

11201
24



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**BUSQUEDA DE ALTERACIONES GENETICAS
EN LEISHMANIA mexicana mexicana
Y SU RELACION CON LOS CUADROS CLINICOS**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE PATOLOGO CLINICO**

Presenta:

Dra. Ma. Alejandra C. Abundis Romero



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

México, D.F.

1997

Diciembre

**TESIS CON
FALSA DE CRIMEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

TESIS

**BUSQUEDA DE ALTERACIONES GENETICAS
EN LEISHMANIA mexicana mexicana
Y SU RELACION CON LOS CUADROS CLINICOS.**

AUTOR:

DRA. MA. ALEJANDRA C. ABUNDIS ROMERO
R3 DE PATOLOGIA CLINICA

LABORATORIO DEL HOSPITAL DE
CARDIOLOGIA CMN SIGLO XXI

REALIZADA EN:

DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE MEDICINA

U N A M

Dra. Ingeborg D. Becker Fauser

Tutora

Unidad de Medicina Experimental UNAM

Dr. Rubén Argüero Sánchez

Director

Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI

Dr. Armando Mansilla O.

Jefe de la División de Enseñanza

Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI

Dr. Alonso Peña González

Subjefe de la División de Enseñanza

Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI

Dr. Félix Méndez

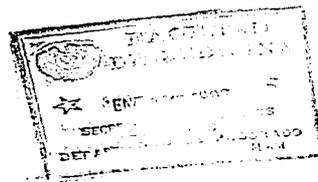
Jefe de Laboratorio Central

Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI

Dra. Rosa Ma. García Escamilla

Titular de la Residencia de Patología Clínica

Hospital de Cardiología CMN SIGLO XXI



HOSPITAL DE CARDIOLOGIA
C.M.N. SIGLO XXI
DIV. DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION.

TUTORA



DRA. INGEORG D. BECKER FAUSER

ASESORA

DRA. ROSA MA. GARCIA ESCAMILLA.

COLABORADORES

Q.F.B. MIRIAM BERZUNZA CRUZ

TEC. LAB. RICARDO VARGAS

Dedicatoria

***Esta tesis la dedico al hombre que me ha apoyado con su
comprensión, amor, interés, respeto y libertad
a la toma de mis decisiones; a la persona que ha contribuido
a superarme en el aspecto intelectual y como ser humano,
ese hombre es mi esposo Javier.***

***A mis hijos Javier y Katia que con su cariño,
respeto, paciencia y participación como equipo,
me han brindado la fuerza interna para
concluir una etapa más de mi vida.***

Gracias.

Los amo.

INDICE

INTRODUCCION	
ANTECEDENTES HISTORICOS	1
DISTRIBUCION GEOGRAFICA	2
EPIDEMIOLOGIA	3
DEFINICION	3
AGENTE ETIOLOGICO	4
CLASIFICACION	4
RESERVORIOS	5
VECTORES	5
ESTRUCTURA DE LA LEISHMANIA	6
DETERMINANTES VIRULENTOS	8
ASPECTOS INMUNOLOGICOS	9
DIAGNOSTICO	10
TRATAMIENTO	18
TECNICA DE RESTRICCION DE FRAGMENTOS DE LONGITUD POLIMORFICA (RFLP)	20
TECNICA DE AMPLIFICACION AL AZAR POLIMORFICA DEL DNA. RAPD	21
DENDOGRAMA	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
HIPOTESIS	25
OBJETIVOS	25
CARACTERISTICAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL	25
CARACTERISTICAS DEL GRUPO CONTROL	25
UNIVERSO DE TRABAJO	26
CRITERIOS DE INCLUSION	26
CRITERIOS DE NO INCLUSION	26
CRITERIOS DE EXCLUSION	26
VARIABLES DEPENDIENTES	26
VARIABLES INDEPENDIENTES	26

MEDICION DE VARIABLES	26
MATERIAL Y METODOS	27
PREPARACION DE GEL DE AGAROSA	29
AISLAMIENTO DE CEPAS	29
LISADO DE PARASITOS	29
OBTENCION DEL kDNA	30
DESARROLLO DE LA TECNICA DE RFLP	31
DESARROLLO DE LA TECNICA DE RAPD	31
RESULTADOS	32
AMPLIFICACION AL AZAR POLIMORFICA DEL DNA. RAPD	34
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	36

ANTECEDENTES HISTORICOS

La Leishmaniosis es una zoonosis con antecedentes desde el año 1500. En 1788, Hipólito Ruiz describe "llagas corrosivas" en la cara de algunos peruanos. Cuningham en 1885 observa por primera vez al parásito. Leishman describió los parásitos del Kala-azar, creando Ross el género *Leishmania* en honor a Leishman. En 1904 Roger cultivó el parásito y descubre al promastigote. En 1911, Wenyon sugirió que el flebotomo era el transmisor de la leishmaniosis cutánea.

En México, Diego López de Cogolludo en su libro "Historia de Yucatán" encontró indígenas Itzaes del Petén con "orejas podridas", se han descubierto ídolos con estas características.



Urna Olmeca con lesiones sugestivas de *Leishmania*

En 1912 Seidelin establece la "úlcer de los chicleros". En 1926 Montenegro usó promastigotes muertos y desarrolló la intradermoreacción que lleva su nombre desde 1941. En 1953, Biagi observa que esta úlcera se comporta semejante a la leishmaniosis cutánea producida por *Leishmania trópica*, a diferencia de la producida por *L. braziliensis* y la cultivó en medio de Novy, Nicolle, Mac Neal (NNN) y le llamó *L. trópica mexicana*. Garnham le cambia el término a *L. mexicana* en 1972. En 1986 se propuso la notificación obligatoria de esta patología. Lainson y Shaw establecieron *L. mexicana mexicana* y Grimaldi en 1987 confirmó por Anticuerpos monoclonales a *L. mexicana mexicana* como responsable de la "úlcer de los chicleros". En 1987 Velasco y col. reportaron la presencia de *L. braziliensis* en el Istmo de Tehuantepec. (1), (2) y (5).

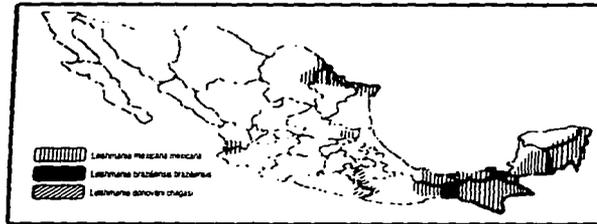
DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Es una parasitosis cosmopolita, exceptuando Alaska y Australia. Se han descubierto casos en el "Viejo Mundo" (en Europa, Asia y Africa) y en el "Nuevo Mundo" (en el Continente Americano, desde el sur de Texas hasta Argentina).

En México, en 1970 se descubrieron casos en Coahuila. En 1990 se establece una zona endémica de Kala-azar, en el estado de Tabasco. En la República Mexicana, se han registrado casos en los estados de la Cuenca del Balsas, Puebla, Morelos, Guerrero, Chiapas, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Michoacán, Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí, Hidalgo, Coahuila y en el sur de Texas. (1), (2), (3), (6), (8), (10), (11), (12) y (13).



Distribución mundial de la Leishmania

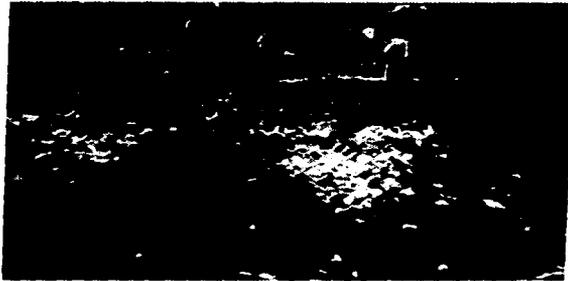


Distribución en la República Mexicana

EPIDEMIOLOGIA

En 1994 la World Health Organization reporta 400 000 casos nuevos anualmente, con una prevalencia de 12×10^6 y un riesgo de 350×10^6 personas (25). En México y Sudamérica se calculan aproximadamente 59300 casos, Costa Rica tiene una prevalencia cercana a 1 por 1000 (12). De acuerdo a reportes de la Organización Panamericana de la Salud, hasta 1991, en México, se habían reportado 5 casos de leishmaniosis visceral (LV), todos originarios de la Cuenca del Balsas; en los últimos 3 años se han registrado 7 casos en el estado de Chiapas (6 de ellos en menores de 5 años y 1 caso de 22 años). La leishmaniosis cutánea se localiza en el Sureste de México (en Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo y Campeche). En Nayarit, en 1993 se registraron 170 casos. En Tabasco, de 1987-1993 detectan 625 casos. Esta patología prevalece en áreas, donde la infraestructura es deficiente, donde las habitaciones se encuentran expuestas al medio ambiente, en regiones selváticas, húmedas, donde el vector encuentra las características idóneas para existir.

La Leishmaniosis influye en el área social, turística, laboral, en la Ingeniería civil, en los desarrollos urbanos. (1), ((2), (3), (4),(10), (11) y (12).



Habitat donde predomina el vector de la leishmaniosis

DEFINICION

La leishmaniosis es una parasitosis producida por el género *Leishmania*, se caracteriza por requerir de un vector, un parásito y un huésped. Se manifiesta con lesiones dérmicas y/o viscerales, con tendencia a la curación espontánea, o bien a la cronicidad, provocando en ocasiones la muerte. A la leishmaniosis se le ha conocido con diversos términos; entre ellos: "dolor oriental", "El demonio de Aleppo", el "dolor de Baghdad", "Rosa de Jericho", "Úlcera de los chicleros", "uta", "espundia", "fiebre negra", "fiebre de Dumdum" y "kala azar".

AGENTE ETIOLOGICO

El causante de esta patología es un parásito, que pertenece al reino protista, al phylum sarcomastigophora, al subphylum mastigophora, a la clase zoomastigophora, a la orden kinetoplastida (porque son organismos que poseen el kinetoplasto, estructura con DNA localizado en las mitocondrias, kDNA).

