 2), por las cuales se obtuvieron resultados muy similares en cuanto a la cantidad de células transformadas conocida también como eficiencia de transformación, siendo por lo tanto confiable el uso de cualquiera de estas técnicas, nos inclinamos por el uso de la técnica 6 debido a que los reactivos daban buenos resultados si su preparación era no mayor a un mes, en cambio para la técnica 7 los reactivos tenían que ser preparados máximo un día antes de la preparación de las células competentes. Es recomendable que el uso de las células competentes sea en forma casi inmediata ya que las células pierden su capacidad de competencia conforme avanzan las 24 horas indicadas en la bibliografía.

7.1.1.- REACTIVOS Y MATERIALES.

- 1).- Caldo Luria
- 2).- Agar Luria en Placa
- 3).- Proteinasa K
- 4).- TE 1X
- 5).- Agua Destilada
- 6).- Cloruro de Calcio (CaCl_2) 1M
- 7).- Plasmido PBR322 ligado con fragmentos de kDNA de Leishmania l. mexicana.
- 8).- Tris-HCl, pH 8.0, 1M
- 9).- Tris-HCl, pH 7.5, 1M

- 10).- Tris-Hcl, pH 6.8, 1M
- 11).- Agitador Magnético
- 12).- Cronómetro
- 13).- Charola de Plástico
- 14).- Espectrofotómetro
- 15).- Hielo
- 16).- Matraz Erlenmeyer
- 17).- Microscopio
- 18).- Micropipetas de 10 mcl, 50mcl, 100 mcl y 1 ml
- 19).- Papel Aluminio
- 20).- Pipetas Volumétricas de 1, 5, 10 y 25 ml
- 21).- Puntas de Plástico Estériles para Micropipeta
- 22).- Tubos de Plástico de 50 ml para Centrifuga
- 23).- Toallas de Papel Absorbente
- 24).- Ultracentrifuga

7.1.2.- PREPARACIONES.

- A).- Preparar el Medio Luria líquido con y sin antibi-
de acuerdo al anexo no.12.
- B).- Preparar el Medio Luria agar con y sin antibiotico
de acuerdo al anexo no.12.
- C).- Preparar los reactivos CaCl₂ y Tris-Hcl a los pH's
requeridos de acuerdo al anexo no.12.

7.1.3.- SIEMBRA.

- A).- Considerando que la cepa de E. COLI HB101 no tiene
resistencia alguna a los Dos Antibioticos Seleccionados que son

Ampicilina y Tetraciclina, seleccionados estos debido a que el Plásmido PBR322 conferirá dicha resistencia, la bacteria fué crecida inicialmente en Medio Luria Líquido sin antibiótico.

B).- Se realizó una tinción Gram con el fin de observar las características morfológicas de E. COLI HB101.

C).- Con el fin de comprobar si la bacteria de E. Coli no había sufrido algún cambio morfológico por los pases consecutivos frecuentes, está fué crecida comparativamente en Medio Luria Líquido (LB) con antibiótico y sin antibiótico.

D).- Para verificar que el crecimiento de la bacteria E. Coli HB101 era viable se realizó un pase a Medio Luria Agar o Placa con antibiótico y sin antibiótico.

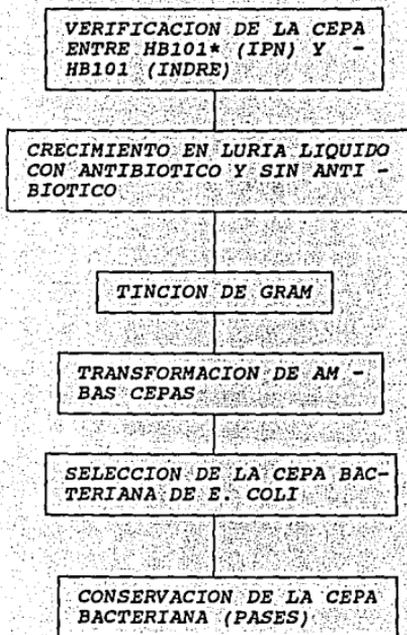
E).- Del crecimiento en placa se tomo una muestra del crecimiento bacteriano y se conservo en glicerol a -30 grados para necesidades futuras.

7.1.4.- SIEMBRA DE E. COLI HB101, EN MEDIO LURIA LIQUIDO (LB) CON ANTIBIOTICO Y SIN ANTIBIOTICO.

La bacteria de E. Coli fué crecida en medio luria líquido sin antibiótico corriendo a la vez el crecimiento de la bacteria en medio luria líquido con antibiótico como prueba blanco, con el fin de comprobar la resistencia de la bacteria, de aquí se hizo un pase también a medio luria agar de la misma manera que en medio líquido, el sembrado se realizó con una aza de cromo en forma de estriado e incubadas a 37 grados en una estufa de temperatura controlada por un tiempo de 24 horas.

CUADRO NO. 6

DIAGRAMA DE FLUJO PARA E. COLI



El crecimiento bacteriano fué verificado en forma visual al termino del tiempo de incubación , las cajas fuerón selladas en la periferia con papel parafina y conservadas en refrigeración a 4 grados hasta su uso.

Cabe hacer mención que los pases bacterianos a placas de agar luria nuevas se realizarón en un periodo máximo de 5 días

7.2.- REPLICACION DEL PLASMIDO PBR322.

Originalmente la primera muestra del Plásmido o Vector PBR322 con la cual se iniciaría la replicación fué obtenida del banco de plásmidos del INDRE, la replicación tiene como objeto el aumento de la cantidad del vector, esta fué relizada en la cepa bacteriana de E.Coli HB101.

La cepa bacteriana fué crecida primero en Medio Luria - Líquido sin antibiotico hasta la fase logarítmica siguiendo su Densidad Optica hasta 500-600 nanometros (nm), enseguida la bacteria se hizó competente por la técnica de células competentes (ver anexo no.1), y transformada también en forma inmediata a la competencia (ver anexo no.2), finalmente la bacteria fué plaqueada en luria agar con antibiotico y sin antibiotico este último como como prueba blanco, la bacteria fué incubada a 37 grados en una estufa de temperatura controlada por un espacio de 24 horas al termino de las cuales se realizó un examen visual.

La comparación del crecimiento bacteriano en ambas placas de agar luria con ampicilina y sin antibiotico es con el fin de comprobar si en realidad hubo transformación, el crecimiento

deberá ser afirmativo en ambas placas esto debido a que la bacteria a incorporado a su DNA el Plásmido PBR322 el cual le ha conferido resistencia a la ampicilina.

Después de verificar el crecimiento bacteriano de *E.Coli* en luria agar con ampicilina (provocado por la incorporación del plásmido PBR322 al DNA bacteriano), se procede a hacer de esa placa un crecimiento de *E.Coli* HB101 en gran escala en luria líquido con ampicilina siguiendo el crecimiento bacteriano en forma óptica hasta una saturación con el fin de tener la mayor cantidad de bacterias posibles para una mayor cosecha del plásmido PBR322.

Es de importancia la consideración de la elección de la Ampicilina como el antibiótico que nos servira de guía para la determinación de si la bacteria ha sido en realidad transformada ya que precisamente una vez teniendo la cantidad adecuada del Plásmido o Vector PBR322, el gen que codifica para la resistencia a la Ampicilina que tiene un tamaño de 900 pb (pares de bases), será restringido o digerido con la enzima *Dra I* la cual tiene tres sitios de restricción sobre el plásmido localizados en las siguientes posiciones; 3232 pb, 3251 pb, 3943 pb, que como se observa en la estrategia 1, casi todo el gen de resistencia a la ampicilina (Apr) desaparece, en cuyo lugar serán ligados los fragmentos de kDNA de los parásitos de *Leishmania l. mexicana* por el método de Tailing.

Posterior a la cosecha del Vector PBR322 con el fin de determinar si la cantidad es la suficiente para iniciar el proyecto se procede a la realización de un gel de agarosa al 1% en concentración, en este gel se correrá paralelamente dos marcadores

de Pesos Moleculares, una muestra del plásmido perfectamente identificado que servirá como referencia, será incluido también en este gel una Curva de Concentración con cantidades de DNA bien determinadas en un valor de concentración mínimo de 100 ng (nanogramos) hasta un máximo de 500 ng por microlitro (mcl).

Este gel de agarosa nos servirá tanto para la identificación del plásmido, para determinar la concentración así como para la determinación de la pureza del mismo plásmido.

7.2.1.- SELECCION DE LA ENZIMA DE DIGESTION.

Fue seleccionada la Enzima Dra I como la encargada de digerir el plásmido PBR322, esta enzima ofrece la opción de poder romper el plásmido en dos o más fragmentos pudiéndose insertar - en este espacio un nuevo fragmento de DNA proveniente del cinetoplasto de los parásitos de Leishmania l. mexicana.

A diferencia de otras enzimas que podrían romper al plásmido en varios fragmentos que no nos servirían para cumplir nuestro objetivo o bien que solo originarían una separación del plásmido sin liberar ningún fragmento, que de igual manera no nos sería útil.

Es bien cierto que de la digestión del Plásmido PBR322 - con la Enzima Dra I se podrían originar alrededor de 3 fragmentos posibles que podrían ocasionar a la vez 3 posibilidades de Liga - ción con los fragmentos de kDNA de leishmania como se observa en la estrategia no. 2 , pero finalmente después de una purificación por presipitación con etanol (ver anexo no. 5) del plásmido dige-

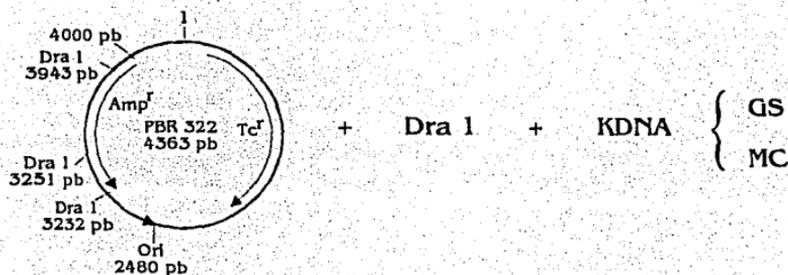
rido seguido de un corrimiento electroforético del mismo plásmido en gel de agarosa al 1 % , en donde se eligiera el fragmento del plásmido de alrededor de 3400 pb que nos servira como vector de clonación, una vez elegido el fragmento sera tratado de acuerdo a la técnica de extracciones con fenol (ver anexo no.6). Como resultado final de esta extracción se tendra solo el fragmento seleccionado (3400 pb), que nuevamente será analizado en otro gel agarosa al 1 % solo como comprobación de que realmente se cuenta con el fragmento del plásmido PBR322 adecuado comparando siempre todos los corrimientos eléctricos contra un estandar y un marcador de pesos moléculares también conocido e identificado.

Una vez teniendo al fragmento del plásmido purificado, - cuantificado e identificado perfectamente y contando ya con los fragmentos de kDNA de *Leishmania l. mexicana* procederemos a la ligación del vector y los fragmentos de kDNA por el método de Ligación Tailing.

8.0.- RESULTADOS Y ANALISIS.

ESTRATEGIA DE RESTRICCION

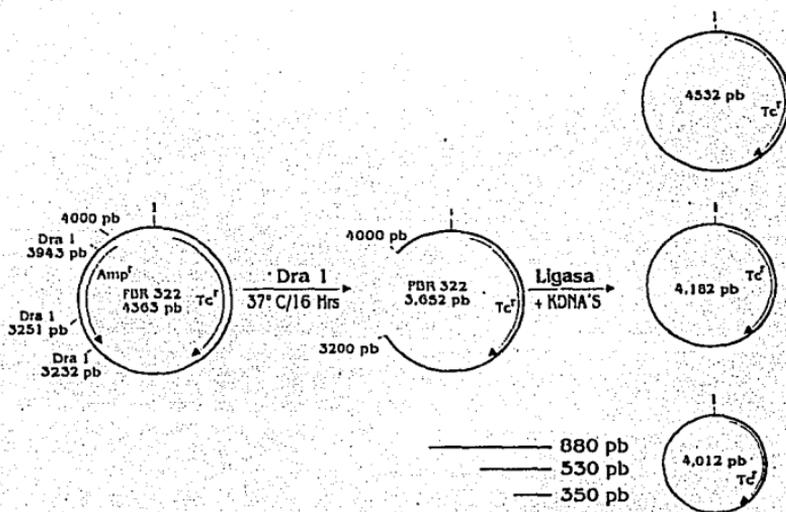
1



Posibles sitios de restricción en el plásmido PBR322 sobre los cuales puede actuar la enzima DRA I con la finalidad de insertar minicírculos de Leishmania.

ESTRATEGIA DE RESTRICCION

2



Posibles clonas formadas con el plásmido PBR322 digerido con la enzima *DRA* I y los minicírculos de *Leishmania*

8.1.1. SELECCION DE LA CEPA DE E.COLI HB101.

CRECIMIENTO EN MEDIO LURIA LIQUIDO Y AGAR CON ANTIBIOTICO Y SIN ANTIBIOTICO

TABLA NO.1

MEDIO	LB S/AMP	LB C/AMP	LA S/AMP	LA C/AMP
HB101*	4+	-	4+	-
HB101	3+	-	3+	-

4+ = VALOR MAX. CRECIMIENTO

- = NO HAY CRECIMIENTO

CRECIMIENTO DE LA BACTERIA EN LURIA AGAR SIN AMPICILINA.

TABLA NO.2

OBSERVACIONES	HB101*	HB101
CARACT.	COLONIAS DE COLOR BLANCO, PEQUEÑAS DE ASPECTO CREMOSO.	COLONIAS DE COLOR BLANCO, PEQUEÑAS DE ASPECTO CREMOSO.
CRECIMIENTO	4+	4+
T. GRAM	BASTONES GRAM NEGATIVOS, NO FORMA HIFAS	BASTONES GRAM NEGATIVOS, SI FORMA HIFAS
TEMP 30-33	FORMAN FILAMENTOS	FORMAN FILAMENTOS
TEMP. 37	FORMAN AGREGADOS	FORMAN AGREGADOS

**CRECIMIENTO DE LA BACTERIA HB101 EN MEDIO LURIA LIQUIDO
CON ESTREPTOMICINA**

TABLA NO. 3

CEPA	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
HB101*	4+	FORMA AGREGADOS CREMOSOS QUE SE DISGRGAN FACILMENTE CON-AGITACION GENTIL.
HB101	4+	FORMA AGREGADOS CREMOSOS QUE SE DISGREGAN FUERTE AGITACION.