CLASIFICACION

El género *Leishmania* se divide en complejos y Especies: (2), (3), (4), (5) y (7).

COMPLEJOS

L. donovani

L. tropica

L. major

L. aethiopica

L. mexicana

ESPECIES

L. donovani
L. chagasi
L. infantum
L. archibaldi

L. tropica
L. killidi

L. major

L. aethiopica

L. mexicana
L. amazonensis
L. garhami
L. pifanoi
L. venezuelensis

El género *Viannia* en Brazil se divide en

L. lainsoni (no asignado)

L. braziliensis

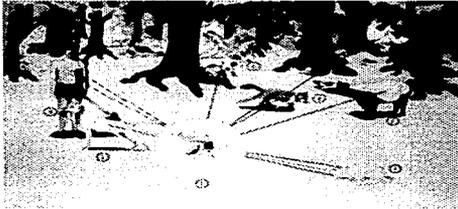
L. guyanensis

L. braziliensis
L. peruviana

L. guyanensis
L. panamensis

RESERVORIOS

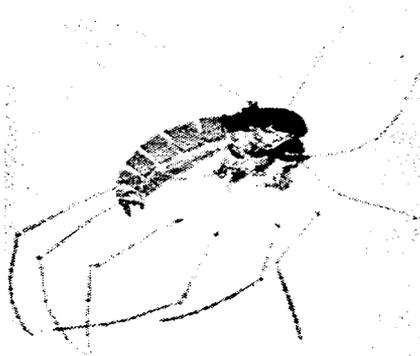
Como reservorios de este parásito se encuentran roedores silvestres, la zorra, el coati, cánidos silvestres y mascotas en las zonas indígenas como el gato y el perro (3), (4), (5) y (6).



Reservorios que participan en la leishmaniosis

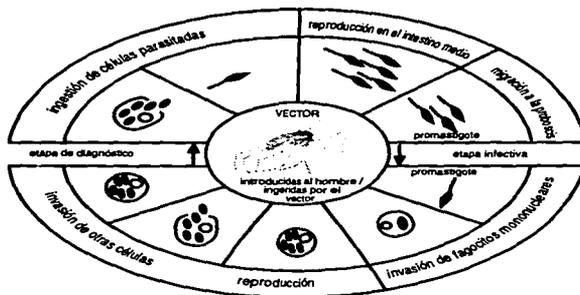
VECTORES

Es un parásito transmitido por vectores dípteros pilosos de la familia Phlebotomus (en el viejo mundo) y Lutzomia (en el nuevo mundo), conocido en lenguaje común como "Papalotilla". En México se han encontrado como principales vectores a Lutzomia Olmeca y diabólica.



Vector que participa en la leishmaniosis

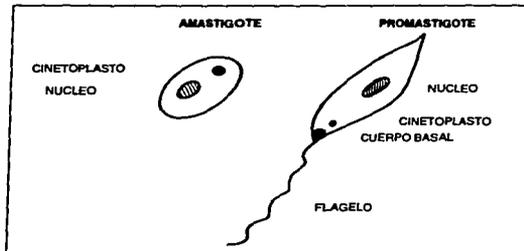
La hembra de la *Lutzomia*, tiene hábitos nocturnos, al picar al reservorio, adquiere el parásito en su forma de amastigote y en el tubo digestivo se transforman a promastigotes, se dirigen así a la cabeza y a la faringe del mosco y los inoculan al nuevo huésped. (1), (2), (3), (4), (6), (8) y (12).



Ciclo evolutivo de la *Leishmania* en el interior del Vector

ESTRUCTURA DE LA LEISHMANIA

El amastigote tiene forma redondeada u oval, de aprox. 2-7 micras de diámetro, posee una membrana, citoplasma, un núcleo y el rizoplasto y el rizoplasto que se convierte en flagelo. El promastigote, otro estadio del parásito, de forma fusiforme, mide de 16-18 micras de diámetro mayor, con un núcleo central, un blefaroplasto, de donde emerge el flagelo hacia la región anterior, es móvil, termolábil, de localización extracelular, ambas formas se reproducen por fisión binaria (1), (2), (4), (6) y (8).

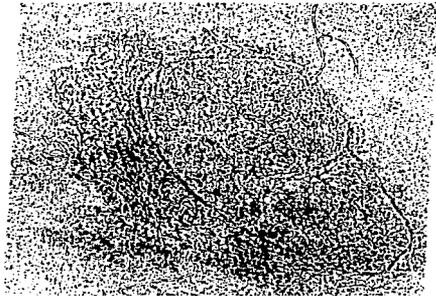


Formas en que se presenta la *Leishmania*

Cada cepa de leishmania tiene diferente cariotipo molecular, el contenido del DNA en los parásitos se ha calculado menor de un picogrammo en comparación con el de las células del mamífero y con un contenido de guanina-citocina (G-C), de 60%. Contiene menos de 10-13 g de DNA y para obtener este ácido nucleico, se requieren parásitos purificados, digeridos con endonucleasas.

Los cromosomas de la leishmania no condensan, por lo tanto no se pueden ver en microscopio de luz y se recurre a la técnica de electroforesis en campo pulsátil, del inglés: "pulse field gel electroforesis" (PFG), en donde Schwartz y Cantor observaron que a altos voltajes en dos diferentes campos, el DNA mayor de 2-3 millones de pb, se podían resolver en geles de agarosa; se basa en el principio visco-elástico, donde las moléculas antes de moverse en un campo, se tienen que alargar y reorientar y el tiempo que toma para ésto es proporcional a su tamaño. Se ha observado un gran polimorfismo en estos parásitos. Los genes que regulan el ciclo celular, son los que codifican para alfa y beta tubulina y se conservan en las especies.

El DNA de este parásito se distribuye entre el núcleo y el cinetoplasto (kDNA), éste último, compuesto por moléculas de doble cadena de DNA en forma de una red compleja, que in vitro se ha logrado compactar con proteínas parecidas a las histonas, se localiza en la base del flagelo, en la membrana mitocondrial, el kDNA se replica solo en la fase de síntesis del ciclo celular, está integrado por una región variable, una región especie específica y una región conservada, existen aproximadamente 107 pares de bases (pb) de DNA mitocondrial, distribuido en maxicírculos, de 20 40000 pb, que codifican para el RNA ribosomal, mitocondrial y proteínico del parásito, se localiza en la periferia y los minicírculos, de 500 a 2500 pb, que codifica para el RNA de transferencia, sirve como gúfa, se le ha detectado una secuencia universal en los minicírculos, con residuos de adenina, con 4 o menos clases de secuencias, cada clase está representada por muchas copias (mas de 103) de secuencias de 600 pb, que están disponibles para la hibridación.



Maxi y mini círculos que integran el kDNA de la Leishmania

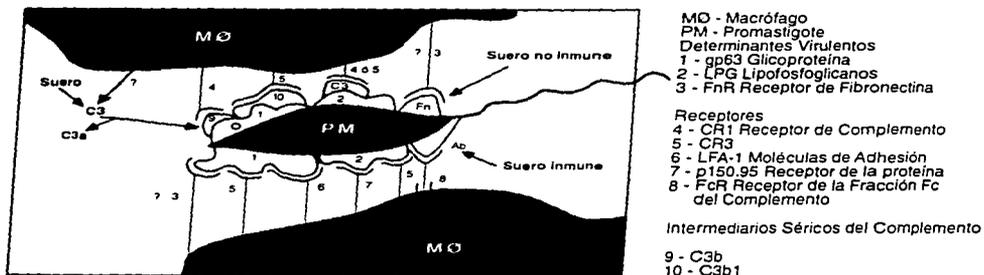
Para el estudio de la leishmania se aíslan secuencias del kDNA que no codifican y que tienen una secuencia conservada de 120 pb, el kDNA nos permite diferenciar especificidades taxonómicas, por ejemplo el kDNA de L. major tiene 20 clases de minicírculos, con mayor número de secuencias diferentes, tiene una secuencia que cruza e hibrida con L. mexicana, otra con L. braziliensis y otra con L. donovani. El kDNA de L. mexicana, no tiene una secuencia extensa en común con L. braziliensis ni con L. donovani. Para detectar el DNA parasitario en el DNA humano o animal, se recurre a la técnica de Jeffrey's, que usa regiones de mini-satélites hipervariables de kDNA. El DNA mantiene sus características en todos los estadíos, contribuye a designar las especies y con sus secuencias se logra hibridar con DNA homólogo, este DNA se encuentra libre de variación fenotípica (8), (20), (21), (22) y (23).

DETERMINANTES VIRULENTOS

Entre los determinantes virulentos que posee la leishmania están los lipofosfoglicanos (LPG), la glucoproteína 63 (gp 63), los fosfolípidos, los glucoinositoles y la proteína específica HSP 70.

Se han empleado anticuerpos monoclonales para identificar la gp 63 en ambos estadios de la leishmania, es una metaloenzima que protege a las proteínas de la degradación fagolisosomal de los macrófagos, con un peso de 63 kDa. Sus secuencias de aminoácidos 161-173 y 304-308, muestran gran homología a los sitios de unión del zinc con los ligandos de histidina y de glutamina en la proteinasa neutra del *Bacillus subtilis*, de la termolisina, de la proteinasa Serratia y a la colagenasa de fibroblastos humanos. Se ha purificado por cromatografía de afinidad monoclonal de promastigotes y se inhibe su acción por iones quelantes de metales, esta acción es reversible al adicionar zinc. La gp 63 es proteolítica a un pH alcalino. Impide que se degraden los sustratos lípido-proteicos. Se ha visto que actúa como ligando para un receptor de manosa-fucosa en los macrófagos y como aceptor de C3b, ayuda a opsonizar al parásito, interviene en la virulencia de las infecciones y en la supervivencia del parásito intracelular.