**DIFERENCIACION DE LA CEPA BACTERIANA POR TRANSFORMACION
CON EL PLASMIDO PBR322.**

TABLA NO. 4

CEPA	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	EFICIENCIA DE TRANSFORMACION
HB101*	4+	COLONIAS PEQUEÑAS CONCAVAS, COLOR AMARILLO AL CENTRO CON ORILLAS TRANSLUCIDAS Y BORDES RUGOSOS.	1.15×10^4
HB101	4+	COLONIAS PEQUEÑAS CONCAVAS DE COLOR AMARILLO CON BORDES CIRCULARES.	4.04×10^5

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

8.1.2.- ANALISIS.

Después del primer intento de transformar la bacteria E.Coli HB101 con el Plásmido PBR322, el cual fué fallido, no teniendo ninguna bacteria crecida en el Medio Luria Líquido con Ampicilina como antibiótico; Sabiendo que la cepa de E.Coli es un excelente hospedador para PBR322, se hacia necesaria la comparación de la cepa bacteriana con la cual se contaba y sabiendo además que la última vez que se hacia un reconocimiento de la cepa tenía cuando menos tres meses que no se realizaba, pero sin embargo la bacteria si se resembleda o se hacian pases a otros cajas de Luria Agar sin Ampicilina.

Tanto la cepa de E.Coli y el Plásmido PBR322 habian sido proporcionados por el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiologica). Considerando los resultados de la transformación se pidió una nueva cepa de E.Coli HB101 asi como del Plásmido PBR322 al departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, de esta manera fue posible la verificación de la cepa de E.Coli y del Plásmido PBR322 con los que se contaba. Las Cepas se identificaron de la siguiente manera la cepa del INDRE fué reconocida como HB101 y la cepa donada por el IPN fué identificada como HB101*.

Como muestran los resultados en la tabla no.1 el crecimiento de las dos cepas bacterianas son iguales en los mismos medios de cultivo, en la tabla no.2 haciendo una comparación de las características de las colonias, de la tinción Gram, asi como de su crecimiento a diferentes temperaturas tampoco nos da la

suficiente información para poder concluir si la cepa HB101 había sufrido alguna posible mutación o cambio en su membrana que le impidiera su transformación con PBR322 o bien quizá el problema era algún cambio sufrido en el Plásmido PBR322,

Un nuevo intento para la determinar la capacidad de transformación de la cepa HB101, fué el crecimiento de ambas cepas - en Luria Líquido con estreptomycin a una concentración de 10 mg por ml; La tabla no.3 refleja que aparentemente no hay diferencia alguna entre las dos cepas y que quizá se cometió algún error en el desarrollo de la primera transformación.

Consideramos que la prueba que nos daría mayor información para decidir la selección de la cepa a usar entre HB101 y la cepa HB101* sería la transformación de ambas cepas con el Plásmido PBR322 proporcionado por el INDRE, de cierto modo el Plásmido determinara si el problema radica en las bacterias o es cuestión del Plásmido (hasta este momento el Plásmido donado por el IPN no ha sido utilizado). De esta manera al realizar la transformación los resultados reflejados en la tabla no.4, usando como prueba definitiva la eficiencia de transformación esta es mayor - esta en HB101*, se decidió la elección de la cepa HB101* donada por el IPN y el Plásmido PBR322 proporcionado por el INDRE.

III.3 REPLICACION Y EXTRACCION DEL PLASMIDO PBR322.

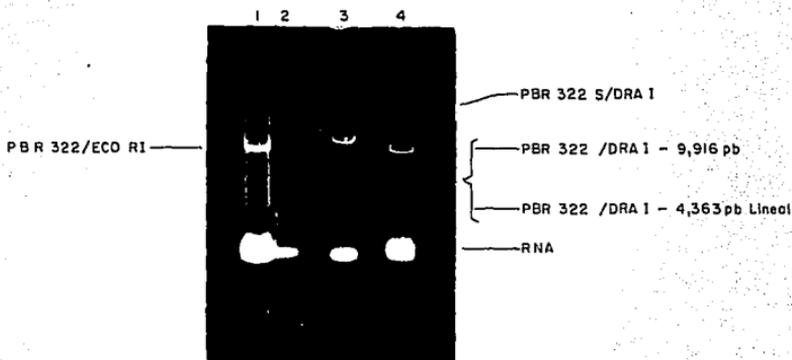
CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PBR322 EN AGAROSA -
NORMAL AL 0.8 % .

TABLA NO. 5

MUESTRA	ENZIMA	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO	INCUBACION 65 C
PBR322	ECO RI	5 MCL	10 MCL	5 MCL	10 MIN
PBR322*	DRA I	5 MCL	10 MCL	5 MCL	10 MIN
PBR322f	-	3 MCL	12 MCL	5 MCL	10 MIN
PBR322f'	DRA I	3 MCL	12 MCL	5 MCL	10 MIN

PBR322 = Muestra de referencia donada por el INDRE.
 PBR322* = Muestra de Plásmido donada por el INDRE.
 PBR322f = Muestra extraída de la cepa HB101*, usada como referencia en la restricción, no fué digerida con la enzima DRA I.
 PBR322f' = Muestra extraída de la cepa HB101*, digerida con la enzima DRA I.

FIGURA NO. 10



CORRIMIENTO ELECTROFORETICO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DEL PLASMIDO PBR322 EN GEL DE AGAROSA NORMAL AL 0.8 % .

TABLA NO. 6

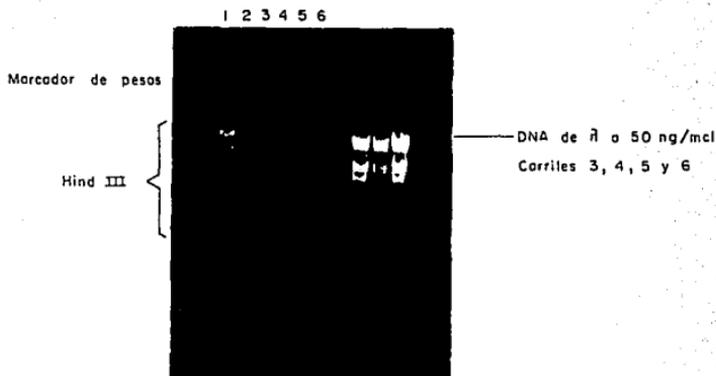
MUESTRA	ENZIMA	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO	INCUBACION 65 C
λ Hind III	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL	10 MIN
PBR322f	-	1 MCL	14 MCL	5 MCL	10 MCL
DNA	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL	10 MCL
DNA	-	3 MCL	12 MCL	5 MCL	10 MCL
DNA	-	4 MCL	11 MCL	5 MCL	10 MCL
DNA	-	5 MCL	10 MCL	5 MCL	10 MCL

λ Hind III= Marcador de Pesos Moléculares.

PBR322f = Muestra extraída de la cepa HB101*, usada como referencia de la restricción, esta - no fué tratada con la enzima Dra I.

DNA = Muestra de DNA del fago Lamda a una concentración determinada de 50 ng/mcl.

FIGURA NO. 11



COMPROBACION DE LA CONCENTRACION DEL PLASMIDO PBR322 EN GEL DE AGAROSA NORMAL AL 0.8 % DE CONCENTRACION.

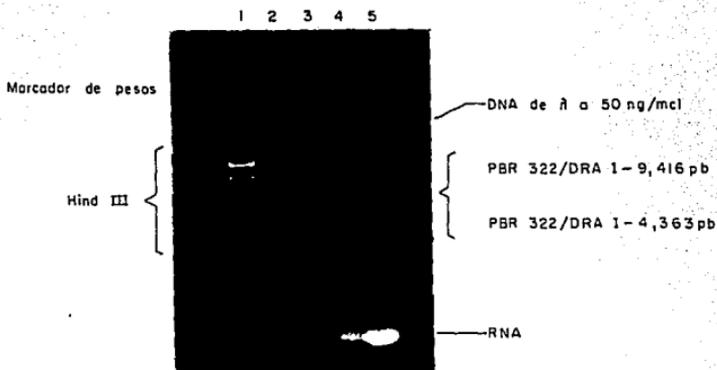
TABLA NO. 7

MUESTRA	ENZIMA	PRESIPITADO CH3COONH4	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO
λ Hind III	-	NO	3 MCL	12 MCL	5 MCL
DNA	-	NO	1 MCL	14 MCL	5 MCL
PBR322f'	SI	SI	1 MCL	14 MCL	5 MCL
PBR322f'	SI	SI	1 MCL	14 MCL	5 MCL
PBR322f'	SI	SI	1 MCL	14 MCL	5 MCL

DNA = Muestra de referencia a una concentración de 50 ng / mcl.

PBR322f' = Muestra extraída de la cepa HB101*, digerida con la enzima DRA I, y presipitada para la purificación del mismo Plásmido.

FIGURA NO. 12



CORRIENTO ELECTROFORETICO DE PBR322 EN GEL LPM (LOW-MELTING POINT) AL 1.5 % .

TABLA NO. 8

MUESTRA	ENZIMA	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO	INCUBACION 65 C
λ Hind III	-	5 MCL	10 MCL	5 MCL	10 MIN
ϕ X 174	-	1.5 MCL	13.5MCL	5 MCL	10 MCL
PBR322f	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL	10 MCL
PBR322f'	DRA I	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MCL
PBR322f'	DRA I	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MCL
PBR322f'	DRA I	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MCL

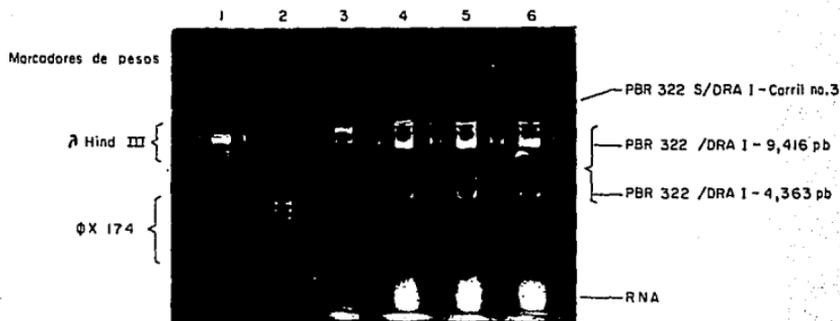
λ Hind III= Marcador de Pesos Moléculares

ϕ X 174= Marcador de Pesos Moléculares

PBR322f= Muestra de Plásmido extraída de la cepa HB101*, usada como referencia en la restricción.

PBR322f'= Muestra de Plásmido extraída de la cepa HB101*, digerida con la enzima DRA I.

FIGURA NO. 13



**TRATAMIENTO CON LA ENZIMA BAP DEL PLASMIDO PBR322 DIGE -
RIDO CON LA ENZIMA DRA I.**

TABLA NO. 9

MUESTRA	ENZIMA	EXTRAIDO DE LMP	PRESIPITADO CH3COONH4+	TRATADO CON BAP	REPRESIPITADO CH3COONH4+
λ Hind III	-	NO	NO	NO	NO
Φ X 174	-	NO	NO	NO	NO
PBR322*	SI	NO	SI	NO	NO
PBR322f'	SI	SI	SI	NO	NO
PBR322f'	SI	SI	SI	SI	SI

λ Hind III= Marcador de Pesos Moléculares

Φ X 174= Marcador de Pesos Moléculares

PBR322* = Extraído de la cepa HB101*, digerido con la enzima DRA I, es usado solo como referencia para comparar la muestra de PBR322 tratada con BAP.

PBR322f' = Extraído de la cepa HB101*, digerido con la enzima DRA I, extraído de LMP.

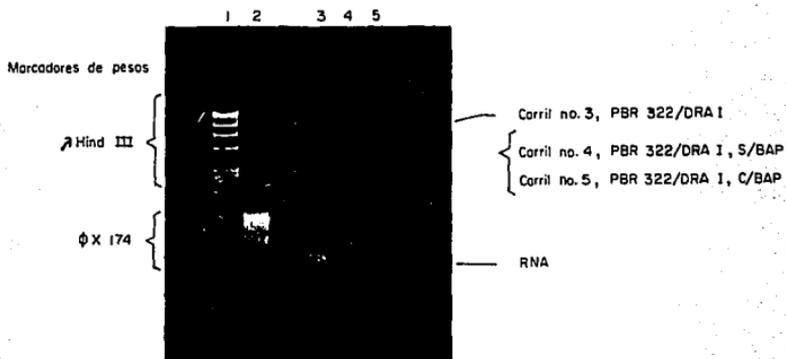
PBR322f' = Extraído de la cepa HB101*, digerido con la enzima DRA I, extraído de LMP y tratado con BAP.

**CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DEL PLASMIDO PBR322 TRATADO -
CON LA ENZIMA BAP EN GEL DE AGAROSA NORMAL AL 0.8 % .**

TABLA NO. 10

MUESTRA	TRATADO CON BAP	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO
λ Hind III	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL
Φ X 174	-	1 MCL	14 MCL	5 MCL
PBR322*	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL
PBR322f'	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL
PBR322f'	SI	2 MCL	13 MCL	5 MCL

TABLA NO. 14



8.2.1. ANALISIS DE RESULTADOS.

Con la finalidad de poder determinar que el plásmido extraído de la cepa de E.Coli HB101*, era realmente PBR322, después de la extracción se corrió electroforéticamente un gel de agarosa normal al 0.8 % (ver anexo no.8). En este gel de agarosa fueron incluidas dos muestras del Plásmido PBR322 ya muy bien identificadas las cuales fueron; una muestra del Plásmido PBR322 digerida con la enzima Eco RI y una muestra del Plásmido PBR322 digerida con la enzima DRA I, ambas muestras servirían para determinar si la muestra extraída era realmente el plásmido deseado, de la muestra extraída de las células de E.Coli*, la mitad (30 mcl), fué digerida con la enzima DRA I, contando así ahora con dos muestras de PBR322 ambas de 30 mcl, una digerida con la enzima DRA I y la otra sin digerir.

Como se observa en la figura no.10, analizando primero la muestra en el carril no.3, que corresponde a la muestra no digerida con la enzima DRA I, pero que fué extraída de la cepa HB101 previamente transformada con el Plásmido PBR322, esta muestra ha sido identificada como PBR322f se pueden observar varias bandas de diferente Peso Molecular las cuales no aparecen en la muestra corrida en el carril no.4 la cual fué tratada con la enzima DRA I, esta muestra un patrón electroforético distinto al de la muestra del carril 3, la muestra se identificó como PBR322f' en esta muestra se observan dos bandas bien separadas entre sí que corresponden a diferente Peso Molecular, que determinan que el Plásmido ha sido digerido por la enzima DRA I, es bien cierto

ambas muestras no se pueden comparar con la muestra que serviría de referencia, que corresponde al Plásmido PBR322 digerida con DRA I que se encuentra en el carril no.2 debido a que la muestra presenta cierto grado de degradación. Refiriendonos a la muestra del carril no.1, que corresponde al Plásmido PBR322 digerida con la enzima Eco RI muestra una sola banda muy intensa que es un patrón electroforético muy distinto al que presentado por la enzima DRA I en el mismo Plásmido PBR322.

Antes de continuar con el consumo del Plásmido PBR322f' extraído de la cepa HB101* se realizó un corrimiento electroforético en agarosa normal al 0.8 % en concentración para determinar la concentración del Plásmido PBR322f', en este gel será incluida una curva de concentraciones de DNA de Λ a una concentración bien determinada, esta muestra fué adquirida a BRL Laboratories.

Observando la fotografía no. 11, los carriles marcados del 3 al 6 corresponden a la curva de concentración del DNA de Λ , puede determinarse unicamente por la intensidad de las bandas que la concentración del DNA de Λ va en aumento de un mínimo de 50 ng hasta un máximo de 200 ng.

Comparando la intensidad de la banda problema de PBR322f' situada en el carril no. 2, la cual ha sido extraída de la cepa HB101* la cual tambien, ha sido digerida con la enzima DRA I, podríamos determinar por la intensidad de la banda que la cantidad del Plásmido PBR322f' es de 150 ng/mcl, en total se cuenta con un volumen de 60 mcl, separada en dos alicuotas de 30 mcl cada una, De estas dos alicuotas una ya ha sido digerida con la enzima DRA I que pertenece al Plásmido PBR322f' (ver anexo no.1). Se cuen

ta con cantidad de 9 000 ng o 9.0 mcg, repartidos en dos alicuotas de 30 mcl; En el carril no. 1, se encuentra un marcador de Pesos Moleculares que es λ Hind III, este servirá como referencia para identificar la banda del PBR322f en base a su Peso Molecular

No muy contentos con la resolución de la fotografía referente a que no se define muy bien la concentración del Plásmido se decidió realizar un nuevo gel de agarosa a una concentración del 0.8 %, en este gel se incluyo un marcador de Pesos Moleculares que servira de referencia en el carril no. 1, en el carril no.2 se encuentra una muestra de DNA de Lamda a una concentración de 50 ng / mcl, en los carriles 3 y 4 se encuentran una muestra por duplicado del Plásmido PBR322f' digerida con la enzima DRA I y como se observa tienen mucho parecido con el patrón electroforético que presenta la muestra de referencia localizada en el carril no. 5. En las muestras problema como en la de referencia aparece en la parte inferior de los tres carriles una mancha muy intensa que corresponde al RNA.

Si se comparan las dos muestras problema de los carriles 3 y 4, la concentración es aproximadamente 3 veces la concentración de la muestra del carril no. 2, la cual corresponde al DNA de Lamda y tiene una concentración de 50 ng / mcl. Cabe recordar que la comparación de la concentración es solamente por la intensidad de las bandas corroborandose que la concentración del Plásmido PBR322f' es realmente de 150 ng / mcl.

Una vez determinada la concentración del Plásmido PBR322 que se extrajo de la cepa HB101* que se identifico como PBR322f y PBR322f' (tratada con DRA I), se procedio a la extracción de la-

banda de nuestro interes que sera nuestro Vector, para este fin se eligio correr la muestra en un gel de agarosa de Bajo Punto - de Fusión a una concentraci3n de 1.5 % , la selecci3n de este gel y a esta concentraci3n tiene varias finalidades; Nos facilitar3 la extracci3n de la banda de nuestro interes debido a que por la concentraci3n permite una mayor separaci3n de las bandas del patr3n electrofor3tico y ademas la constituci3n de este gel hace que el DNA pueda extraerse f3cilmente sin que queden restos del gel en las muestras de DNA.

Es de esperarse que entre mayor sea la concentraci3n del gel este favorecera un mejor desplazamiento de las bandas de peso molecular bajo quedandose en la parte alta del gel las bandas de mayor peso molecular, si el peso molecular es muy alto se da el caso de que estas bandas salgan apenas del pozo de deposito o en el otro caso de que ni siquiera logren separarse dando la impresi3n de que se trata de una sola banda.

Al observar la figura no. 13, que corresponde al corrimiento electrofor3tico del Pl3smido PBR322 extraido de la cepa HB101* en agar LMP al 1.5 % , todas las muestras no tienen una separaci3n adecuada de las bandas de peso mol3cular alto, esto se basa en la explicaci3n antes dada, los patrones electrofor3ticos de los carriles 1 y 2 corresponden a los marcadores de pesos moleculares λ Hind III y ϕ X 174, en el carril no. 3, fu3 corrida la muestra correspondiente al Pl3smido PBR322f (sin digerir con DRA I), esta muestra un patr3n electrofor3tico formado por 4 bandas de diferente peso molecular lo que pone en evidencia que no ha sido digerido, los patrones electrofor3ticos de los carriles -

4, 5 y 6 corresponden al Plásmido PBR322f' (digerido con DRA I) como se contaba con un volumen de 30 mcl, la muestra se dividió en tres alícuotas de 10 mcl cada una y las tres muestras fueron corridas para extraer la banda de nuestro interés y contar así con una cantidad suficiente para las ligaciones con los kDNA's de Leishmania l. mexicana.

La banda extraída del gel LMP al 1.5 % , fué la que se aprecia con más intensidad en los carriles 4, 5 y 6, el gel fué cortado con un bisturí solamente por las orillas de la banda tratando de no cortar más gel que no contubiera la banda o bien tratando de no dejar algo de DNA de la banda en el gel, los tres fragmentos fueron colocados en tubos eppendorf y tratados de en base a la técnica no. 7.

No se podría determinar en cierta manera el Peso Molecular de la banda de interés debido a que el marcador de Pesos Moleculares no presenta una muy buena separación de las bandas causado esto por las consideraciones mencionadas anteriormente referentes a las características del gel LMP al 1.5 % .

Una vez teniendo la banda de aproximadamente de 3,652 - pares de bases, esta fué precipitada en base a la técnica de precipitación con acetatos (ver anexo no. 5), esto con la finalidad de limpiar el Plásmido por precipitación para eliminar el exceso de la enzima DRA I y lo poco de sales que hubiesen quedado del buffer de la restricción, así como los excesos de los restos de buffer de la electroforesis.

Al tener el Plásmido PBR322f' lo más limpio posible se trataría con la enzima BAP la que eliminaría los extremos fosfa -

tos de los extremos rasurados del Plásmido PBR322 digerido con la enzima DRA I, finalmente el Plásmido PBR322f' después de ser tratado con la enzima BAP fué nuevamente reprecipitado con acetatos para eliminar el exesos de sales y de la misma enzima BAP.

El Plásmido PBR322f' reprecipitado fué corrido electroforéticamente en un gel de agarosa normal al 0.8 % de concentración para determinar, si la enzima realmente logro eliminar los grupos fosfatos de los extremos del Plásmido PBR322f' tratado con la enzima DRA I, y tambien poder determinar si la concentración del Vector o Plásmido PBR322f' no se ha modificado mucho por las precipitaciones con acetatos para mejorar su calidad.

Al analizar la figura no. 14, que corresponde al corrimiento electroforético del Plásmido PBR322f', comparando el Peso Molecular de la muestra del carril no.4, que corresponde al Plásmido PBR322f' tratado con BAP no difiere mucho en cuanto a Peso Molecular y concentración de la banda corrida en el carril no.5 que pertenecen tambien al Plásmido PBR322f' el cual no fué tratado con BAP y sirvio solamente como referencia para determinar la concentración del vector, no sirviendo asi para determinar si BAP realmente cumplio su función, (no se puede evaluar la acción de BAP de manera muy cierta debido a que la cantidad de terminaciones fosfato que BAP podría eliminar seria insignificante comparadas con el tamaño del vector).

En cuanto a la concentración existente en las muestras de los carriles se considera una concentración de 140 ng / ml, observando el patrón electroforético de la muestra del carril 3 - que corresponde al Plásmido PBR322 - sin tratar con DRA I no hay

una muy buena resolución en cuanto a la percepción de las bandas (esto debido quiza a que el gel de agarosa al 0.8 % tiene mucho espesor o bien sea debido a que al momento de colocar el gel en la cámara de electroforesis se colo una burbuja la cual ocasiono un abultamiento de esta parte del gel afectando tambien el corrimiento del marcador de pesos moleculares ϕ X 174). Comparando el peso moléculas del vector de los carriles 4 y 5 , con el marcador de pesos moleculares del carril 1 que corresponde a λ Hind III es aproximadamente de 4,363 pares de bases comparandola con la última banda del marcador de pesos moleculares que es de 4,360 pb.

**8.3.0. IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
DE LOS MINICIRCULOS DE kDNA DE LEISHMANIA L. MEXI-
CANA.**

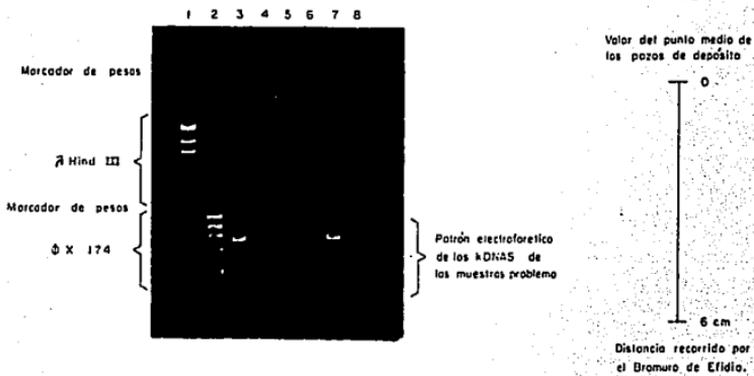
**CORRIMIENTO ELECTROFORETICO EN AGAROSA NORMAL AL 0.8 % -
DE LOS MINICIRCULOS DE kDNA.**

TABLA NO. 11

MUESTRA	ENZIMA DRA I	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO	INCUBACION 65 C
λ Hind III	-	5 MCL	10 MCL	5 MCL	10 MIN
Φ X 174	-	1.5 MCL	13.5MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA MC	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA GS	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA JS	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA HF	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA CR	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA YUCA	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN
kDNA DONO	SI	10 MCL	5 MCL	5 MCL	10 MIN

λ Hind III = Marcador de Pesos Moleculares
 Φ X 174 = Marcador de Pesos Moleculares
 kDNA = Muestras de DNA de minicirculos de diferen-
 tes pacientes con manifestaciones clinicas
 de la enfermedad de Leishmania L. Mexicana

FIGURA NO. 15



CORRIMIENTO ELECTROFRETICO DE LOS MINICIRCULOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA PURIFICADOS EN AGAROSA NORMAL A LA CONCENTRACION DEL 0.8 % .

TABLA NO. 12

MUESTRA	ENZIMA DRA I	VOLUMEN MUESTRA	VOLUMEN AGUA	VOLUMEN BROMURO	PRESIPITADO CH3COONH4
λ Hind III	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL	NO
Φ X 174	-	2 MCL	13 MCL	5 MCL	NO
kDNA MC	SI	2 MCL	13 MCL	5 MCL	SI
kDNA MC	SI	2 MCL	13 MCL	5 MCL	SI
kDNA GS	SI	2 MCL	13 MCL	5 MCL	SI
kDNA GS	SI	2 MCL	13 MCL	5 MCL	SI

λ Hind III= Marcador de Pesos Moléculares

Φ X 174= Marcador de Pesos Moléculares

kDNA MC= Minicírculos de DNA de Leishmania L. M. Difusa.

kDNA GS= Minicírculos de DNA de Leishmania L. M. Localizada.

FIGURA NO. 16

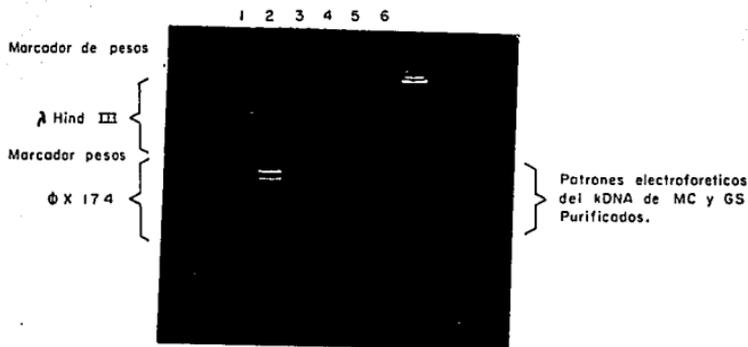
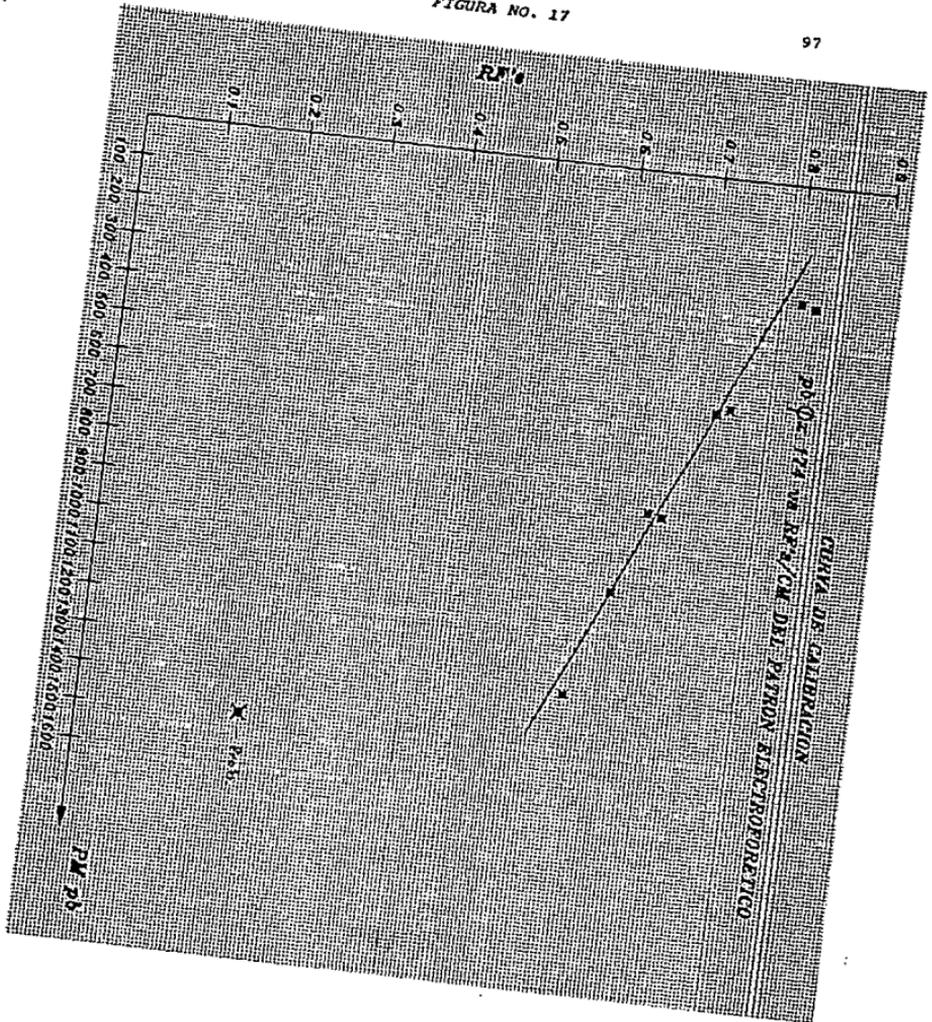


FIGURA NO. 17



CURVA DE CALIBRACION EN Rf'S DEL MARCADOR DE PESOS MOLECULARES ϕ X 174.