Los LPG, son compuestos inmunogénicos de manosa, disacáridos fosforilados (galactosa + manosa, que constituyen el dominio de unión), los fosfosacáridos y el fosfatidilinositol. Se unen a receptores del macrófago, tipo lectina, de la fibronectina, de la familia de las integrinas, del complemento (CR1- CR3) y de la fracción Fc de los anticuerpos. Inhiben a la proteína cinasa, que es una molécula que activa al macrófago y el estallido respiratorio en macrófagos, reduciendo la concentración de agentes microbicidas como los aniones superóxidos, la producción de peróxido de hidrógeno, singletes de oxígeno y radicales hidroxilos. (24), (25), (26), (27) y (28).



Determinantes virulentos de la Leishmania

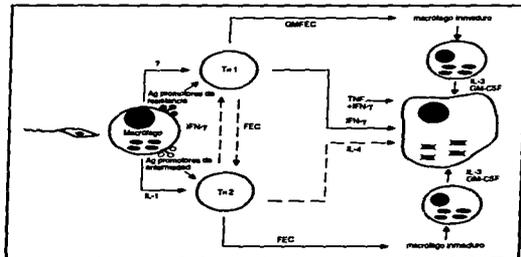
ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Al penetrar la leishmania al organismo, se activan las células NK, se estimula la presentación de antígenos protectores y se incrementa la expresión de moléculas de clase II. El parásito es fagocitado por el macrófago, en forma de promastigote, y dentro de él se transforma en amastigote.



Macrófago que contiene promastigote y amastigotes de Leishmania

El macrófago, es una célula que actúa como célula hospedera del parásito, como célula presentadora de antígeno (APC) y finalmente como célula efectora, eliminando al invasor, producen además óxido nítrico dependiente de L-arginina. El macrófago infectado, a través de la interleucina IL-12, estimula a las células T CD4, (Th1) o (Th2). Las células CD4, del tipo Th1 producen citoquinas, del tipo IL-2, interferón gama (IFN γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). En las células T se incrementa la expresión de IL-2 (demostrado con un anticuerpo monoclonal CD25), los receptores de transferencia (con CD 71) o bien moléculas del HLA clase II. Cuando se estimulan las CD4 Th2, se induce también la producción de IL-4, que antagoniza el IFN γ induce también la IL-5 que activa eosinófilos para la producción de proteína básica mayor, peroxidasa, proteína catiónica y neurotoxina eosinofílica. Otras linfoquinas inducidas por Th2 son la IL-6 y la IL-10, que participan en el crecimiento y diferenciación de las células B y en los precursores hematopoyéticos. Durante el proceso de infección, se puede estimular uno u otro subtipo y dependiendo del subtipo estimulado será la evolución clínica. La activación de esta vía se asocia a la susceptibilidad a la enfermedad.



Interacciones entre los macrófagos, las células Th1 y Th2 en la leishmaniasis

Las células B, el macrófago, los monocitos, las células dendríticas del bazo y las células de Langerhans producen IL-12, que es la linfoquina mas potente para inducir la respuesta Th1 y para activar células NK a que produzcan IFN γ (15), (16), (17), (18) y (19).

La Dra. Becker y col. observan diferente grado de inhibición del estallido respiratorio en macrófagos, dependiendo de la cepa a la que pertenece el parásito. Han demostrado la intervención de las células de Langerhans como presentadoras de antígeno en la leishmaniosis y observan que en la LCL existe mayor número de células de Langerhans distribuidas en la epidermis y la dermis, alrededor de los granulomas, limitando al parásito, mientras que en la LCD, el número de éstas es menor.

En la infección por *L. donovani* se ha observado inhibición de la respuesta del macrófago al IFN γ así como la disminución en la expresión de moléculas de clase II.

La respuesta inmune a la leishmania está regulada por los genes de la respuesta inmunológica (genes Ir). En un estudio realizado por la Dra. Gorodezky y col. en pacientes con LCL del estado de Tabasco, se encontró en el complejo mayor de histocompatibilidad un gen de susceptibilidad en la región DQ (DQ3 B1 *0301) y un gen de resistencia en la región DPB1 *0201.

La leishmaniosis es una enfermedad que sí produce inmunidad efectiva.

DIAGNOSTICO

Para realizar el diagnóstico de leishmaniosis, se toman en cuenta:

1.-Los antecedentes de residencia, área geográfica, contacto con vectores, reservorios y laborales, tienen importancia para llegar al diagnóstico. Como se ha comentado, el cuadro clínico varía dependiendo del área geográfica, del vector y de las características del parásito, que para sintetizar, en el viejo mundo predominan las formas viscerales de esta patología y en el nuevo mundo, su forma predominante es la leishmaniosis cutánea localizada (LCL), la leishmaniosis cutánea diseminada (LCD), la leishmaniosis mucocutánea (LMC) y en menor porcentaje la leishmaniosis visceral (LV). No se han reportado casos en Australia y la Antártica.

2.-La epidemiología nos permite clasificar los grupos mas expuestos en esta patología, de acuerdo a su habitat, a su desarrollo laboral y/o social. Así, la leishmaniosis predomina en áreas donde carecen de servicios públicos básicos, en zonas donde las habitaciones son rústicas, de adobe, con pisos de tierra, donde los roedores, los reservorios peridomiciliarios se encuentran en contacto directo con los huéspedes y en donde el vector encuentra condiciones óptimas para sobrevivir. Actualmente se ha visto afección de las amas de casa y niños en gran proporción.

3.- Entre las áreas endémicas predominantes en nuestro país se encuentra el sureste de la República y sobre todo regiones con clima tropical y subtropical.

4.-Para producir lesiones se requieren 106 parásitos, sin embargo el vector administra de 10 a 100 de ellos. Su cuadro clínico se manifiesta en diversas formas, posterior a un tiempo de incubación de aproximadamente 1 semana a 3 meses, su presentación puede variar desde:

A.- La LCL o úlcera de los chicleros, se caracteriza por una lesión, apareciendo una pápula, placa o nódulo, que se ulcera, se presenta en diferentes tamaños, en ocasiones múltiple, redonda, indolora, indurada, con fondo limpio, granulomatoso, con nódulos subcutáneos indoloros, algunos de ellos contienen parásitos alrededor de la lesión primaria. Puede presentarse una erupción papular, por una reacción de hipersensibilidad. Tienden a la curación en forma espontánea, de los 6 meses a los 2 años, dejando una cicatriz hipo o hiperpigmentada. Si afecta el lóbulo de la oreja, deja cicatriz perenne. La mayoría de estos pacientes presentan una respuesta primaria inmune, sin embargo el 10% de ellos se reinfectan secundariamente y puede confundirse el diagnóstico. Las principales cepas que producen este cuadro son *L. major*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*.



Leishmaniosis cutánea localizada

B.-En la LCD existen nódulos que están infestados de parásitos que se diseminan por vía linfática hacia el torrente sanguíneo, algunos casos están afectados a nivel de mucosas orofaríngea y nasal. Existen abundantes parásitos en macrófagos vacuolados. Produce anergia específica a la tuberculina, la candidina y a la leishmanina, suele ser refractaria a medicamentos específicos. Los causantes de este cuadro son *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi*. Esta presentación recidiva hasta hacerse crónica.



Leishmaniosis cutánea diseminada

C.- La LMC o "Espundia" se inicia a los dos años de las primeras lesiones (una tercera parte de los pacientes no tienen antecedentes de lesiones), se disemina por contigüidad, por vía hemática o linfática, afecta a las mucosas nasales y faríngeas, el paladar, la porción cartilaginosa del tabique nasal, provocando la "nariz en tapir" y los labios, respetando las estructuras óseas. Es resistente a quimioterapia y no cura espontáneamente. Sus principales causas de muerte son por neumonía aguda y por la desnutrición que se provoca. Las cepas productoras de esta forma clínica son *L. braziliensis braziliensis* y *L. braziliensis panamensis*.



Leishmaniasis mucocutánea

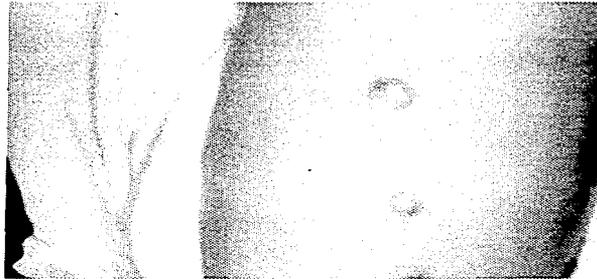


Leishmaniasis visceral

D.- La LV o kala-azar es producida por *L. donovani*, *L. chagasi*, o *L. infantum*. Predomina en hombres. Posterior a un período de incubación de 2-4 meses, se presentan cuadros febriles, biapicales, con malestar general, anorexia, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia e hiperglobulinemia. Durante la fase aguda, se oscurece la piel, por lo que recibió el nombre de "fiebre negra", se ha propuesto como causa de este signo, un incremento en la actividad melanoblástica. La piel se torna seca, rugosa, con pelo tan frágil que se llega a la alopecia. Existe una inmunidad celular deprimida que predispone a estos pacientes a infecciones secundarias. En el 95-98% de los pacientes el tratamiento se aplica con éxito.

En México, las formas comunes son la LCL y la LCD, además, en Tabasco se ha identificado un cuadro de Leishmaniosis esporotriciforme que es de difícil tratamiento y se caracteriza por presentar anergia a la intradermorreacción.

A diferencia de otros países, los pacientes de esta zona, son resistentes al glucantime, medicamento antimonial que se ha empleado en el tratamiento de pacientes con leishmaniosis. (2), (3), (4), (6), (8) y (12).