Distancias de las bandas pertenecientes al Patrón Electroforético de ϕ X 174.

1ra. Banda - 4.95 cm

2da. Banda - 4.35 cm

3ra. Banda - 3.95 cm

4ta. Banda - 3.75 cm

5ta. Banda - 3.50 cm

Dist. Recorrida Por el Bromuro de Etidio - 6.0 cm

CONSIDERACIONES.

A.- Punto Medio de los pozos de depósito se tomó como un el Valor de CERO (0).

B.- La dist. recorrida por el Bromuro de Etidio se tomó como el frente de avance con un valor de 6.0 cm.

C.- Para el cálculo de los valores de Rf fué considerado :

$$Rf = \text{Dist. Recorrida por la Mtra.} / \text{Dist. Recorrida por el EB.}$$

D.- Se considero al EB (Bromuro de Etidio), como el frente de avance debido a que es el que nos hace evidente el grado de avance de las muestras del DNA y a que tiene un desplazamiento mayor a cualquier muestra de DNA.

VALORES DE Rf DEL MARCADOR DE PESOS ϕ X 174.

VALORES DE Rf (X)	pb DE ϕ X 174 (Y)
A.- 4.95 cm / 6.0 cm = 0.825	310
B.- 4.35 cm / 6.0 cm = 0.725	603
C.- 3.95 cm / 6.0 cm = 0.658	872
D.- 3.75 cm / 6.0 cm = 0.625	1,078
E.- 3.50 cm / 6.0 cm = 0.583	1,353

REGRESION LINEAL DE LOS VALORES DE Rf DE ϕ X 174.

$$r = - 0.98313 , A = 0.87689 , B = - 2.29718 \times 10$$

VALORES DE Rf DE MC	pb CORRESPONDIENTES
A.- 4.05 cm / 6.0 cm = 0.675	879.0
B.- 4.45 cm / 6.0 cm = 0.742	587.2
C.- 4.85 cm / 6.0 cm = 0.808	300.0

REGRESION LINEAL CONSIDERANDO SOLO LA DISTANCIA.

$$r = - 0.9831 , A = 5.26081 , B = - 1.3768 \times 10$$

VALORES DE DISTANCIA	pb CORRESPONDIENTES
A.- 4.05 cm	879.5
B.- 4.45 cm	589.0
C.- 4.85 cm	298.4

8.3.1. ANALISIS.

Una vez realizada la extracción del kDNA de los minicírculos de Leishmania l. mexicana de acuerdo a la técnica para la purificación de minicírculos (ver anexo no. 4), fueron purificados por la técnica de precipitación con acetatos (ver anexo no.5) esto con la finalidad de contar con el kDNA lo más limpio posible.

La extracción del kDNA se realizó a todas las muestras con las que se contaba que fueron:

- a).- Gustavo Solis (GS) - Produce Leishmaniasis cutánea difusa
- b).- Heriberto Frias (HF) - Produce Leishmaniasis cutánea difusa
- c).- Maricruz (MC) - Produce Leishmaniasis cutánea localizada
- d).- Juan Soberano (JS) - Produce Leishmaniasis cutánea localizada
- e).- Costa Rica (CR) - Produce Leishmaniasis cutánea localizada
- f).- Yucatan (Y) - Produce Leishmaniasis cutánea localizada
- g).- Dono (D) - Produce Leishmaniasis cutánea localizada

Es importante mencionar que de estas muestras las de interés para el proyecto fueron solamente las muestras de Maricruz (MC) y Gustavo Solis, que producen L.C.L (Leishmaniasis cutánea localizada) y L.C.D (Leishmaniasis cutánea difusa) respectivamente, la extracción del kDNA de las demás muestras fué realizada para tomarse en un momento dado como alternativas en el caso de que el proyecto lo ameritara.

Al contar con los kDNA's de las muestras purificadas se corrió un gel de agarosa normal al 0.8 % para determinar la concentración y calidad de las muestras, como se observa en la figura no. 15 los dos marcadores de pesos que son ϕ Hind III y ϕ X 174

ambos muestran muy buena resolución lo que facilitó la determinación en forma más adecuada del peso molecular de las muestras de kDNA, al analizar las muestras en el orden en el cual fueron corridas electroforéticamente como aparecen en la tabla no. 11, el patrón electroforético que proyecta la muestra de MC en el carril número 3, presenta una banda al mismo nivel de la tercera banda del marcador de pesos moleculares Φ X 174 la cual corresponde al peso molecular de 872 pares de bases, además presenta dos bandas más una a la altura de 500 pb y la última a 300 pb aproximadamente con respecto al marcador de pesos moleculares.

Al analizar el patrón electroforético de la muestra del carril no. 4 la cual corresponde a Gustavo Solis (GS), las bandas presentan un peso molecular muy similar a las bandas pertenecientes a la muestra de MC, solo que la concentración es mayor en la muestra de kDNA de MC que de GS, la concentración calculada para la muestra de MC es de 600 ng / 10 mcl, de esta muestra se cuenta con un volumen total de 40 mcl (2400 ng), mientras que para la muestra de GS se calcula una concentración de 400 ng / 10 mcl , de esta muestra se cuenta con un volumen de 40 mcl (1600 ng).

A diferencia de la muestra corrida en el carril no. 5 en donde la concentración de la muestra es muy poca, todas las demás muestran un patrón electroforético muy similar a las muestras de MC y GS, lo cual no significa que se trate de la misma muestra corrida 6 veces, pero todas corresponden al kDNA de mini-círculos de *Leishmania l. mexicana*.

La concentración y calidad de las muestras de kDNA de *Leishmania l. mexicana* después de ser precipitadas con acetatos

reflejan que cuentan con las condiciones necesarias para la ligación con el Vector PBR322 el cual ya ha sido previamente digerido con la enzima DRA I.

De este gel de agarosa se extrajeron las bandas que corresponden a 872 pb , el gel de agarosa fué recortado muy cuidadosamente en la periferia de las bandas de MC y GS y fuerón tratadas de acuerdo al anexo no.7 , para la purificación de la banda y posteriormente las muestras extraídas fuerón corridas electroforéticamente en agarosa normal al 1.0 % , esto con la finalidad de poder determinar la concentración y calidad de las bandas extraídas.

Al observar la figura número 19 que corresponde al gel de agarosa al 0.8 % , en este fueron corridas cuatro muestras que corresponden a MC, MC, GS y GS, las dos primeras corresponden a L.C.L. y las últimas dos corresponden a L.C.D., se puede determinar que la concentración de MC duplica a las demás muestras haciendo mención que la cantidad de muestra dispuesta para el gel fueron 2 mcl.

Podríamos determinar que solo contamos con una sola banda de peso molecular de 872 pb en las 4 muestras corridas electroforéticamente con una concentración de aproximadamente de 100 ng en 2 mcl para la muestra de MC en el carril número 3, (de esta muestra se cuenta con un volumen de 40 mcl), con respecto a las otras muestras se cuenta con una concentración de 50 ng / 2 mcl (de esta muestras se cuenta con un volumen de 40 mcl).

Con referencia al carril no. 4, que aunque corresponde también a MC, la banda no presenta la misma intensidad como la

muestra corrida en el carril número 3, esto fué debido a que al momento de que estaba gelificando la agarosa el peine utilizado para la formación de los pozos de depósito el diente del peine que formaría la cavidad número 4 presentaba en su parte inferior restos de plástico que originó una perforación en el gel ocasionando la pérdida de muestra, no obstante la poca concentración que restó refleja las mismas características que el resto de las muestras.

Aunque en este momento se contara ya con los fragmentos de kDNA de *Leishmania l. mexicana* y con el Vector de PBR322 digerido con DRA I, era necesario realizar una comprobación más adecuada del peso real de las bandas presentadas por los patrones electroforéticos de todas las muestras de los kDNA's, para lo que se determinaron los Rf's de todas las muestras incluyendo el marcador de pesos moleculares de referencia que fué $\Phi X 174$.

Después de graficar el peso molecular en pares de bases y los resultados de los Rf's del marcador de pesos $\Phi X 174$, se calcularon por Regresión Lineal (RL), el número de pares de bases para los valores de Rf pertenecientes a las muestras problema ; Al construir la curva de calibración del marcador $\Phi X 174$ y al interpolar en dicha curva los valores de Rf de las muestras, el número de pares de bases encontrados son muy similares a los pares de bases del marcador $\Phi X 174$ si se hiciera la comparación solamente en forma visual. La curva de calibración del marcador de pesos moleculares $\Phi X 174$ fué realizada en papel milimétrico, pudiéndose de esta manera calcular el número de pares de bases de las muestras problema por medio de la Ecuación de la Recta.

Tomando como referencia la figura no. 15, para la determinación de los valores de R_f , considerando para este fin la distancia recorrida por las muestras entre la distancia recorrida por el bromuro de etidio bajo las mismas condiciones de tiempo.

Se tomo como punto de inicio o valor de cero el punto medio de los pozos de deposito y como la distancia recorrida por el bromuro de etidio el valor de 6, ambos valores expresados en centímetros.

La curva de calibración para la determinación del número de pares de bases se realizó tomando como referencia las distancias presentadas por cada una de las bandas de el patrón electroforético del marcador de pesos moleculares $\Phi X 174$, los cuales fueron graficados en el eje de las Y por ser la variable dependiente, y en el eje de las X fueron graficados los pesos moleculares de cada una de las bandas del patrón electroforético del mismo marcador $\Phi X 174$ por ser considerados como las variables independientes, se tomó como referencia al marcador $\Phi X 174$ ya los pesos moleculares de cada una de sus bandas son más semejantes a los valores de las muestras problema.

Para calcular el peso moléculas de las bandas del patrón electroforético de todas las muestras problema solo fueron utilizados los valores de R_f de la muestra de MC debido a que el patrón electroforético de todas las muestras problema son muy similares.

Al interpolar los valores de R_f de cada una de las bandas problema pertenecientes al patrón electroforético de MC a la Curva de calibración y haciendo uso de la Regresión Lineal los valo

res determinados fuerón: 879 pb para la banda en la primera posición, 587 pb y 300 pb para las bandas en la segunda y tercera posición. Determinamos también por la semejanza en las distancias de las demas bandas del patrón electroforético de las demas muestras problema que tienen los mismos pesos moléculares que las bandas de MC.

Haciendo uso tambien de los resultados de la Regresión Lineal fuerón cálculados los valores equivalentes de pares de bases para el patrón electroforetico de MC considerando en vez de los valores de Rf la distancia de las bases en centímetros; - fuerón encontrados resultados muy semejantes en donde para la banda en primera posición fuerón determinados 879.5 pb, mientras que para las bandas en segunda y tercera posición, fuerón encontrados los valores de 589 pb y 298.4 pb respectivamente.

Consideramos que contamos ya con la banda adecuada de - kDNA de las muestras de MC y GS para llevar acabo la construcción de la sonda, haciendo uso de el vector PBR322 (digerido - con DRA I).

**8.4.0. CLONACION DEL VECTOR PBR322 DIGERIDO CON DRAI-
CON MINICIRCULOS DE LEISHMANIA L. MEXICANA POR
EL METODO DE TAILING.**

CONSIDERACIONES :

- A.- PBR322 DIGERIDO CON DRAI Y TRATADO CON BAP
- B.- MINICIRCULOS DE kDNA DE MC Y GS PURIFICADOS
- C.- LA INCORPORACION DE LOS NUCLEOTIDOS dC A LOS kDNA DE MC Y GS, ASI COMO EN EL VECTOR LA INCORPORACION DEL NUCLEOTIDO dG ES SOLO EN EL EXTREMO 3'OH TERMINAL.

- A).- TAILING DE LOS MINICIRCULOS DE kDNA DE MC Y GS.

REACCION DE TAILING PARA kDNA DE MC

TABLA NO. 13

MUESTRA		VOLUMEN/CONC.
1.- kDNA DE MC	-	13 MCL (40 NG / MCL)
2.- NUCLEOTIDO dC	-	5 MCL (15 - 30 mmol/L)
3.- CoCL ₂	-	1 MCL (0.75 mmol/L)
4.- dNTP	-	2 MCL (100 pmol/L)
5.- BUFFER 5X	-	6 MCL
6.- H ₂ O DEST.	-	3 MC
VOL. TOTAL		30 MCL

REACCION DE TAILING PARA kDNA DE GS

TABLA NO. 14

MUESTRA		VOLUMEN/CONC.
1.- kDNA DE GS	-	13 MCL (40 NG / MCL)
2.- NUCLEOTIDO dC	-	5 MCL (15 - 30 mmol/L)
3.- CoCL2	-	1 MCL (0.75 mmol/L)
4.- dNTP	-	2 MCL (100 pmol/L)
5.- BUFFER 5X	-	6 MCL
6.- H2O	-	3 MCL

VOL. TOTAL 30 MCL

REACCION DE TAILING PARA EL VECTOR PBR322 DRAI/BAP.

TABLA NO. 15

MUESTRA		VOLUMEN/CONC.
1.- VECTOR PBR322	-	4 MCL (60 NG / MCL)
2.- NUCLEOTIDO dG	-	5 MCL (15 - 30 mmol/L)
3.- CoCL2	-	1 MCL (0.75 mmol/L)
4.- dNTP	-	2 MCL (100 pmol/l)
5.- BUFFER 5X	-	4 MCL
6.- H2O	-	4 MCL

VOL. TOTAL 20 MCL

REACCION ANNEALING ENTRE EL VECTOR PBR322 Y LOS kDNA
DE MARICRUZ (MC) Y GUSTAVO SOLIS (GS).

TABLA NO. 16

MUESTRA		VOLUMEN/CONC.
1.- VECTOR PBR322 TAILING dG	-	6.6 MCL (30 NG/MCL)
2.- kDNA MC TAILING dC	-	19 MCL (21.6 NG/MCL)
3.- ANNEALING BUFFER 10 X	-	4 MCL
4.- H2O	-	10.4 MCL
		VOL. TOTAL 40 MCL

TABLA NO. 17

MUESTRA		VOLUMEN/CONC.
1.- VECTOR PBR322 TAILING dG	-	6.6 MCL (30 NG/MCL)
2.- kDNA GS TAILING dC	-	19 MCL (21.6 NG/MCL)
3.- ANNEALING BUFFER 10 X	-	4 MCL
4.- H2O	-	10.4 MCL
		VOL. TOTAL 40 MCL

**8.4.1. TRANSFORMACION DE E. COLI HB 101 CON LAS CLONAS-
DE PBR322-MC Y PBR322-GS.**

Se decidió antes de correr un gel de agarosa para determinar la concentración de las clonas, una transformación de la cepa de E.Coli HB101 con las dos clonas obtenidas, la transformación se realizó en base a la técnica de transformación (ver anexo no.1), y en forma inmediata se realizó la extracción del DNA de base a la técnica de extracción de plásmidos (ver anexo no.3).

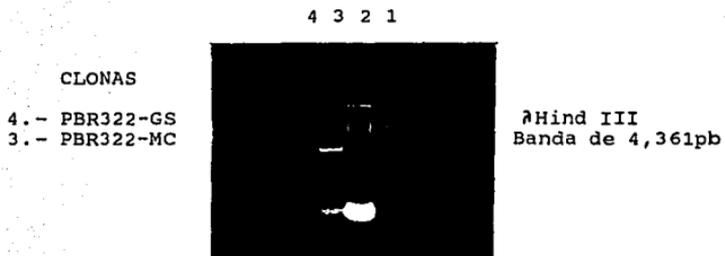
El DNA de las dos clonas se limpió por precipitación y fué disuelto en 30 mcl de TE 1X.

**8.4.2. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS CLONAS DE -
PBR322-MC Y PBR322-GS**

TABLA NO. 18

MUESTRA	VOL.MTRA	VOL.EB	VOL. H2O
1.- λ Hind III	3 MCL	5 MCL	12 MCL
2.- PBR322 S/DRA I	3 MCL	5 MCL	12 MCL
3.- PBR322-MC	5 MCL	5 MCL	10 MCL
4.- PBR322-GS	5 MCL	5 MCL	10 MCL

FIGURA NO. 18



La concentración estimada para la clona PBR322-MC es de 70 ng/mcl y para la clona PBR322-GS es de 50 ng/mcl.

8.4.3. ANALISIS.

El método de TAILING consiste en la incorporación de bases adenina, timina, citosina y guanina, debido a que la enzima DRA I sobre el plásmido PBR322 y los kDNA's origina extremos rasurados, los cuales se suponía en teoría serían fácilmente ligados por la T4 ligasa no ocurrió realmente así, después de cuatro intentos de tratar de ligar el vector PBR322 digerido con la enzima DRA I y los kDNA's de MC y GS con la enzima T4 ligasa se decidió cambiar o seleccionar otro método.

Por el método de Tailing serían incorporadas las bases citosina a los kDNA's de MC y GS y bases guanina al vector digerido con la enzima DRA I, una vez teniendo ambos elementos tailleados en presencia de un buffer annealing e incubados a 37 grados por cuatro horas tendríamos la unión del vector PBR322 y los kDNA's de MC y GS formando así las clonas.

Se decidió antes de correr un gel de agarosa normal, la transformación de las bacterias de E. Coli HB101 en forma separada con las clonas de MC y GS, esto con la finalidad de ya no perder más DNA del vector y de los kDNA de MC y GS, es bien cierto que la probabilidad de que hubiera formación de la clona y de que no la hubiera es la misma, pero el hecho de contar con la incorporación de bases que podrían formar fácilmente un nuevo enlace hacia un poco más fácil la formación de la clona.

Al observar la figura no. 18 en los carriles no. 3 y 4 que pertenecen a la clona de PBR322-MC y PBR322-GS respectivamente corresponden al mismo avance mostrado por la banda del marcador

de pesos moleculares λ Hind III, por lo que por comparación se puede decir que el peso molecular de las bandas de las clonas es de 4,361 pb, también se cálculo que la concentración de las clonas es de 70 ng/ml para la clona de PBR322-MC y 50 ng/ml de la clona de PBR322-GS de ambas clonas se cuenta con un volumen total de 30 ml.

La prueba definitiva sin duda alguna sería la secuenciación de las clonas para definir exactamente el número de pares de pares de bases, las semejanzas entre las dos clonas y si realmente se trata de dos clonas o es solo una, esto por la semejanza en los kDNA's de las Leishmanias.

Para la secuenciación fueron enviadas las siguientes muestras : Las clonas de PBR322-MC y PBR322-GS, Plásmido PBR322 sin digerir, Muestras de kDNA de MC y GS, todas las muestras en las mejores condiciones de pureza.

Las muestras para secuenciación fueron enviadas a DIJANE WIRTH quien hasta este momento había realizados los mayores estudios en Leishmania y contaba con cepas bien definidas y con patrones electroforéticos bien conocidos.

La conclusion del estudio fué, que las clonas diferían solo en tamaño 30 pares de bases siendo mayor la clona de PBR322-MC y la secuencia entre los dos fragmentos de kDNA eran distintos entre sí tratándose de dos fragmentos de kDNA diferentes pero la muestra enviada no fué la suficiente por lo que requirían una muestra mayor para un segundo estudio que serviría de apoyo a lo anterior.

Fueron enviados nuevamente muestras de las clonas de - PBR322-MC, PBR322-GS, PBR322 y kDNA's de MC y GS y además le fueron pedidas a DIJANE WIRTH muestras de Leishmania l. mexicana, - la cual sería usada como referencia en los estudios posteriores para comprobar la especificidad de la sonda.

La respuesta final del estudio especifica que los fragmentos de kDNA clonados en el vector PBR322 corresponden o se asemejan en número de pares de bases y secuencia a las muestras de kDNA's de MC y GS enviadas para comparación.

9.0.- DISCUSION.

Por los problemas encontrados durante la fase inicial de la etapa experimental referente a la identidad de cepas bacterianas y plásmidos es recomendable, hacer un análisis previo de reconocimiento tanto de la cepa de E.COLI HB101* y del plásmido PBR322 aún cuando se hayan reportado en buenas condiciones de uso, y evitar se perdiera tiempo en reanálisis durante la etapa experimental.

Respecto a los posibles cambios que pudo haber sufrido la cepa de E.COLI HB101, después de los pases rutinarios sin previo reconocimiento, se consideran, mutaciones a nivel de las enzimas propias de E.COLI que degradan el PBR322, si es que este ha logrado penetrar o bien mutaciones a nivel de la membrana de la E.COLI lo cual dificulto la entrada del plásmido, en un caso comparativo de transformación realizado en la escuela nacional de ciencias biológicas de IPN, en el departamento de bioquímica, los resultados fueron semejantes obligandolos a realizar estudios adicionales sobre E.COLI y PBR322, por estas razones consideramos viables y provechosos los cambios en cuanto a el uso de las muestras de E.COLI HB101* y (donada por el IPN) y PBR322 (donado por el INDRE), y de tomar la eficiencia de transformación como la prueba definitiva para la diferenciación entre las dos cepas con las que se contaba de E.COLI HB101+ y HB101*.

Al intentar la cuantificación y calidad de las extracciones de PBR322 una de las variables importantes era; contar con las muestras que servirían de referencia en buen estado, en este

caso se habla de las muestras de PBR322 digeridas con DRA I, en algún tiempo atras aproximadamente 5 meses antes de iniciar el proyecto el plasmido PBR322 había sido utilizado como referencia en otro proyecto en el cual ya mostraba cierta degradación al momento de ser utilizado electroforéticamente como referencia.

Cuando se analizan las fotografías tomadas a los geles de agarosa estos presentan una resolución no muy buena respecto al grado de definición de las bandas, cabe hacer mension que la agarosa utilizada para estos geles era donada a veces por el departamento de Virología o por el departamento de Inmunología, esto por falta de presupuesto del departamento de genética molecular.

Haciendo énfasis en la fotografía o figura no. 11, en la extrema derecha carriles 7, 8, y 9 aparecen unas muestras del plásmido PBR322, las cuales reflejan un patrón electroforético en el cual las bandas no tienen muy buena separación entre si, esto pone de manifiesto que para la separación adecuada de las bandas se necesitan geles de agarosa no mayores al 1.0 % en concentración, en donde al parecer el más adecuado a nuestro proyecto es el 0.8 % en concentración ya que a esta se favorece muy bien la separación de las bandas en las muestras así como de los marcadores de peso molecular, ya que en ambos las bandas de nuestro interés tienen peso molecular no mayor a las seis mil (6,000) pares de bases.

Una vez determinada la concentración y calidad del plásmido PBR322f' extraído de E. COLI HB101*, se decidió para obtener la banda de nuestro interés usar un gel LMP que facilitaría en gran parte la extracción de la banda deseada, esto porque los ge-

les de agarosa LMP favorecen una mayor separación de las bandas de peso molecular bajo, al referirnos a este tipo de geles como se aprecia en la figura no. 13 la banda de interes que tiene un peso molecular de 4,363 pb posee una muy buena separación no habiendo banda alguna que pudiera interferir, considerando las características que presentarian los patrones electroforéticos de las muestras en el gel de agarosa a diferente concentración, debería de elegirse ahora que ya se tiene la banda de PBR322f' que sería nuestro vector un gel de agarosa cuya concentración permitiera una muy buena separación de las bandas de los marcadores de peso molecular, en donde la concentración que favoreció este fin fué la agarosa al 0.8 % en concentración.

Se considero que los posibles restos fosfato que existieran en los extremos rasurados del vector PBR322f' digerido con la enzima DRA I podrian interferir en la ligación de el vector PBR322 y los kDNA's de los minicírculos de *Leishmania* con la T4 DNA ligasa, por lo que se decidió tratar solo al vector con la enzima BAP, como se observa en la figura no.14, en los carriles 4 y 5, no hay una gran diferencia entre el avance electroforético de la banda de 4,363 pb tratada no tratada con BAP y la banda del mismo peso molecular tratada con BAP respectivamente, esto debido a que la cantidad de restos fosfato es mínima comparada con el tamaño en pares de bases del vector.

Al contar tambien con los kDNA's de MC y GS cuantificados y en muy buena calidad, y sabiendo ademas que corresponden realmente al fragmento de kDNA donde se encuentra la secuencia de pares de bases que regula o que controla que las especies de

un mismo género se comporten de manera diferente, como en el caso de MC y GS, donde ambas muestras pertenecen al mismo género que es *Leishmania l. mexicana* diferenciadas solo por su localización como localizada o diseminada.

El análisis numérico de los resultados de los Rf's que corresponden al patrón electroforético del kDNA de MC Y GS, comparandolas con el marcador de pasos moleculares X 174, cuyos datos de Rf sirvieron para la curva de calibración de donde fueron calculados los valores de pares de bases para los Rf's de las bandas del patrón electroforético de MC y GS, reflejan que realmente contamos con el kDNA de las muestras de MC Y GS.

Como se observa en la figura no. 18, la cual corresponde a la clonación de los fragmentos de kDNA de MC y GS con el vector PBR322 por el método de Tailing las bandas que aparecen en los carriles 4 y 3 pertenecen a las clonas : PBR322-GS y a PBR322-MC respectivamente y se encuentran a concentraciones diferentes, si comparamos el peso molecular de estas bandas con la última banda del marcador de pesos molecular de 5,300 pb, cabe mencionar que las clonas de PBR322-GS y PBR322-MC, antes de correrse electroforéticamente transformaron a las células de E.Coli HB101*, esto apoya aún más el hecho de que se cuenta realmente con un DNA clonado de *Leishmania l. mexicana* (kDNA) a un vector que es PBR322.

10.- CONCLUSIONES.

A.- El crecimiento de los parásitos de *Leishmania l. mexicana*, es favorecido en cantidad y calidad en el medio RPMI modificado, el cual es enriquecido con sangre completa.

B.- La extracción y digestión del plásmido PBR322 es facilitado con el uso de reactivos de preparación no mayor a 24 horas.

C.- Las dificultades encontradas durante las transformaciones de la cepa HB101, se deben realmente a posibles cambios en la membrana de E.COLI HB101 o bien a la modificación de las enzimas citoplasmáticas de la misma.

D.- La formación de la clona entre el vector PBR322 y los kDNA's de MC Y GS de *Leishmania l. mexicana* es más recomendable por el método Tailing que por el uso de T4-DNA ligasa.

E.- La dificultad en la ligación de el vector PBR322 y los kDNA's de MC y GS pudiera radicar en la falta de extremos pegajosos para ser ligados con T4 DNA ligasa.

F.- Se logró la construcción de las dos clonas de PBR322 con el kDNA de MC y GS los cuales en el análisis de secuencia resultarán ser diferentes en tamaño y secuencia pero similares a los estándares de referencia de MC y GS.

G.- No se logró la comprobación de la especificidad de la sonda construida debido a la falta de recursos económicos por parte del departamento de genética molecular.

ANEXOS NO.1

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES CON CaCL₂

- 1.- Crecer la bacteria en medio luria sin antibiótico, incubar a 37 grados centígrados.
- 2.- Incubar 100 ml de medio luria con 1 ml de cultivo bacteriano-recientemente crecido (del paso 1).
- 3.- Crecer la bacteria con agitación a 37 grados hasta una densidad óptica de 5×10 Cell/Min.
- 4.- Monitorear la D.O. cada 30 minutos.
- 5.- A la D.O. óptima, en esterilidad se pasan las células en tubos en hielo.
- 6.- Dejar en hielo por 30 minutos.
- 7.- Centrifugar a 3 000 rpm por 15 min.
- 8.- Decantar y dejar en posición invertida los tubos por 1 min. - dejar escurrir.
- 9.- Resuspender cada paquete en 10 ml de CaCL₂ 0.1 M frío.
- 10.- Dejar en hielo por 15 min.
- 11.- Centrifugar a 3 000 rpm por 15 min.
- 12.- Decantar y dejar en posición invertida por 1 min.
- 13.- Resuspender el paquete en 2 ml de CaCL₂ 0.1 M frío por cada- 50 ml de cultivo original.
- 14.- Se pueden almacenar las células a 4 grados centígrados en CaCL₂, la eficiencia de transformación incrementa de 4 a 6 vrces- durante las primeras 12 - 24 horas de almacenamiento.

TRANSFORMACION.