Leishmaniosis esporotriciforme

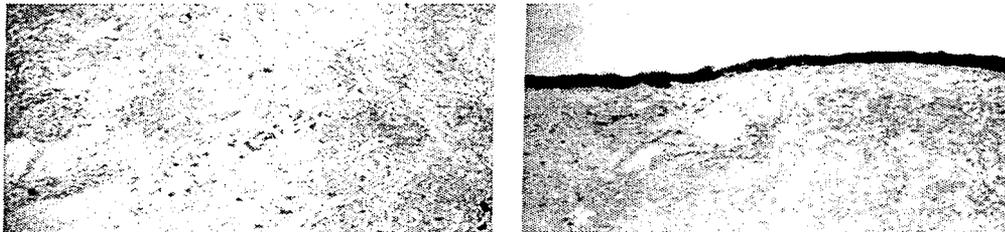
5.- A través de la impronta en lesiones, que consiste en colocar el portaobjetos en la lesión y se realiza una tinción con Hematoxilina-Eosina o Giemsa, se identifica al parásito al microscopio de luz.



Improntas de lesiones en pacientes con Leishmaniosis

6.- La intradermorreacción de Montenegro, nos traduce una respuesta dependiente de linfocitos T. Es una prueba cutánea de hipersensibilidad retardada, donde se emplea la leishmanina, obtenida al atenuar a los parásitos con fenol, o un antígeno soluble, utilizado por Masato y col., quienes aplicaron el método de Reed y col., donde se recolectan los promastigotes de leishmania, se lavan cinco veces con solución salina, el botón se resuspende en 5 volúmenes de agua destilada, alternando el proceso de congelación por hielo seco y acetona con agua tibia por diez veces, se lisan los promastigotes, se diluyen en buffer de fosfato salina (PBS) y se centrifugan a 10 000g durante 3 minutos a 4 grados C., el sobrenadante se ajusta a una concentración de 25 microgramos de proteína por ml., se filtra con una membrana milipore estéril de 0.45 micras. Se administra .1 ml de este antígeno por vía intradérmica en la superficie anterior del antebrazo. La lectura se realiza a las 48 hrs y se considera positiva esta prueba diagnóstica, cuando hay induración mayor de 5 mm., con o sin presencia de eritema. No existen falsos positivos, solo se debe tomar en cuenta la anergia que presentan los pacientes con LCD y con LV (2), (8) y (29).

7.- La biopsia de las lesiones se realiza, con previa asepsia y antisepsia de la región, se aplica anestésico localmente, se toman fragmentos con material estéril (bisturí o sacabocado) fijando algunos en parafina; otros fragmentos se introducen al medio de cultivo para el cultivo de los parásitos. En el estudio histopatológico se observa la respuesta celular alrededor de las lesiones, cambios epidérmicos y dérmicos, como la hiperqueratosis, paraqueratosis, la atrofia epidérmica o la acantosis, en algunos casos se observan abscesos intraepidérmicos. Puede apreciarse degeneración a nivel de la capa basal y aumento en la melanina en el caso de LV. En la dermis, hay predominio de infiltrado mononuclear (linfocitos e histiocitos), éstos últimos llenos de leishmanias. Pueden detectarse granulomas y células de Langerhans. en esta presentación clínica, se puede recurrir a la biopsia hepática, esplénica o de médula ósea. En la LMC. Actualmente se hacen estudios en el departamento de medicina experimental de la Facultad de Medicina por la Dra. Becker y col., con biopsias de lesiones y anticuerpos marcados con peroxidasa para localizar a las células T (CD4-CD8), macrófagos y células de Langerhans que intervienen en como respuesta en la leishmaniosis.



Biopsias tomadas de pacientes con Leishmaniosis

8.- Los parásitos se cultivan en medios como el Nicolle, Novy y Mc. Neal (NNN), compuesto con agar simple, no nutritivo, cloruro de sodio aguadestilada y sangre de conejo desfibrinada. El medio de Schneider, que es un medio líquido, con complemento de suero fetal bovino. El medio RPMI-1640 suplementados con suero fetal bovino.

Los parásitos se aíslan de las lesiones, desinfectando primero el área con agua y jabón, se introduce una jeringa que contiene 0.5 ml de solución salina, se realiza un movimiento rotatorio y se aspira jalando el émbolo, el contenido se coloca al medio seleccionado y se revisan constantemente estos medios, cuidando de mantenerlos a temperatura de aproximadamente 23 grados C. Se debe tener en cuenta que los parásitos son termolábiles. (3) y (8).

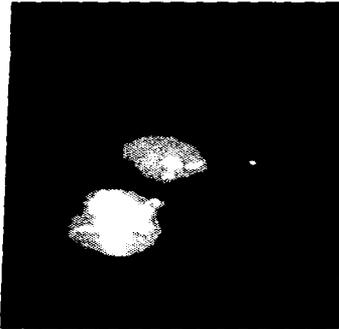
9.- En el xenodiagnóstico, se emplean animales de laboratorio (ratones BALB/c y hamsters), susceptibles a esta patología, a los que se les inocula en el cojinete plantar, el contenido de las lesiones, para desarrollar en ellos un cuadro sugestivo de esta parasitosis, con el objetivo de mantener la cepa. (3) y (7).



Animales de experimentación
empleados en el diagnóstico de
la leishmaniosis.

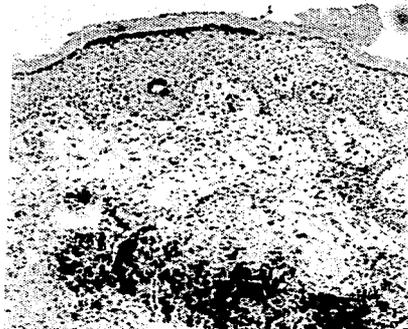
10.- En el estudio por isoenzimas se detectan proteínas que existen en los parásitos, el producto se somete a electroforesis con acetato de celulosa (CAE). Se pueden analizar los sistemas enzimáticos que representan los productos de los genes. Mediante esta técnica se han podido establecer clasificaciones y especificaciones de las cepas causantes de los cuadros, sin embargo, algunos aislados presentan patrones enzimáticos tan similares que dan origen a confusión en la interpretación de los resultados. (8) y (32).

11.- En ocasiones es difícil demostrar la existencia de protozoarios en muestra de tejido y aislarlos de las lesiones activas, por lo que se recurre a la búsqueda de anticuerpos específicos para leishmania por inmunofluorescencia indirecta (IFI), donde se detectan anticuerpos en los sueros de pacientes y se emplean parásitos y antigama-globulina marcada con isotiocianato de fluoresceína y en los casos positivos se observan éstos de color verde brillante con los sueros diluidos 1:16, con una sensibilidad del 97.2% y una sensibilidad del 98.7% (30) y (31).



Tinción de Inmunofluorescencia para observar leishmanias

Se pueden emplear anticuerpos marcados con peroxidasa para observar a los linfocitos que intervienen en la lesión producida en la leishmaniosis.



Anticuerpos antilinfocitos marcados con peroxidasa en la leishmaniosis

En las técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA) se emplea como antígeno el extracto soluble de promastigotes, los anticuerpos en el suero de pacientes se manifiestan con antigamaglobulina conjugada con peroxidasa y como sustrato se utiliza la ortofenilendiamina (OPD) y la técnica de dot Blot que consiste en una microtécnica donde se usa como antígeno suspensión de promastigotes que se colocan en un papel de nitrocelulosa y se leen los resultados a simple vista; con estas técnicas se pueden identificar las cepas de las diferentes leishmanias. En ocasiones se ha empleado la técnica de ELISA para cuantificar las citoquinas o anticuerpos IgG, sin embargo, los títulos de estos anticuerpos son muy bajos, en los casos de LCL, no así en LMC, LCD y LV. En la evaluación que practicó Masato Furuya y col. compararon la utilidad de la intradermorreacción (ID) y de la técnica de ELISA y siguieron el método descrito por Mimori; consideraron positivos aquellos valores que mostraban una absorbancia espectrofotométrica de 250 a 500 nm, concluyeron que son de gran utilidad la ID y la técnica de ELISA en el diagnóstico de pacientes con leishmaniosis activas y cicatrizadas en áreas endémicas. Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos para localizar la presencia de estos parásitos (29).

12.- Actualmente se ha estudiado la secuencia del ADN en cepas de referencia, con análisis moleculares. (19).

13.- La hibridación se realiza con sondas específicas para la especie, se somete el producto a una reacción de cadena en polimerasa (PCR), traspasando esta imagen a una membrana de celulosa, imprimiéndola y analizándola.

14.-A las cepas también se les practica análisis secuencial ribosómico del ADN.

15.- Finalmente el estudio de los minicírculos del kADN con estudio posterior de PCR, utilizando sondas especie-específicas. Se puede identificar una secuencia en una región conservada del ADN, entre especies, de aproximadamente 208 pares de bases. (en algunos estudios éstas se emplean como sondas diagnósticas). El PCR emplea también una polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos para amplificar una secuencia, a través de 30 ciclos en un termociclador que permitirán la desnaturalización, alineación y elongación del segmento de ADN. En el estudio que practicó Maarten H. L. de Bruijn y D. C. Barker emplearon oligonucleótidos de 19 a 21 pares de bases, con una temperatura media de alineamiento de 68 grados C. Con esta técnica se detectan fragmentos de DNA que equivalen a 1000 minicírculos de 750 pares de bases. La técnica de PCR se aplica en estudios epidemiológicos, para identificar vectores y reservorios o bien para establecer la frecuencia de infecciones latentes que existen en una población. La técnica de PCR es útil para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la leishmaniosis (38), (39), (40), (41), (42), (43) y (44).

TRATAMIENTO

No existen drogas en esta parasitosis que sean 100% efectivas, además muchos de los medicamentos empleados presentan múltiples efectos adversos. Existen métodos físicos que se han empleado en el tratamiento de la leishmaniosis, como la irradiación (usada en Israel), la congelación con N₂ líquido o CO₂ sólido y el calor local, su uso se limita a la República Dominicana y México, en lesiones recientes o donde las placas o nódulos no sean muy amplias. Existen cremas para aplicación tópica (en un ensayo en Israel), donde se mezcla paromomicina con metilbenzatonio en un vehículo que puede ser vaselina.