- 1.- Adicionar a 200 mcl de Células competentes, 10 mcl (500 ng) -- de kDNA ligado.
- 2.- Reposar en hielo por 30 min.
- 3.- Dar choque térmico a 42 grados centígrados por 90 seg. no mover los tubos.
- 4.- Transferir rápidamente los tubos a hielo por 1 a 2 min.
- 5.- Adicionar 800 mcl de medio luria e incubar 45 min. a 37 gra - dos centígrados.
- 6.- Plaquear 200 mcl de transformantes por placa de agar de luria con tetraciclina como antibiótico.

ANEXO NO. 2

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES CON CaCl₂ MODIFICADA.

- 1.- Hacer una dilución 1:25 de un cultivo de toda la noche en caldo luria fresco sin antibiótico y crecer a la temperatura adecuada hasta que tenga una D.O. de 600 nm.
- 2.- Centrifugar 20 ml de cultivo a 6,500 rpm por 5 min, desechar el sobrenadante.
- 3.- Añadir 10 ml de Tfm 1, mezclar suavemente, centrifugar a 6,500 rpm por 5 min, desechar el sobrenadante.
- 4.- Agregar 10 ml de Tfm 2 frío, reposar 45 min en hielo, centrifugar a 3,500 rpm, aspirar el sobrenadante.
- 5.- Agregar Tfm 3, 2 ml, resuspender suavemente.

Tfm 1: Tris-Hcl pH 7.5	10.0 mM
Nacl	0.15 mM
Tfm 2: CaCl ₂	50.0 mM
Tfm 3: Tris-Hcl pH 7.5	10.0 mM
Cacl ₂	50.0 mM
MgSO ₄ .7 H ₂ O	10.0 mM

ANEXO NO. 3

EXTRACCION DE PLASMIDOS.

1.- Centrifugar el medio de cultivo y resuspender el paquete bacteriano en 2 ml de SSC 1X.

2.- Agregar 10 ml de:

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA	10 mM
Lisozima	5 mg/ml

Dejar a temperatura ambiente durante 5 min.

3.- Agregar 20 ml de una solución recién preparada de:

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Dejar en hielo durante 10 min.

4.- Agregar 15 ml de una solución enfriada en hielo, agregar una solución de acetato de potasio que se prepara:

CH ₃ -COOK	5 M	60.0 ml
CH ₃ -COOH	Glacial	11.5 ml

Ajustar el pH a 4.8 con HCl fumante y aforar a 100 ml con agua, dejar en hielo por 10 min.

5.- Centrifugar a 12,000 rpm (15,000 g)/25 min/4 grados.

6.- Transferir el sobrenadante a otro frasco y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclar bien y dejar a temperatura ambiente durante 15 min.

7.- Centrifugar a 12,000 rpm (15,000 g)/25 min/4 grados.

8.- Decantar el sobrenadante, evaporar el solvente, lavar con etanol al 70 % frío y centrifugar a 12,000 rpm (15,000 g)/10 min.

9.- Decantar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspender en 2 ml de TE 1X.

10.- Agregar 200 μ l de RNAsa (10 mg/ml) e incubar a 37 grados -
por 1 hora.

11.- Verificar la calidad y cantidad del plásmido en un gel de-
agarosa al 0.8 %.

PURIFICACION DE MINICIRCULOS.

- 1.- Colectar los parásitos de preferencia en fase logarítmica y - centrifugarlos 15 min. a 3,000 rpm.
- 2.- Lavarlos con SSC 1X y transferirlos a tubos de eppendorf.
- 3.- Lisarlos con una solución que contenga:

SDS	1 %	o	SDS	2%
EDTA	2.0 mM	o	EDTA	50.0 mM
Tris-Hcl	0.5 mM			pH 6.8
- 4.- Añadir 500 mcg (300 mcg/ml) de proteínasa k y dejarlos incu - bando a 55 grados de 2 - 3 horas.
- 5.- Pasar las muestras por jeringas de insulina con aguja de 21 - a 23 varias veces.
- 6.- Centrifugar en microfuga de 30 a 60 min.
- 7.- Colectar la pastilla y lavarla con TE varias veces durante - 30 min en microfuga.
- 8.- Resuspender la pastilla en 70 mcl de H2O y añadir:
 - 10 mcl de Buffer 10X Dra I
 - 10 mcl de Spermidina 20 mM
 - 10 mcl de Enzima (Dra I 5 u/ mcl) en dos pasos.
 Incubar a 37 grados por 3 horas después de la segunda adi - ción de enzima.
- 9.- Verificar la digestión en un gel de agarosa al 0.8 % en con - centración.
- 10.- Purificar de ser necesario los minicirculos de kDNA de Leish mania en LMP agarosa al 1.5 % en concentración.

ANEXO NO. 5

PURIFICACION CON ETANOL.

- 1.- Para un volumen de muestra de DNA agregar medio volumen de - acetato de amonio 7.5 M y dos volúmenes de etanol.
- 2.- Dejar reposar 30 min en hielo seco.
- 3.- Centrifugar 15 min.
- 4.- Decantar el sobrenadante y dejar en posición invertida por - 3 min.
- 5.- Lavar la pastilla con etanol al 70 %, realizar dos lavados.
- 6.- En cada lavado centrifugar de 5 - 8 min en eppendorf.
- 7.- Resuspender la pastilla en TE o H₂O.

ANEXO NO. 6

PURIFICACION CON FENOL-CLOROFORMO-ISOAMILICO.

- 1.- Extraer con un volumen de fenol por cada volumen de muestra -
- 2.- Centrifugar 15 minutos.
- 3.- Extracción con fenol-cloroformo volumen a volumen con la muestra.
- 4.- Centrifugar por 10 min.
- 5.- Extracción con cloroformo-isoamilico volumen a volumen con la muestra.
- 6.- Centrifugar por 10 min.
- 7.- Adicionar un volumen de acetato de amonio 5 M o bien 0.2 volu-
menes de acetato de sodio 2.5 M.
- 8.- Adicionar al mismo tubo 2 volúmenes de etanol absoluto.
- 9.- Centrifugar 15 min a 4 grados.
- 10.- Lavar con etanol al 70 % - 80 %.
- 11.- Resuspender en 10 mcl de TE.

ANEXO NO. 7

RECUPERACION DE DNA DEL GEL DE AGAROSA.

- 1.- Cortar el gel de agarosa que contenga el fragmento de DNA.
- 2.- Triturar el gel de agarosa con una punta de micropipeta.
- 3.- En una punta de una micropipeta colocar un trozo pequeño de algodón por la parte interna, adicionar entonces los trozos del gel de agarosa.
- 4.- Colocar la punta de la micropipeta con el gel dentro de un tubo eppendorf 5 min en nitrógeno líquido.
- 5.- Centrifugar el eppendorff 5 min.
- 6.- El DNA pasará al tubo eppendorf.
- 7.- Checar la recuperación de DNA en un gel de agarosa.

ANEXO NO. 8

PREPARACION DE GELES DE AGAROSA.

Volumen (ml)	300	150	100	50
Agarosa (g)	2.4	1.2	0.8	0.4
TAE 50X (ml)	6.0	3.0	2.0	1.0
EB (10 mg/ml) en ml	15	7.5	5.0	2.5

ANEXO NO. 9

PREPARACION DE BUFFERS.

Volumen (ml)	2,000	1,000	500	250
TAE 50X (ml)	40	20	10	5
EB (10 mg/ml) en ml	100	50	25	12.5
H2O c.b.p.	2,000	1,000	500	250

ANEXO NO. 10

PREPARACION DE BUFFERS

BUFFER TAE (TRIS ACETATO) : Para un litro de solución stock a una concentración 50X.

- a).- 242 g Tris base
- b).- 57.1 ml CH₃COOH Glacial
- c).- 100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)

BUFFER TPE (TRIS FOSFATO) : Para un litro de solución stock a una concentración 10X.

- a).- 108 g Tris base
- b).- 15.5 ml CH₃COOH Glacial
- c).- 40 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)

BUFFER TBE (TRIS BORATO) : Para un litro de solución stock a una concentración 5 X.

- a).- 54 g Tris base
- b).- 27.5 g Acido Borico
- c).- 20 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)

BUFFER TE (TRIS EDTA) : Para un litro de solución stock a una concentración 1 X.

- a).- 121.1 g Tris base, ajustar a pH - 8.0, con 42 ml de HCl conc.
- b).- 372.2 g EDTA. 2 H₂O, ajustar a - pH 8.0 con NaOH.

ANEXO NO. 11

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA E. COLI HB101
Y LEISHMANIA.

E. COLI HB101:

CALDO LURIA (CON O SIN ADICION DE ANTIBIOTICO)

Ingredientes por litro

Bacto beef extract	3.0 g
Bacto peptone	5.0 g
Bacto lactosa	5.0 g
ajusta pH a 6.9 a 25 grados centígrados	

AGAR LURIA (CON O SIN ADICION DE ANTIBIOTICO)

Ingredientes por litro

Bacto beef extract	3.0 g
Bacto peptone	5.0 g
Bacto lactosa	5.0 g
Bacto agar	2.0 g
ajustar pH 7.0 a 25 grados centígrados	

CONCENTRACION DE ANTIBIOTICO.

TETRACICLINA : 30 MG/MCL

AMPICILINA : 40 MG/MCL

ANEXO NO. 12

PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO PARA LEISHMANIA

MEDIO DE SENEKJIE.

Bacto - beef	5.0 g
H2O destilada	200 ml

Hervir y filtrar filtrar con papel Wathman no. 42, llevar al volumen original y añadir:

Bacto - peptona	4.0 g
Bacto - agar	6.0 g
NaCl	1.0 g

Ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con NaOH, esterilizar en autoclave agregar sangre completa al medio 10 - 13 %.

MEDIO RPMI - 1640.

- 1.- Medir aproximadamente 900 ml de agua destilada y desionizada en un matas.
- 2.- Añadir el contenido de un sobre de medio al agua a una temperatura de 15 - 30 grados centígrados.
- 3.- Agitar suavemente hasta que se disuelva el polvo por completo.
- 4.- Diluir al volumen de 1000 ml.
- 5.- Ajustar el pH con NaOH o HCL dependiendo del valor inicial obtenido, esterilizar por millipore (0.22 micrometros) y distribuir en frascos estériles de 100 ml, guardar hasta su uso a 4 grados centígrados.

SOLUCION DE LOCKE.

NaCL	9.0 g
CaCL	0.2 g
KCL	0.4 g
Bicarbonato de Sódio	0.2 g
Glucosa	2.5 g
H2O destilada	1.0 lt

ANEXO NO. 13

CALCULO PARA LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACION.

PRIMERA TRANSFORMACION :

- 1.- VOLUMEN DE CELULAS TRANSFORMANTES ESPREADAS POR CAJA DE AGAR-LURIA CON ANTIBIOTICO (VC).
- 2.- NUMERO DE COLONIAS CONTADAS POR 100 MCL DE MUESTRA DE CELULAS TRANSFORMANTES.
- 3.- EFICIENCIA DE TRANSFORMACION.

CALCULOS.

1.- VOLUMEN ESPREADO - 100 MCL

2.- NUMERO DE COLONIAS - 230 COL

$$\begin{aligned} \text{NO. COLONIAS POR ML} &= (230 \text{ COL}) (1,000 \text{ MCL}) / (100 \text{ MCL}) \\ &= 2,300 \text{ COL/ML} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{NO. COLONIA POR MICROGRAMO DE PBR322} \\ &= (2,300 \text{ COL}) (1,000 \text{ NG}) / (200 \text{ NG}) \\ &= 1.15 \times 10 \end{aligned}$$

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Adler, S. "DIFERENTIATION OF LEISHMANIA BRASILIENSIS FROM L. - MEXICANA AND L. TROPICA". Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop. Méx. - 23, 3 y 4 : 139 - 152.
- 2.- Aguirre, A., Biagi F., Hernández A., "SEGUNDO CASO AUTOCTONO- DE KALA-AZAR EN MEXICO (LEISHMANIASIS VICERAL)". Biol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1963; 20: 317 - 333.
- 3.- Aguilar, C., Rangel, E. and Deane, L. M. "CUTANEAUS LEISHMA - NIASIS IS FRECUENT IN EQUINES FROM AN ENDEMIC AREA IN RIO DE JA - NEIRO, BRAZIL". Mem. Int. Oswaldo Cruz. 1986; 81(2), 471 - 472.
- 4.- Alexander, J. and Russel, D.G. "PARASITE ANTIGENS, TREIR RU - LE IN PROTECTION, DIAGNOSIS AND ESCAPE: THE LEISHMANIASES". Cu - rent Topics in Microbiology and Immunology. 1985; 120: 43 - 62.
- 5.- Anón, B. "THE LEISHMANIASIS: REPORT OF WHO-EXPERT COMITEE". - WHO- Technical Report Series. 1984; 701:140.
- 6.- Anthony, R., Grigi, Max., Sacci, J. "RAPID DETECTION OF LEISH - MANIA AMASTIGOTES IN FLUID ASPIRATES AND BIOPSIES OF HUMAN TISSUE". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 37(2): 271 - 276.
- 7.- Arnot, D. and Barker, D. "BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF CUTA - NEUS LEISHMANIASIS BY ANALYSIS OF KINETOPLAST DNA. II. SEQUENCE - HOMOLOGIES IN LEISHMANIA KDNA". Molecular and Biochemical Parasit - ology. 1981; 3: 47 - 56.
- 8.- Ashford, D., Badaro, R., Conceicao, E. at all "STUDIES ON THE CONTROL OF VICERAL LEISHMANIASIS: VALIDATION OF THE FALCON ASSAY- SCREENING TEST-ENZIME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (FAST ELISA) FOR FIELD DIAGNOSIS OF CANINE VICERAL LEISHMANIASIS". Am. J. Trop. - Med. Hug. 1993; 48(1): 1 - 8.
- 9.- Azadeth, B. "LOCALIZED LEISHMANIA LYMPHADENITIS: A LIGHT AND- ELECTRON MICROSCOPIC STUDY". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1985; 34(3): - 447 - 455.
- 10.- Badaro, R. and Johnson W. "THE RULE OF INTERFERON- IN THE - TREATMENT OF VICERAL AND DIFUSE CUTANEUS LEISHMANIASIS" The jour - nal of infectious diseases. 1985; 167(1): 513 - 517.
- 11.- Barragan, I. "LEISHMANIASIS EN LAS AMERICAS". 1989; 39(2): - 14 - 16.
- 12.- Barral, A. et all. "ISOLATION OF LEISHMANIA MEXICANA AMAZO - NENSIS FROM THE BONE MARROW IN A CASE OF AMERICAN VISCERAL LEISH - MANIASIS". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1986; 35(4): 732 - 734.
- 13.- Barral-Nettob et al. "DESTRUCTION OF LEISHMANIA MEXICANA - AMAZONENSIS PROMASTIGOTES BY NORMAL HUMAN SERUM". Am. J. Trop. - Med. Hyg. 1987; 37(1): 53 - 56.