En el Viejo Mundo se han empleado los tratamientos locales, la paromomicina, antifúngicos, estibogluconato sódico; sin embargo, los resultados no han sido muy alentadores. También se ha recurrido al empleo de Dapsone 200 mg/día/45 días, de la Rifampicina en dosis de 600-1200mg/día. El metronidazol a dosis de 250 mg 3 veces al día durante 3 ciclos de tratamiento con duración de 10 días cada uno. Se ha recurrido al empleo de Aminosidina. En Brasil y Colombia, ha resultado eficaz el Nifurtimox, en dosis de 10 mg/kg por un mínimo de 4 semanas.

En el Nuevo Mundo se han empleado los medicamentos antes decritos y se ha observado además efectividad al emplear pentamidina a dosis de 4 mg/kg de peso tres veces por semana durante 5 a 25 semanas y la Anfotericina B a dosis inicial de 5-10 mg hasta llegar a una dosis de 0.1-1.0 mg/kg y se determina una dosis total de 1.0-3.0 grs, se aplica diario o tres veces por semana por infusión intravenosa en 5% de dextrosa. Otro medicamento, el Alopurinol se integra al metabolismo de las purinas de las leishmanias, a dosis de 20 mg/kg/día en 4 dosis divididas por 15 días, se ha empleado, solo o combinado. El ketoconazol y el itraconazol han resultado efectivos, al interferir con la biosíntesis de la membrana, inhiben la desmetilación del lanosterol y del ergosterol que son indispensables para la estabilidad de la membrana. Los medicamentos de elección para esta parasitosis, han sido el antimonio de meglumina "Glucantime" (10 ml diarios IM, o 20 mg/kg/día durante 20 días), que contiene 8.5% de antimonial pentavalente (Sb5+), es la droga de preferencia en la República Mexicana. Interrumpe la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico, inhibiendo la síntesis de adenosín y guanosín trifosfato (ATP y GTP).

El estibogluconato de sodio "Pentostam" (8.5 ml diarios IV muy lenta) que contiene 10% de Sb5+, con una dosis máxima de 850 mg por un mínimo de 20 días, es otra droga que se emplea en leishmaniosis.

Actualmente se encuentran en etapa de investigación las inmunoterapias como vacunas, en Brasil, se produce una vacuna de promastigotes muertos, en casos de LC, el uso de interferones y de las interleucinas así como la terapia con múltiples drogas

para evitar la resistencia del parásito. (3), (8) y (51).

Sin embargo la Dra. Becker y col. han encontrado pacientes tratados ya con esta droga y actualmente presentan recidivas y exacerbación de la enfermedad.



Paciente originario de Veracruz con
leishmaniosis cutánea diseminada,
recidivante

TECNICA DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMORFICA (RFLP).

El RFLP consiste en el empleo de enzimas, obtenidas de diferentes bacterias que digieren segmentos del kADN en estudio, aquí se requieren cantidades significantes de este ADN. Peter R. Jackson y col, emplearon enzimas de restricción para digerir el kADN en fragmentos que se separaban por electroforesis en geles de agarosa o en gradiente lineal de geles de poliacrilamida, los fragmentos similares que se obtienen, demuestran que los parásitos pertenecen al mismo zymodemo y genéticamente se relacionan.

M. C. Angelici y col., utilizaron enzimas de restricción, para diferenciar las leishmanias del viejo y del nuevo mundo y a cada fragmento obtenido se le evaluaba desde el punto de vista cualitativo (ausencia o presencia de bandas).

El polimorfismo del parásito se detecta por el número de fragmentos que se obtienen en la digestión. El RFLP es muy sensible para detectar polimorfismo en la secuencia genómica del parásito (21). Para realizar esta técnica, se recurren a las enzimas de restricción, en donde las mas frecuentemente utilizadas son las de tipo II, que se unen a una secuencia específica de nucleótidos y una metilasa separada que modifica la secuencia que reconoció. El RFLP puede detectar múltiples alelos en cada locus (31). Existen diversas enzimas de restricción, entre otras: (33), (34), (35), (36) y (37).

Cfo I.- incide en GCG-C
Eco RI.- incide en G-AATTC
Hind III.- incide en A-AGCTT
Hae III.- incide sobre GG-CC
KpnI.- incide sobre GGTAC-C
Hpa I.- incide en la secuencia GTT-AAC
Dra I.- incide en la secuencia TTT-AAA
Alu I.- incide sobre AG-CT



Endonucleasas de restricción

La enzima Hae III, obtenida del *Haemophilus aegyptus*, que tiene como característica que no se une al ADN cuando el residuo 5' tiene 5 metilcitosina, con sitio de corte en GG-CC.

La enzima Hpa II, que deriva del *Haemophilus parainfluenzae*, reacciona con un buffer a pH de 8 y a 37 grados centígrados, no se une al ADN cuando el residuo 3' tiene 4 o 5 metil citosina, con sitio de corte en C-CGG.

La enzima Dra I, se obtiene del *Deinococcus radiophilus*, corta en TTT-AAA.

La enzima Rsa I, deriva del *Rhodopseudomona sphaeroides*, reacciona con un buffer a 37 grados centígrados, corta en GT AC (20), (21) Y (26).

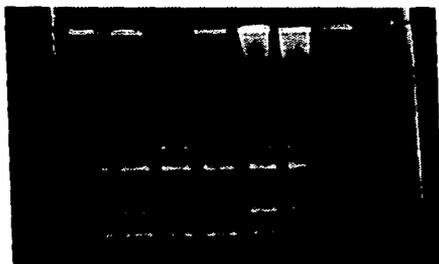
TECNICA DE AMPLIFICACION AL AZAR POLIMORFICA DEL DNA (RAPD).

El RAPD se inició en 1990. Es una reacción de cadena en polimerasa (PCR), que utiliza oligonucleótidos arbitrarios, generalmente son cortos, no específicos para *L. mexicana*. Identifica la presencia de un alelo.

Se aplica en cultivos de parásitos, libres de ADN contaminante, donde se requieren 25 nanogramos (ng) del ADN genómico; cuando el oligonucleótido es corto. El RAPD se practica para identificar segmentos genómicos del kDNA de las diferentes cepas. Esta técnica es muy sensible a los cambios de temperatura, por lo que la temperatura de alineamiento a la que se somete, debe ser baja. Los productos se visualizan en gel de agarosa y el polimorfismo que se obtiene sirve como marcador genético dominante. Los productos de este método se localizan entre 300 y 2500 pb. y varían según la calidad y la cantidad del ADN, los productos que se obtienen los han asociado a genes de virulencia. El RAPD discrimina entre subgéneros y especies, a través de un bandeo observado después del gel de electroforesis (no interviene la secuencia blanco del DNA ni la hibridación de éste). Solo se usa en cultivo de parásitos, libre de DNA huésped contaminante. El RAPD-PCR es muy sensible a variaciones mínimas.

En esta técnica se amplifican segmentos codificantes y no codificantes. Se pueden seleccionar oligonucleótidos que den una sola banda. Para detectar el producto del RAPD, se recurre a la impresión de la amplificación del ADN, donde se emplean oligonucleótidos de 5-8 pb, se visualizan en geles de acrilamida y con tinción de plata, también se pueden emplear oligonucleótidos arbitrarios con PCR (AP-PCR), mas largos, sus productos se marcan radioactivamente y se emplea gel de acrilamida. En el RAPD standard, se utilizan oligonucleótidos cortos, generalmente uno, de secuencia arbitraria, en donde sus productos pueden ser variables (polimórficos) y/o constantes (no polimórficos). El número de marcadores polimórficos se incrementa al aumentar el número de los oligonucleótidos, pero la información que se obtiene al emplear un par de éstos no es mayor que aquella cuando se emplea uno solo.

RAPD



AM LCD AG BR VI CR TP PM
Ejemplo de RAPD empleando 2 oligonucleótidos arbitrarios

OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA RAPD

- 1) 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
- 2) 5' AGCGGATAACAATTCACAGAGGA 3'

CEPAS DE LEISHMANIAS
AM - LCD - AG - BR - VI - CR

TP=TRYPANOSOMA CRUZI

PM=STANDARD DE PESO MOLECULAR

Entre las limitaciones para su uso, está el tamaño del oligonucleótido, que es importante en la especificidad en el genoma, entre mas pequeño, se reconocerá mayor número de secuencias y viceversa. Se ha observado un tamaño ideal de oligonucleótidos de aproximadamente 10 pb, donde el contenido de G-C en el oligonucleótido sea similar al contenido de G-C del genoma, en esta forma se maximiza la frecuencia de unión de los productos de la amplificación. Cualquier cambio en las condiciones de la reacción puede afectar la reproducibilidad de los productos. Entre los factores que afectan la sensibilidad en el RAPD está la temperatura, el tipo de polimerasa, la concentración de magnesio y del DNA en estudio.

El RAPD es muy sensible a la modificación de bases en el sitio en que incide el oligonucleótido, por lo que se ha empleado en análisis filogenéticos.

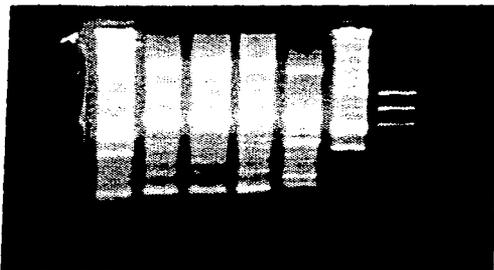
Los fragmentos amplificados son únicos, algunos de éstos son no reproducibles, probablemente por la no especificidad del oligonucleótido. En el caso de que la amplificación se repita 2 o mas veces, sí se pueden evaluar los marcadores.

El polimorfismo que se detecta por el RAPD, representan segmentos de DNA de un solo progenitor, heredados en forma mendeliana. John G. K. William y col., afirman que sí se pueden utilizar como marcadores genéticos y construir mapas genéticos, ellos observaron que la temperatura mayor de 40 grados C, impedía la amplificación; el oligonucleótido que emplearon fue de 9-10 pb, con un 50-80% de contenido de G-C. Actualmente es posible tener acceso a un equipo de oligonucleótidos universales. (28). Riddhi Bhattacharyya y col. utilizaron oligonucleótidos que derivan de la región variable de los minicírculos del KADN y que amplifican 461 fragmentos de diferentes especies de leishmanias. Los productos de la reacción final, dependen de la secuencia y de la longitud de los oligonucleótidos empleados y de las condiciones en que se lleva a cabo la reacción. En sus experimentos, la temperatura de alineamiento se mantuvo en 40 grados C, con duración de 40 ciclos, sometiendo su técnica al final del PCR a 72 grados C, durante 10 minutos, para que se complementara la amplificación. Cuando recurrían a oligonucleótidos arbitrarios, el patrón de bandas polimórficas diferenciaba las especies al igual que cuando se empleaban oligonucleótidos específicos, sus resultados fueron similares a lo que se obtuvo por el estudio de isoenzimas (25) y (31). Del mismo modo U. M. Morgan y col. (27) emplearon diversos oligonucleótidos, cuando analizaron por esta técnica a *Giardia duodenalis*, en donde les bastaba 1 ng de ADN para producir la presencia de bandas. Cuando se emplean un par de oligonucleótidos, la información final no es mayor, en comparación a cuando se utiliza un solo oligonucleótido. La concentración de cloruro de magnesio que utilizaron variaba de 1.5 a 4 mM, sin que las bandas obtenidas se alteraran (solo variaba la intensidad de ellas). Rachel E. Adamson y col. emplearon esta técnica para identificar especies de vectores muy relacionados, sus resultados fueron reproducibles y demostraron que este método no solo detecta miembros individuales de cada vector, sino también reconoce especies de diferentes focos geográficos. Afirman que es fácil y rápido generar los marcadores para el RAPD, no requiere información previa de secuencias específicas, ni marcadores peligrosos o reactivos caros.

Michel Tibayrene identifica también polimorfismos cuando estudió seis diferentes especies de protozoarios, con la técnica del RAPD y con enzimas multilocus, enfatiza sobre el costo moderado de esta técnica y logra demostrar la forma en que *Trypanosoma cruzi* tiene una propagación clonal, además adapta esta técnica a la reconstrucción histórica y en el análisis genético de la población, así como en el diagnóstico de las especies.

John G. K. Williams y col. observaron aproximadamente 5 bandas por cada base empleada, por ejemplo, cuando empleaban un oligonucleótido de 18 pares de bases, resultaban 90 pares de bases en el templado. La presencia de bandas confirma la equivalencia entre ellas, su identidad y establece similaridad en las secuencias de dos bandas segregadas de diferente peso molecular. (45), (46), (47), (48), (49) Y (50).

RAPD API



AG RC AQ JJV MJ TRY PM

Ejemplo de RAPD empleando 1 oligonucleótido arbitrario con las cepas de Leishmanias: AG, RC, AQ, JJV, MJ y *Trypanosoma cruzi* (TRY).
PM=peso molecular

DENDOGRAMA

Los resultados que se obtienen en el RFLP y en el RAPD, tomando en cuenta que son variables cualitativas, se determina el coeficiente de similaridad de Dice, donde, se analiza el resultado de los fragmentos de una cepa comparándolo con los obtenidos en todos los demás.

$$\frac{2c}{2c+a+b}$$

a= No. de bandas en A
b= No. de bandas en B
c= No. de bandas compartidas

Los resultados que se obtienen oscilan en la escala entre 0 y 1. Se puede emplear el análisis determinando el coeficiente de similaridad de Jacquard, que tiene una escala entre 0 a 0.5, donde se aplica la siguiente fórmula:

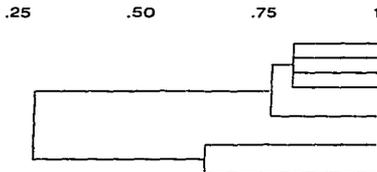
$$Sab = \frac{a}{(a+b+c)}$$

a= No. de bandas en A
b= No. de bandas en B
c= No. de bandas compartidas

El coeficiente de distancia de Jaquard (que es el inverso de la similaridad) y los resultados se localizan en un rango que oscila entre 1 y 0, se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Dab = 1 - (c(2a+2b+c))$$

Con el empleo del dendograma se agrupan las cepas con características moleculares similares.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, hay incremento en el número de pacientes que no responden a los tratamientos habituales. Hay algunos que presentan una severidad inesperada. Para resolver este problema, se necesita identificar si existen variaciones genéticas intra-especie entre *Leishmania mexicana mexicana*.

HIPOTESIS

En México las leishmanias responsables de los cuadros clínicos, se han caracterizado por el empleo de isoenzimas (24) y anticuerpos monoclonales, en donde se ha concluido que *L. mexicana mexicana* es responsable de esta gama de cuadros. Sin embargo, en vista de la variación en las manifestaciones clínicas y de la resistencia a drogas, se ha sospechado que existan variaciones genéticas intraespecie que fueran las causantes de estos fenómenos clínicos, lo que motivó que se recurriera al análisis de las cepas por la técnica de RFLP y RAPD.

H1.- Hay variaciones genéticas intraespecie que son responsables de la diferencia en la virulencia de los cuadros clínicos.

Ho.- No existen variaciones genéticas, puede pensarse en la introducción de nuevas especies en la República Mexicana, o bien que existan factores que promuevan la inmunodepresión en el huésped, o que surjan mutaciones en las cepas causantes de los cuadros clínicos.

OBJETIVOS

- 1.- Aislar el kADN obtenidos de parásitos que producen diferentes cuadros clínicos de leishmaniosis cutánea, provenientes de las diferentes áreas endémicas de la República Mexicana.
- 2.- Analizar el kADN mediante endonucleasas de restricción.
- 3.- Analizar el kADN mediante RAPD, con un oligonucleótido arbitrario para *Leishmania mexicana mexicana*.
- 4.- Correlacionar los resultados de los estudios con los cuadros clínicos de los pacientes.

CARACTERISTICAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL

Se incluirá el kADN obtenido de parásitos de pacientes con LCL y LCD.

CARACTERISTICAS DEL GRUPO CONTROL

Se contará con el kDNA obtenido de leishmanias provenientes del Medio Oriente (LCD de Irán) y el kDNA de *Trypanosoma cruzi* (como control negativo).

Se seleccionan al azar pacientes con leishmaniosis cutánea localizada con y sin tratamiento y con leishmaniosis cutánea diseminada con mas de tres lesiones nodulares en piel, que presenten positividad a la impronta y a la reacción de Montenegro.

UNIVERSO DE TRABAJO

Se analizará el kADN de los parásitos aislados en pacientes con lesiones de LCL y LCD en las zonas endémicas de los estados de Tabasco, Campeche y Veracruz.

CRITERIOS DE INCLUSION

Se integrarán los parásitos provenientes de pacientes con LCL, con reacción de Montenegro positiva, impronta positiva y sin tratamiento reciente.

Se integrarán los parásitos que provienen de pacientes con LCD, con mas de tres lesiones nodulares en piel, con impronta positiva, sin tratamiento reciente.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

No se incluirán los parásitos de los pacientes con LCD que presenten además padecimientos agudados infecciosos, a quienes no se les integre el diagnóstico.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Se eliminarán las lesiones que presenten contaminación bacteriana, del mismo modo las muestras que presenten algún contaminante.

VARIABLES DEPENDIENTES

En las variables dependientes se tomarán en cuenta los pacientes con lesiones con características del cuadro clínico y que provengan de los lugares de origen antes mencionados.

Los amastigotes que se comprueben en biopsia y los promastigotes en cultivo con RPMI.

Pacientes con lesiones en donde los parásitos muestren una imagen en las técnicas empleadas semejante a L. mexicana mexicana.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Se considerarán las imágenes de bandas que se obtendrán por las dos diferentes técnicas en LCL y LCD.

ESCALA DE MEDICION DE LAS VARIABLES

Se recurrirá al uso del Dendograma.

MATERIALES Y METODOS (RFLP Y RAPD)

1, 2 u 8 ul de kADN
1 ul de buffer
0.5 ul de enzima
el resto de agua destilada (para aforar a 10 µl en total)
Solución salina
Agua estéril
Jabón quirúrgico
Medio monofásico RPMI
Suero fetal bovino
Cloruro de sodio y citrato sódico (SSC) al .15 M
Cloruro de Cesio 6M y 3 M
Solución Tris Borato EDTA (TBE IX)
Solución de Bromuro de Etidio
Cloruro de Magnesio
Oligonucleótido arbitrario no específico para Leishmania mexicana mexicana.
AP1 5 "AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3"
Desoxinucleótidos: (dNTP) que incluyen: dATP, dCTP, dGTP y dTTP
Solución "Stop mix"
Agarosa
Agua destilada
Acrilamida
Persulfato de Amonio
Vaselina
Enzimas de restricción (Hae III, Hpa II, Alu I y Dra I)
Pipetas Pasteur
Tubos de ensayo de polipropileno de 14 ml
Tubos Eppendorf
Papel parafilm
Puntas para micropipetas (0.5, 10, 20 y 50 µl)
Microcentrífuga
Ultracentrífuga
Aparato Vortex
Incubadora (37 grados C)
Equipo "Programable Thermal Controler" M.J. Research Inc. PTC100
Transiluminador de Luz Ultravioleta
Cámara Polaroid
Microscopio de luz

Animales de experimentación (ratas de la cepa Balb/c)

Cepas de parásitos a emplear en esta tesis:

En LCD

AG Clave MHOM/MX92/INDRE AG

AM MHOM/M92/INDRE AM

Ambas de la especie *L. mexicana mexicana*, tipificada por Kreutzer, por identificación de zymodemos y por Mac Mahon por la determinación de anticuerpos monoclonales.

En LCL:

527

RC

CARLOS

Tipificados con anticuerpos monoclonales como *Leishmania mexicana mexicana*.