- 14.- Baez, J. R., J. y Rojas, E. "PRESENTACION DE UN CASO DE KALA-AZAR". Rev. Invest. Clin. México. 1952; 4: 5758.
- 15.- Beltran, E. y Bustamante M. "DATOS EPIDEMIOLOGICOS ACERCA - DE LA ULCERA DE LOS CHICLEROS (LEISHMANIASIS AMERICANA) EN MEXICO". Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 1942; 1(3): 1 - 28.
- 16.- Beltran, E., Bustamante, M. "DATOS EPIDEMIOLOGICOS DE PALUDISMO Y LEISHMANIASIS EN EL VALLE DEL USUMACINTA". Rev. Inst. Sa lubr. Enf. Trop. 1943; 2: 89 - 94.
- 17.- Biagi, F., R., de Biagi. "EL KALA-AZAR EN MEXICO: PROBLEMA- ECOLOGICO POR ESTUDIAR". Rev. Salubr. Enf. Trop. (Mex). 1965; - 25: 3 - 12.
- 18.- Biagi, F. y Tay. J. "OBSERVACIONES SOBRE UN NUEVO FOCO ENDE- MICO DE KALA-AZAR EN MEXICO". Rev. Fac. Med. 1963; 5: 7 - 11.
- 19.- Biagi, F., De B., A.M., Beltrán, F. "PHEBOTOMUS FLAVISCUTE - LATUS TRANSMISOR NATURAL DE LEISHMANIA MEXICANA". Pren. Med. Mexi cana. 1965; 9(12): 267 - 272.
- 20.- Biagi, F. "SINTESIS DE 70 HISTORIAS CLINICAS DE LAISHMANIA - SIS TEGUMENTARIA EN MEXICO (ULCERA DE LOS CHICLEROS)". Rev. Med.- Mex. 1953; 33(682): 385 - 396.
- 21.- Biagi, F. "ALGUNOS COMENTARIOS SOBRE LA LEISHMANIASIS Y SUS- AGENTES ETIOLOGICOS. LEISHMANIA TROPICA MEXICANA, NUEVA SUBESPE - CIE". Rev. Med. Mex. 1953; 33(683): 401 - 406.
- 22.- Biagi, A.M., Biagi, F. Y Melinaii, J.L. "KALA-AZAR EN MEXICO ANTROPOFILIA Y ACTIVIDAD HORAI CA DE PHLEBOTOMUS LONGIPALPIS LUTZ" Rev. Salubr. Enfer. Trop (Mex). 1912; 25(2): 13 - 19.
- 23.- Biagi, A. M., Biagi, F. y Beltrán, F. "PHLEBOTOMUS FLAVISCU- TELLATUS, TRANSMISOR NATURAL DE LEISHMANIA MEXICANA". Prensa Med. Mex. 1965; 30: 267 - 272.
- 24.- Biagi, A.M., Biagi, F. y Beltrán, F. "NUEVOS CONOCIMIENTOS - SOBRE LOS FLEBOTOMOS DEL AREA ENDEMICA DE LEISHMANIASIS CUTANEA - EN YUCATAN". Rev. Invest. Salud Publ. (Mex). 1966; 26(2): 139 - 153.
- 25.- Blank, C., Funcs, et all "PARASITISM OF EPIDERMAL LANGERHANS CELLS IN EXPERIMENTAL CUTANEUS LEISHMANIASIS WITH LEISHMANIA MA - JOR". The Journal of Infectious Diseases. 1993; 167: 418 - 425.
- 26.- Blum, J.J. "INTERMEDIARY METABOLISM OF LEISHMANIA". Patology Today. 1993; 9(4): 118 - 122.
- 27.- Bryce, C.W. y Col. "LA PRUEBA DOT-ELISA PARA LA DETECCION - DE LA LEISHMANIASIS VICERAL EN HONDURAS". Boletín de la Oficina - Sanitaria Panamericana. 1987; 102(1): 19 - 27.
- 28.- Carrada-Bravo, T. "LEISHMANIASIS IN CHILDREN. RECENT PRO - GRESS". Bol. Med. Hosp. Infant Mex. 1984; 41: 356 - 362.

- 29.- Carrada-Figueroa, Perales, S. et all "LEISHMANIASIS CUTANEA EN EL ESTADO DE TABASCO". Mem. Cong. Internal. Infec. Mex. 1990.
- 30.- Carrada, F. G., León, R. et all "LEISHMANIASIS CUTANEA EN LA POBLACION INFANTIL DEL ESTADO DE TABASCO. IX JORNADAS DE PEDIATRIA". Hosp. Infant. Mex. 1990.
- 31.- Chance, M.I. "THE SIX DISEASE OF WHO. LEISHMANIASIS". Br. Med. J. 1981; 283: 1245 - 1247.
- 32.- Coperland, H.W., Arana, B.A. and Navin, T. "COMPARATION OF ACTIVE AND PASSIVE CASE DETECTION OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN GUATEMALA". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 43(3): 257 - 259.
- 33.- Convit, J. and Kerdel, V.F. "DISSEMINATED CUTANEOUS LEISHMANIASIS". Arch. Derm. Mex. 1965; 91(5): 439 - 447.
- 34.- Convit, J., Ulrich, M., Aranzazu, N. et all "MODELO DE VACUNACION USANDO DOS GERMENES Y SU APLICACION EN ENFERMEDADES TROPICALES (LEPRA Y LEISHMANIASIS)". Seminario Bolivar. Control de Lepra. OPS. 1983.
- 35.- Delgado, O., Castes, M., Clinton, W. et all "LEISHMANIA COLOMBIENSIS IN VENEZUELA". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1993; 48(1): 145 - 147.
- 36.- Diaz-Najera, A. "PRESENCIA DE LUTZOMYA DIABOLICA EN MUZQUICOAHUILA MEXICO (DIPTERA-PSYCHODIDAE)". Rev. Invest. Salud Pùb. - 1971; 31: 62 - 66.
- 37.- Eileen, D., Rowton, E. et all "DETECTION AND ENUMERATION OF LEISHMANIA SAND FLIES USING AGAR-BASED MEDIA". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 37(3): 516 - 519.
- 38.- Eileen, D., Lucas, C. et all "DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS ACQUIRED IN PERU". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 43(3): 260 - 262.
- 39.- El-Razi, Z.M. "AN INTRODUCTION TO THE HISTORY OF MEDICINE - IN ISLAM AND IRAN". Med. J. Islamic Rep. Iran. 1988; 2: 131 - 136
- 40.- García, M.R., Andrade, F., Esquivel, V. R. et all "LOCALIZED CUTANEOUS LEISHMANIASIS (CHICLERO'S ULCER) IN MEXICO: SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ELISA FOR IgG ANTIBODIES TO LEISHMANIA MEXICANA MEXICANA". Trans. of The Royal Society of Trop. Med. Hyg. 1990 84: 356 - 358.
- 41.- García, M.F. "PANORAMA EPIDEMIOLOGICO DE LA LEISHMANIASIS EN TABASCO". Bol. SSP-Tabasco, Méx. 1983-1989.
- 42.- Garnham, P.C. and Bird, R.G. "A PRELIMINARY STUDY OF THE FINE STRUCTURE AS SEEN UNDER THE ELECTRON MICROSCOPE". Sci. Rep. - Int. Super Sanit. 1962; 2: 76 - 82.

43.- Garnham, P.C. "CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE NEW WORLD WITH SPECIAL REFERENCE TO LEISHMANIA MEXICANA". Sci. Rep. Int. Super - Sanit. 1962; 2: 76 - 82.

44.- Ghatak- S., Roy, S. and Ghosh, D.M. "ISOLATION AND PARTIAL - CHARACTERIZATION OF ANTIGEN FROM LEISHMANIA DONOVANI PROMASTIGOTES AND IT'S POSSIBLE USE IN SERODIAGNOSIS". The Indian Journal - of medical Research. 1982; 76(7): 164 - 173.

45.- Grimaldi, G. Jr. Tesh., R.B. and McMahon-Pratt, D. "A REVIEW OF THE GEOGRAFIC DISTRIBUTION AND EPIDEMIOLOGY OF LEISHMANIASIS - IN THE NEW WORLD". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 41(6): 687 - 725.

46.- Grimaldi, G. Jr., Tesh, R. B. and McMahon-Pratt, D. "IDENTIFICATION AND DISTRIBUTION OF NEW WORLD LEISHMANIA SPECIES CHARACTERIZED BY SERODEM ANALYSIS USING MONOCLONAL ANTIBODYS". Am. J. - Trop. Med. Hyg. 1987; 36(2): 270 - 287.

47.- Gutiérrez, E. "LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA. PRIMER CASO DE - INVASION DE LA MUCOSA DIAGNOSTICADO EN MEXICO". Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. Méx. 1989; 19: 129 - 134.

48.- Godson, G. and Vapnek, D. "A SIMPLE METHOD OF PREPARING LARGE AMOUNTS OF X 174 RFI SUPERCOILED DNA". Biochemica and Biophysica Acta. 1973; 299: 516 - 520.

49.- Graham, F. M. "CELLULAR AND MOLECULAR ASPECTS OF HOST-PARASITE RELATIONSHIPS". Progress in Immunology. 1986; VI: 799 - 807.

50.- Gustafson, T. L. et all "HUMAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS ACQUIRED IN TEXAS". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1985; 34(1): 58 - 63.

51.- Hanham, C.A., Shaw Jeffery and McMahon-Pratt, D. "PRODUCTION- AND SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY FOR THE IDENTIFICATION OF LEISHMANIA VENEZUELENSIS". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 42(5): 453 - 459.

52.- Hashiguchi, Y., Gómez, L., et all "NATURAL INFECTIONS WITH - PROMASTIGOTES IN LEISHMANIASIS ENDEMIC AREAS OF ECUADOR". Am. J. - Trop. Med. Hyg. 1985; 34(3): 440 - 446.

53.- Hahiguchi, Y., Gómez E., Eduardo, A. et all "CORRELATES OF - LEISHMANIA SPECIFIC IMMUNITY IN THE CLINICAL SPECTRUM OF INFECTION WITH LEISHMANIA MEXICANA AND L. MAJOR-LIKE PARASITES". Am. - J. Trop. Med. Hyg. 1991; 44(2): 205 - 217.

54.- Hobart-Hernandez, O., Perez-Perez, H. y Carrada figueroa, G. - "CARACTERISTICAS CLINICO EPIDEMIOLOGICAS DE LA LEISHMANIASIS CUTANEA EN LA REGION DE LA CHONTALPA". Mem. Cong. Nal. Microbiol. - Acapulco, Gro. Méx. 1991.

55.- Holaday, B. J., Lima, M. M., Thomas, E. et all "CORRELATES - OF LEISHMANIA-SPECIFIC IMMUNITY IN THE CLINICAL SPECTRUM OF INFECTION WITH LEISHMANIA CHAGASI". The Journal of Infectious Diseases 1993; 167: 411 - 417.

56.- Holmes D. and Quigley M. "A RAPID BOILING METHOD FOR THE - PREPARATION OF BACTERIAL PLASMIDS". Analytical Biochemistry- 1981; 114: 193 - 197.

57.- Ivo Dos Santos, J., Morgado, M. and Galvao, C. "HUMAN VISCE RAL LEISHMANIASIS: ANALYSIS OF THE SPECIFICITY OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO POLYPEPTIDES OF LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 37(2): 263 - 270.

58.- Jackson, P., Wohl nieter, J., Jackson, J., et all "RESTRIC - TION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF LEISHMANIA KINETOPLAST DNA CHARAC TERIZES PARASITES RESPONSIBLE FOR VICERAL AND CUTANEOUS DISEASE" Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33(5): 808 - 819.

59.- Kadaro, A.Y., Ghalib, H.W., Ali, M.S., Eltoun, I., Ismail, - A., Gaafar, A., et all "PREVALENCE OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS A - LONG THE NILE RIVER NORTH OF KHARTOUM (SUDAN) IN THE AFTERMATH - OF AN EPIDEMIC IN 1985". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1993; 1:44 - 49.

60.- Kahl, L.P., Byram, J.E., David, J.R., Comonford, S.A., and - Von Lichtenberg, F. "LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS: COMPARA TIVE PATHOLOGY OF GOLDEN HAMSTERS INFECTED WITH ISOLATED FROM - CUTANEOUS AND MUCOSAL LESIONS OF PATIENTS RESIDING IN TIRES BRAC OS, BAHIA, BRAZIL". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991; 44(2): 218-232

61.- Kuo Wu Whei and Test Robert, B. "GENETIC FACTORS CONTRO - LLING SUSCEPTIBILITY TO LEISHMANIA MAJOR INFECTION IN THE SAND - FLY PHLEBOTOMUS PAPANASI (DIPTERA:PSYCHODIDEA)". Am. J. Trop. - Med. Hyg. 1990; 42(4): 329 - 334.

62.- Kou Wu Whei and Tesh Robert, B. "SELECTION OF PHLEBOTOMUS - PAPANASI (DIPTERA:PSYCHODIDAE) LINES SUSCEPTIBLE AND REFRACTORY - TO LEISHMANIA MAJOR INFECTION". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1985; 42 - (4): 320 - 328.

63.- Laison, R. and Shaw, J.J. "EPIDEMIOLOGY AND ECOLOGY OF LEI - SHMANIASIS IN LATIN-AMERICA". Nature Parasitol Suppl. 1978; 273: 595 - 599.

64.- Laison, R. and Shaw, J.J. "LEISHMANIASIS AND LEISHMANIASIS - OF THE NEW WORLD, WITH PARTICULAR REFERENCE TO BRAZIL". Bull Pan Health Org. 1983; 7(4): 1 - 17.

65.- Laison, R. and Shaw, J.J. "LEISHMANIASIS OF THE NEW WORLD - TAXONOMIC PROBLEMS". Br. Med. Bull. 1982; 28: 44 - 48.

66.- Laison, R. and Shaw, J.J. "THE ROLE IN ANIMALS IN THE EPIDE MIOLOGY OF SOUTH AMERICAN LEISHMANIASIS. IN: LUMSDEN W.H.R. AND - EVANS D.S. BIOLOGY OF THE KINETOPLASTIDA". London Academic Press 1979.

67.- Laison, R. and Shaw, J.J. "EVOLUTION, CLASIFICATION AND GEO GRAPHICAL DISTRIBUTION. PETERS W, KILLICK-KENDRICK R, EDS. THE - LEISHMANIASIS IN BIOLOGY AND MEDICINE". London Academic Press, - 1987; 1: 1 - 28.