La cepa Aquitofel, con clave MHOM/MX/94/INDRE AMC, de la especie *L. mexicana mexicana*, tipificada por el laboratorio de Sarabia, corresponde a una presentación de leishmaniosis predifusa (LCPD), con una evolución parecida a una esporotricosis linfática y posiblemente corresponde a una LCD en estadios iniciales.

PREPARACION DE GEL DE AGAROSA

Se utiliza agarosa ultra PURE de los laboratorios GIBCO BRL, 0.24 mg, en 20 ml de solución Tris Borato EDTA, (TBE) 1X, disolviendo esta mezcla en un matraz, colocándola en un horno de microondas durante 1 min. hasta disolverse completamente. Depositándola en la caja central del equipo para electroforesis Horizon 58" de GIBCO BRL Modelo 250, que contiene un peine de dientes gruesos, se vierte el gel disuelto y se deja gelificar durante 30-40 min. Se retira el peine y se llena el depósito con solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X.

AISLAMIENTO DE CEPAS

Para aislar las distintas cepas de leishmanias de los pacientes, se procederá de la siguiente manera: Se inoculan 50 microlitros de solución salina en el borde activo de la lesión previamente lavada cuidadosamente con agua y jabón, se aspira material de dicha lesión y se inocular a un medio de cultivo de RPMI monofásico enriquecido con 10% de suero fetal bovino (en condiciones de esterilidad), o bien se inocular el aspirado de la lesión en animales susceptibles por vía subcutánea (ratones BALB/c), hembras o machos, de 6-8 semanas de nacidos, que pertenecen al bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina. Después de dos meses aproximadamente, se obtienen de las lesiones, los parásitos, que se inoculan en el medio RPMI, se revisa éste por primera vez, a los 4 o 5 días, empleando microscopio de luz, se continúa su revisión, hasta alcanzar un promedio de 1×10^9 promastigotes.

LISADO DE PARASITOS

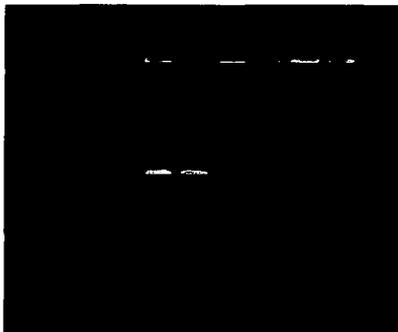
Una vez obtenidos los parásitos, se resuspenden en 2 ml de NaCl al 0.15 M y citrato sódico (SSC), a un pH de 7.2, se colocan a 37 grados C, durante 15 min., el contenido se pasa por una aguja del No. 18 aproximadamente durante 8 ocasiones, para contribuir al lisado del kDNA.

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

OBTENCION DE KDNA

Posteriormente se inicia el aislamiento del DNA del cinetoplasto (kDNA) del parásito, de acuerdo a la técnica empleada por Cheng y Simpson. (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19) y (20), donde:

- 1.-Se colocan alícuotas de este lisado y se someten a una separación por gradientes utilizando 1ml de cloruro de cesio (Cscl) al 6M y 6.6 ml de Cscl al 3M, con 2 ml de la muestra.
- 2.-La mezcla se coloca en un rotor SN 40, centrifugando 30 min. a 20000 rpm., a 5 grados C., se observan 4 capas.
- 3.-Separan las dos primeras, (que incluyen la capa mas superficial del lisado de células y 2.5 ml de la capa de Cscl al 3M).
- 4.-Se añaden 2 ml de SSC, agitando enérgicamente, cubriendo el tubo con parafilm
- 5.-Centrifugar por segunda ocasión en las mismas condiciones.
- 6.-Eliminar 4 ml del sobrenadante y reemplazar con 4 ml de SSC
- 7.-Centrifugar nuevamente por 2 veces mas
- 8.-Decantar las soluciones, manteniendo los tubos invertidos durante 10 min.
- 9.-Resuspender el KDNA del fondo del tubo en 80 microlitros de solución Tris EDTA al 10 mM, con un pH de 8.0.
- 10.-Corroborar la presencia del kDNA, por electroforesis.



Comprobación del aislamiento del kDNA en los carriles, exceptuando el 9o. que no contiene

MATERIAL Y DESARROLLO DE LA TECNICA DE RFLP

Una vez identificado el kDNA se emplean las enzimas de restricción, que tienen como promedio 1 hora para llevar a cabo la reacción, sin embargo, en este experimento se mantuvieron durante 18 hrs.

El material que se empleó es el siguiente:

-0.5 µl de enzimas de restricción

1 µl de buffer

7.5µl de agua destilada

esta mezcla se somete a incubación a 37 grados C durante 18 hrs. Se agregan 2 µl de "stop mix", se centrifugan instantáneamente y se corren en gel de agarosa, siempre con un standard de peso molecular que incluía

7 µl de agua destilada

2 µl de "stop mix"

1 µl de enzima de restricción Hae III 174. (esta enzima corta de 72 a 2000 pares de bases).

Los fragmentos de la digestión se separan en un gel de agarosa al 1.2%. El kADN de cada cepa, se somete a una fuente de poder, aplicando 82 mv., posteriormente el gel se introduce en solución de Bromuro de etidio, para visualizar con un transiluminador de luz ultravioleta las bandas que indican el producto final del kDNA en estudio.

Finalmente se fotografían estos resultados con una cámara Polaroid.

MATERIAL Y DESARROLLO DE LA TECNICA DE RAPD

Para realizar la técnica de Amplificación al azar polimórfica del DNA, se requiere:

20 µl de cada cepa a analizar,

3 µl de cloruro de magnesio,

5 µl de buffer con o sin magnesio,

1.3 µl de dNTP mix.

1 µl de reactivo "forward" AP1,

1.3 µl de Taq DNA polimerasa

17.3 ul de agua destilada,

50 µl de aceite mineral para cubrir la mezcla y evitar evaporación.

Esta mezcla se vierte en un tubo eppendorf, colocándolo en el equipo para PCR "Programmable Thermal Controler", con un programa, con duración de 29 ciclos de desnaturalización, alineación y elongación del kDNA en estudio.

La temperatura media se calcula:

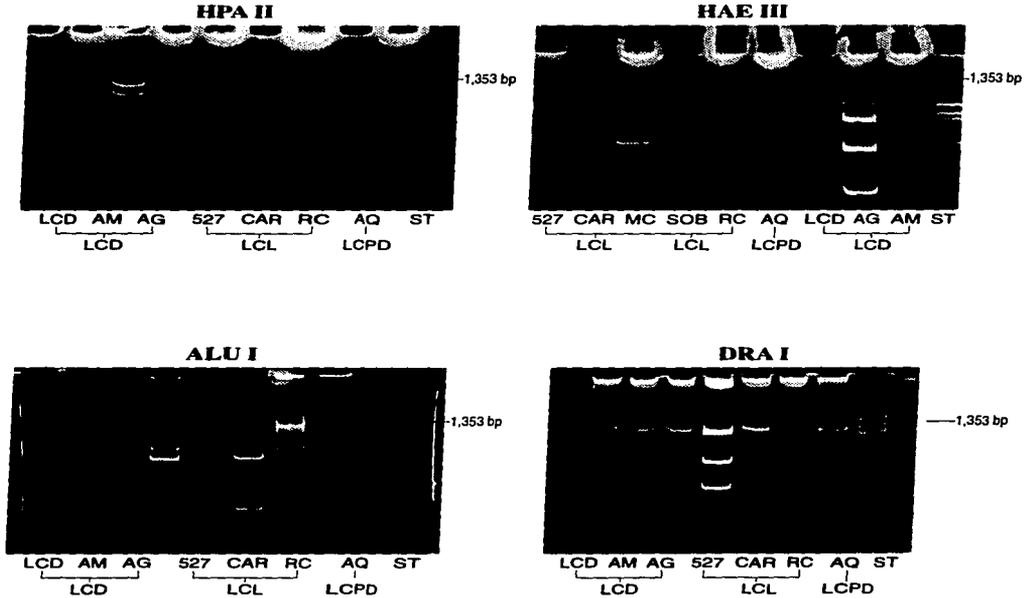
$2(\text{No. A} + \text{No. T}) + 4(\text{No. C} + \text{No. G}) - 5 \text{ grados C.}$

Al finalizar estos ciclos, se extraen los 50 µl de aceite mineral y se toman 20 µl de la mezcla, se le agregan 4 µl de solución "stop mix", colocándolo en un gel de agarosa y/o poliacrilamida, con el empleo de un peine de dientes gruesos, se incluye nuestra muestra standard de peso molecular. En la cámara de electroforesis se somete a 84 mv. y se inicia la separación de proteínas que integran el fragmento en estudio, enseguida se somete este gel a bromuro de etidio durante 5 minutos, observando las diferentes bandas, en la lámpara de luz ultravioleta, tomando fotografías con la cámara Polaroid, para conservar la imagen.

RESULTADOS

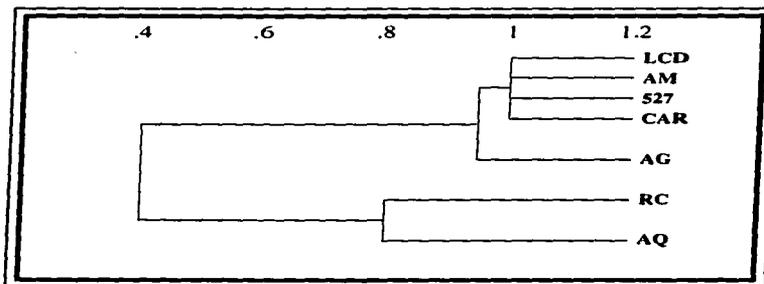
FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMORFICOS. RFLP

Las cepas de leishmanias: LCD, AM y AG, son responsables de cuadros de leishmaniosis cutánea diseminada y al someterlas a fragmentación con las enzimas de restricción HPA II, HAE III, ALU I y DRA I, nos dan imágenes similares. *Fragmentos obtenidos al emplear la enzima de restricción que corresponda.*



Las cepas: 527, CAR y RC pertenecen a cuadros clínicos de leishmaniosis cutánea localizada. Los fragmentos que se obtienen con la digestión de las enzimas de restricción en las cepas 527 y CAR son idénticas, mientras que la imagen obtenida en RC se asemeja a la que se obtuvo en la cepa AQ, que corresponde a una leishmaniosis cutánea predifusa.