68.- Lawrie Jonathan, M., Jackson, P.R., Stiteler, J. M., and - Hockmeyer, W.T. "IDENTIFICATION OF PATHOGENIC LEISHMANIA PROMASTIGOTES BY DNA : DNA HIBRIDIZATION WITH KINETOPLAST DNA CLONED - INTO E. COLI PLASMIDS". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1985; 34(2): 257-265.

69.- Lehman-Nitsche, R. "¿LEPRA PRECOLOMBINA? ENSAYO CRITICO".- Rev. Museo La Plata. 1989; 9: 337 - 370.

70.- Lysenko, A.J. "DISTRIBUTION OF LEISHMANIASIS IN THE OLD WORLD". Bull WHO. 1971; 44: 515 - 520.

71.- Mandujano-Quintero, G., Velasco-Castrejon, O. Y Soriano, R.- "LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA (ESPUNDIA) EN MEXICO. INFORME DE TRES-CASOS EN EL ESTADO DE TABASCO". Patologia. 1990; 41: 356 - 362.

72.- Marinkelle, C.J. "THE CONTROL OF LEISHMANIASIS". Bull WHO. - 1980; 6: 807 - 818.

73.- Martínez, R. "URNA OLMECA QUE PODRIA REPRESENTAR LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA DISEMINADA". Rev. Salud Pub. Méx. 1982; XXIV-(5): 497 - 507.

74.- Márquez, F. "LEISHMANIASIS CUTANEA DISEMINADA ENERGICA. PRESENTACION DEL PRIMER CASO PRESENTADO EN MEXICO". Med. Cut. 1966;- 3: 287 - 292.

75.- Martínez, J.L. Y Col. "PRESENCIA DE LA LEISHMANIASIS CUTANEA GENERALIZADA EN MEXICO". Rev. Invest. Salud Pub. 1968; 2(28): 108 - 118.

76.- Martínez Y Col. "COMUNICACION PERSONAL". Sec. Salud Pub. Cunducan, Tab. Méx. 1991.

77.- McMahon Pratt, D. and David, J. "MONOCLONAL ANTIBODIES THAT DISTINGUISH BETWEEN NEW WORLD SPECIES OF LEISHMANIA". Nature. 1981; 291: 581 - 583.

78.- McMahon Pratt, D., Benett, E. and David, J.R. "MONOCLONAL - ANTIBODIES THAT DISTINGUISH SUBESPECIES OF LEISHMANIA BRAZILIENSIS". J. Immunol. 1982; 129: 926 - 927.

79.- Miles, M.A. "IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE LAS LEISHMANIASIS" Bol. Sanit. Panam. 1986; 101(3): 217 - 229.

80.- Millan, C.J., Gonzales, Cha. "LEISHMANIASIS CUTANEA INFANTIL". Rev. Med. Hosp. Gral. Méx. 1984; 9: 153 - 164.

81.- Momem, H., Grimaldi, C.J. and Marzichi, M.C. "CHARACTERIZATION OF NEW WORLD LEISHMANIA BY AGAROSE ELECTROPHORESIS ENZYME - PATTERNS". IX Reuniao Anual Pesquisas Basicas Em Doencas de Chagas.- Caxambú., M.G. Brasil. 1982.

82.- Morsy Tossan, A., Schnur Lionel, F. et all. "NATURAL INFECTIONS OF LEISHMANIA MAJOR IN DOMESTIC DOGS FROM ALEXANDRIA, AEGYPT". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 37(1): 49 - 52.

83.- Monroy - Ostica, A. "RELACION HUESPED- PARASITO EN LEISHMANIASIS". Rev. Infect. 1986; 7: 230 - 237.

84.- Pan, A.A. and Pan, S.C. "LEISHMANIA MEXICANA: COMPARATIVE - FINE STRUCTURE OF AMASTIGOTES AND PROMASTIGOTES IN VITRO AND IN-VIVO". Exp. Parasitol. 1986; 62: 254 - 265.

85.- Pearson, R.D. and Roberts D. "HOST IMMUNOGLOBULIN ON SPLEEN DERIVED LEISHMANIA DONOVANI AMASTIGOTES". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 43(3): 263 - 265.

86.- Pellegrino, J., Pereira, H. and Furtado, T.A. "MUCO-CUTANEOUS LEISHMANIASIS INTRADERMAL TEST WITH A PROMASTIGOTES SUSPENSION AND A CRUDE EXTRACT FROM LEISHMANIA BRAZILIENSIS". Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1987; 19: 393 - 396.

87.- Rada, E., Trujillo, D., Castellanos, P. and Convit, J. "GAMMA INTERFERON PRODUCTION INDUCED BY ANTIGENS IN PATIENTS WITH - LEPROSY AND AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 37(3): 520 - 524.

88.- Ramos, C. "LEISHMANIASIS ANERGICA DIFUSA EN LA REGION CARBO NIFERA DE COAHUILA". Memorias V Congreso Mexicano Dermatol. 1970 579 - 581.

89.- Ramos, A. Y Col. "TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS CUTANEA - CON GLUCANTIME. A PROPOSITO DE NUEVE CASOS". Revista Cubana de - Medicina Tropical. 1990; 35: 24 - 33.

90.- Restrepo, M. y Gomez, M.E. "LA REACCION DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA EN EL DIAGNOSTICO DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA". Biomedica. 1983; 3: 15 - 21.

91.- Rivler, D., Shan, R., Bovay, P. and Mavel, J. "VACCINE DEVELOPMENT AGAINST CUTANEOUS LEISHMANIASIS/SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF RADIOATTENUATED PARASITES PROTECTS CBA MICE AGAINST VIRULENT LEISHMANIA MAJOR CHALLENGE". Parasite Immunology. 1993; 15: 75 - 84.

92.- Rodriguez-Toro, G. "LEISHMANIASIS". Biomedica. 1983; 3(3): - 77 - 99.

93.- Rogers, W.O. and Wirth, D.F. "GENERATION OF SEQUENCE DIVERSITY IN THE KINETOPLAST DNA MINICIRCLES OF LEISHMANIA MEXICANA - AMAZONENSIS". Molecular and Biochemical Parasitology. 1988; 30: - 1 - 8.

94.- Rogers, W.O. and Wirth, D.F. "KINETOPLAST DNA MINICIRCLES: - REGIONS OF EXTENSIVE SEQUENCE DIVERGENCE". Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 565 - 569.

95.- Saenz, R.E., Rodriguez, C.G., Johnson, C.M. and Berman, J.D. "EFFICACY AND TOXICITY OF PENTOSTAM AGAINST PANAMANIAN MUCOSAL - LEISHMANIASIS". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991; 44(4): 394 - 398.

96.- Scorza, J.V., Palacios, P.E. Y Carnevali, M. "RELACIONES HOSPEDADOR-PARASITO ENTRE LEISHMANIA GARNHAMI DE VENEZUELA E HISTIOCITOS DE LESIONES DERMICAS DE HAMSTERS". Rev. Cubana de Medicina Tropical. 1983; 35: 263 - 275.

97.- Scorza, J.V. "CAMBIOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA LEISHMANIASIS - IN VENEZUELA". Bol. Div. Malarial. y S. Amb.(caracas) 1985; 12:- 45 - 47.

98.- Simpson, M.H., Mullins, J.F., Stone, O.J. "DISSEMINATED ANERGIC CUTANEOUS LEISHMANIASIS. AN AUTOCHTHONOUS CASE IN TEXAS AND - NUEVO LEON". Arch. Dermatol. 1980; 97: 301 - 303.

99.- Sosa-Cabrera, T., Rivas-Sánchez, B., Ruiz, R. and Monroy, - O.A. "ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA LEISHMANIASIS CUTANEA EN CAMPECHE, MEXICO". Mem. Congr. Nal. Microbiol. Acapulco, Gro. Méx. - 1991.

100.- Scorza, J.V., Palacios-Pru, E. y Carnavali, M. "RELACIONES-HOSPEDADOR-PARASITO ENTRE LEISHMANIA GARNHAMI DE VENEZUELA E HISTIOCITOS DE LESIONES DERMICAS DE HAMSTERS". Revista Cubana de Medicina Tropical. 1983; 35: 263 - 275.

101.- Schweitzer, A. N., Swinton, J., and Anderson, R. M. "DINA - MIC INTERACTION BETWEEN LEISHMANIA INFECTION IN MICE AND Th-1 TYPE CD4 T-CELL: COMPLEXITY IN OUTCOME WITHOUT A REQUIREMENTS FOR Th-2 TYPE RESPONSES". Parasite Immunology. 1993; 15: 85 - 89.

102.- Scheffler, W.G., Burns, J.M., Badaro, R., Ghalib, H. W., - Button, L.L., McMaster, W.R., and Reed, S. G. "ANTIBODY RESPONSES OF VICERAL LEISHMANIASIS PATIENTS TO gp63, A MAJOR SURFACE GLYCOPROTEIN OF LEISHMANIA SPECIES". The Journal of infection diseases 1993; 168: 426 - 430.

103.- Smith, D.F., Searle, Susan, R.P.D., Gramiccia, M., and Ben-Ismail, R. "A KINETOPLAST DNA PROBE DIAGNOSTIC FOR LEISHMANIA MAJOR: SEQUENCES HOMOLOGIES BETWEEN REGIONS OF LEISHMANIA MINICIRCLES". Molecular and Biochemical Parasitology. 1989; 37: 213-224.

104.- Sutcliffe, J.G. "pBR322 RESTRICTION MAP DERIVED FROM THE - DNA SEQUENCES: ACCURATE DNA SIZE MARKERS UP TO 4361 NUCLEOTIDS - PAIRS LONG". Nucleic Acids Research. 1988; 58: 2721 - 2728.

105.- Vargas, L. "PRESENTACION CRONOLOGICA DEL DESCUBRIMIENTO DE LAS LEISHMANIASIS EN EL HUMANO". Rev. Salud Pub. Méx. 1978; 20(5) 493 - 501.

106.- Velasco, O. "LAS LEISHMANIASIS EN MEXICO". Rev. Lat. Microbiol. 1987; 29(2): 119 - 125.

107.- Velasco-Castrejón, O., Savariano, S., Nava, F. y Guzman, - C. "LOS AGENTES ETIOLOGICOS DE LAS LEISHMANIAS CUTANEAS EN MEXICO PRESENCIA SE L. BRAZILIENSIS EN MEXICO". Rev. Lat-amer. Microbiol 1987; 29: 119 - 126.

- 108.- Velasco-Castrejón, O. "LEISHMANIASIS IN THE CHONTALPA. - STATE OF TABASCO, MEXICO". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 25:15-20.
- 109.- Velasco, O., Biagi, F. y Beltrán, F. "OBSERVACIONES SOBRE - LA LEISHMANIASIS CUTANEA EN VOLUNTARIOS HUMANOS". Mem. Congr. Méx Dermatol, México, D.F. 1970.
- 110.- Velasco-Castrejón, O., Guzman-Bracho, C., Cruz-Rodríguez-V. y Gonzales-Domínguez, F. "LAS LEISHMANIASIS CON ESPECIAL REFERENCIA A MEXICO". Publicación Técnica del INDRE, Secretaría de Salud, Méx. 1991.
- 111.- Velasco-Castrejón, O. "LA LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA EN EL - SURESTE DE MEXICO". Rev. Latamer. Microbiol. 1990.
- 112.- Velasco-Castrejón, O., Savarino, S., Walton, B., Nava, A.F. "DIFFUSE LEISHMANIASIS IN MEXICO". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; - 41: 280 - 288.
- 113.- Velasco-Castrejón, O., Camas, L. "MICROBIOPSIA EN EL AISLA- MIENTO DE LEISHMANIA DURANTE EL TRABAJO DE CAMPO". Congr. Nal. - Bioq. Clin. Oaxaca. 1989.
- 114.- Velasco-Castrejón, O. "TRATAMIENTO CON FACTOR DE TRANSFEREN- CIA ESPECIFICO EN LEISHMANIA TEGUMENTARIA DISEMINADA". 1er. Cong. Nal. Inmunología, Oaxtepec, Méx. 1982.
- 115.- Velasco-Castrejón, O. "LAS LEISHMANIASIS CON ESPECIAL REFERENCIA A MEXICO". Secretaría de Salud, INDRE. 1991.
- 116.- Vianna, G. "TRATAMIENTO DA LEISHMANIASE TEGUMENTAR POR INJE CCOES INTRAVENOSAS DE TARTARO EMETICO". An 7 Cong. Bras. Med. Ci- rurg. 1912; 4: 426 - 428.
- 117.- Walters, L. et al. "ULTRASTRUCTURAL BIOLOGY OF LEISHMANIA- (VIANNIA) PANAMENSIS IN LUTZOMYIA GOMEZI (DIPTERA: PSYCHODIDAE) : - A NATURAL HOST PARASITE ASSOCIATION". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989 40(1): 19 - 39.
- 118.- Walton, B.C. "NEW WORLD CUTANEOUS-MUCOCUTANEOUS LEISHMANIA- SIS IN TROPICAL DISEASES ". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 25: 15 - 20.
- 119.- Walton, B.C. and Velasco, O. "THE DISTRIBUTION AN ETIOLOGY- OF DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE NEW WORLD. IN: LEISHMA- NIASIS". NATO ASI Series. D.T. Hart 1989.
- 120.- Wirth-Dyann, F. and McMahon-Pratt, D. "RAPID IDENTIFICATION OF LEISHMANIA SPECIES BY SPECIFIC HIBRIDIZATION OF KINETOPLAST - DNA IN CUTANEOUS LESIONS". Proc. Natl. Acad. Sci. 1982; 79: 6999- 7003.
- 121.- Wirth-Dyann, F. et al. " LEISHMANIASIS AND MALARIA ". New- Tools for Epidemiology Analysis. Sci. 1986; 234: 975 - 977.

122.- Weill. "HEALTH PROBLEMS ASSOCIATED WITH AGRICULTURAL COLONIZATION IN LATINOAMERICA". Soc. Sc. and Med. London. 1981; 15: 449 - 461.

123.- WHO. "TROPICAL DISEASES". Div. Control Trop. Dis. WND/World Bank/WHO Sp. Prog. Reseach Tran. Trop. Dis. TDR. 1990.

124.- WHO. "DISCUSSION ON THE DEVELOPMENT OF VACCINE AGAINST HUMAN ZONOTIC LEISHMANIASIS". TDR/LEIS/VAC/WHO Genova, Sept. 1985.

125.- Zasloff, Michael., Ginder-Gordon, D., and Felsenfeld-Gary, D. "A NEW METOD FOR THE PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA MOLECULES". Nucleic Acids Research-1978; 5(4): 1138 - 1152.