Al analizar los fragmentos de las bandas obtenidas por el método del dendograma, se observan dos grupos de cepas: Uno formado por LCD, AM, 527, CAR y AG, y que demuestran similitud entre ellas. Otro grupo lo integra RC y AQ, con gran similitud molecular entre éstas dos.

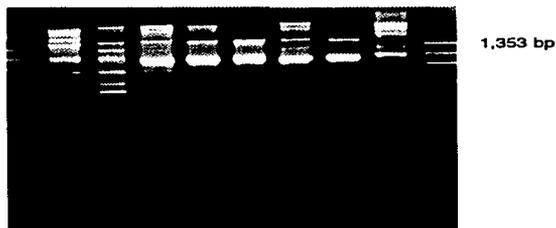


Análisis por el dendograma de los fragmentos que se obtienen de las diversas cepas de leishmania al someterlas a enzimas de restricción

AMPLIFICACION AL AZAR POLIMORFICA DEL DNA. RAPD

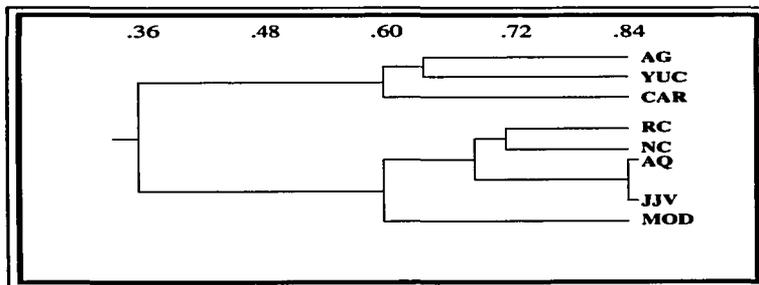
En esta técnica, los resultados demuestran que el oligonucleótido API, permite la separación de dos grupos: uno integrado por las cepas AG, CAR y YUC, que se obtuvieron de cuadros de leishmaniosis cutánea localizada y otro grupo, formado por RC, AQ, NC, JJV y MOD, que son cepas que pertenecen a cuadros clínicos de leishmaniosis cutánea predifusa, exceptuando a RC que se asocia a leishmaniosis cutánea localizada.

RAPD API



PM AG CAR RC AQ MOD JJV NC YUC PM
 LCD LCL LP LCL

Fragmentos obtenidos de las diversas cepas de leishmanias por RAPD.



Análisis por el dendograma de los fragmentos obtenidos por RAPD empleando el dendograma

CONCLUSIONES

La Leishmaniosis es una parasitosis que produce una gran variedad de cuadros clínicos dependiendo de la especie de leishmanias de que se trate, del vector, del inóculo de parásitos y del estado inmunológico del huésped.

Hasta la fecha uno de los grandes enigmas en la leishmaniosis es el entender la causa de la diseminación del parásito en algunos pacientes.

En ningún estudio anterior se ha podido correlacionar a una especie con un cuadro clínico específico por lo cual siempre se ha sospechado que intervengan un fondo genómico y la respuesta inmune como factores decisivos en la presentación clínica del padecimiento.

Este es el primer estudio hecho en México en donde se encontró que dentro de una especie puede haber variación genética, que se puede correlacionar con el cuadro clínico de leishmaniosis cutánea predifusa.

En este estudio todos los parásitos usados se han tipificado por anticuerpos monoclonales e isoenzimas como *Leishmania mexicana mexicana*; sin embargo por biología molecular se ha detectado variación dentro de una misma especie.

Se debe alertar al médico a realizar una búsqueda específica de la cepa causante y, practicar un seguimiento en aquellos casos en donde se obtengan patrones de fragmentos similares a cepas que producen cuadros más severos, como son la leishmaniosis cutánea predifusa y la leishmaniosis cutánea diseminada.

Se someterá a nuevos estudios la posibilidad de introducción de nuevas especies en México.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- *Revista Science*. Octubre 1983.
- 2.- **INDRE**. Colección de Cuadernos Técnicos del INDRE. Publicación Técnica No. 7. 1994.
- 3.- **Epidemiología, Diagnóstico, Tratamiento y Control de las leishmaniasis en América Latina**. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Versión 2.0 1994.
- 4.- *Introduction to Parasitology*. Chandler/Read. Seventh
- 5.- *Medical Microbiology*. Mims, Playfair, Roitt y col. Edit. Mosby. 1994.
- 6.- *Parasitología Médica*. Tay-Lara. Editor Fco. Méndez Cervantes.
- 7.- *Essential Immunology*. Ivan Roitt. Blackwell. Scientific Publications. Seventh Edition.
- 8.- **Leishmaniasis**. Suzanne A. Grevelink et al. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Feb. 1996. 34. 257-272.
- 9.- **Invasion, control and persistence of leishmania parasites**. Christian Bogdan et al. *Current opinion in Immunology* 1996. 8. 517-525.
- 10.- **Estudios sobre la leishmania en el nuevo mundo y su transmisión, con especial referencia al Ecuador**. Yoshihisa Hashigueti. Kochi City Kochi, Japan 1995. Serie de reportes de investigación No. 1. 1995.
- 11.- **Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco**. Candelaria Córdova Uscanga y col. *Salud Pública Mex.* 1993. Vol. 35.
- 12.- **Leishmaniasis muco-cutánea (Espundia) en México**. Informe de 3 casos en el estado de Tabasco. Gabriel M.- Mandujano Vera y col. *Patología*. Vol. 28.
- 13.- **Incidence of localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in Mexico**. Fdo. J. Andrade-Narvaez et al. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84. 1990.
- 14.- **Vectores de la leishmaniasis cutánea en México**. Nelly E. Albertos-Alpuche. *Rev. Biom.* Vol. 1 No. 2. Abril-junio 1990.
- 15.- **Immunology of leishmaniasis**. Richard M. Locksley 1992. *Current opinion in Immunology*. 1992. 4. 413-418.
- 16.- **Role of cytokines in killing of intracellular pathogens**. F. J. Liero. *Immunology letters* 3091. 193-198 Elsevier.
- 17.- **The regulation of immunity to Leishmania major**. Steven L. Reiner y Richard M. Locksley. *Annu. Rev. Immunology*. 1995. 13 151-177.
- 18.- **Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper Type 1 Immune response**. seph P. Sypek et al. *J. Exp. Med.* Vol. 177 June 1993. 1797-1802.
- 19.- **Molecular approaches to DNA diagnosis**. D. C. Barker. *Parasitology* 1989. 99. 125-146.
- 20.- **Los Cromosomas de Leishmania**. G. K. Lighthall and S. H. Giannini. *Parasitology today*. Vol. 8. No. 6. 1992.
- 21.- **The Assembly of Kinetoplast DNA**. J. Shlomai. *Parasitology today*. Vol. 10. No. 9. 1994.
- 22.- **Structural organization of kinetoplast DNA and its compaction in the vitro model**. Larissa P. Martinkina et al. *European Journal of Cell Biology*. 56. 123-131. 1991.
- 23.- **Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergence**. William O. Rogers and Dyann F. Wirth. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84. 565-569. Jan. 1987.
- 24.- **Evasion strategies of Leishmania parasites** by Christian Bogdan et al. from the Institute of Clinical Microbiology University of Erlangen-Nürnberg. Wasserturmstrabe 3D-8520 Erlangen/West Germany.
- 25.- **Surface Acid Proteinase (gp 63) of Leishmania mexicana**. Gautam Chaudhuri et al. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 264. No. 13. Issue of May.
- 26.- **The major surface glycoprotein (gp 63) is present in both life stages of Leishmania**. Thomas Frommel et al. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Vol 38. 25-32. 1990.
- 27.- **Identification of the promastigote surface protease in seven species of Leishmania**. Jacques Bouvier et al. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 24. 73-79. 1987.

- 28.- Leishmania major surface protease, gP 63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. Anne L. Sorensen et al. *APMIS* 102. 265-271. 1994.
- 29.- Evaluación de la Intradermoreacción y ELISA en el estudio epidemiológico de la leishmaniosis. Masato Fumura y col. Cap. 6 de la serie de reportes de investigación No. 1. Japón 1995.
- 30.- Antibodies monoclonales that distinguish subspecies of Leishmania. Mc. Mahon Pratt et al. *Nature* 291. 581-583. 1982.
- 31.- Subspecies and species specific antigens of Leishmania mexicana characterized by antibodies monoclonales. Mc. Mahom. *J. Immunology* 134. 1935-1940. 1985.
- 32.- Identification of Leishmania SPP by multiple Isozyme Analysis. Richard D. Kreutzer et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (4).703-715. 1983.
- 33.- Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA. Maarten H. L. de Bruijn and D. C. Barker. *Acta Tropica*. Vol. 52. 1992.
- 34.- Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Mark R. Rodgers et al. *Experimental Parasitology* Vol. 71. 1990.
- 35.- Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala azar patients. A. J. Smyth et. al. *Parasitology*. 105. 183-192. 1992.
- 36.- Restriction Endonuclease Analysis of Leishmania kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. Peter R. Jakson et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 33 (5). 1984.
- 37.- Study on genetic polymorphism of Leishmania infantum through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. M. C. Angelici et al. *Parasitology* Vol. 99. 301-309. 1989.
- 38.- Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Noris Rodriguez et al. *Journal of Clinical Microbiology*. Sept. 1994. 2246-2252.
- 39.- Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Dyann F. Wirth y Mc. Mahon Pratt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 79. 6999-7003. Nov. 1982.
- 40.- Identification and diagnosis of Leishmania mexicana complex isolates by polymerase chain reation. S. Eresh et al. *Parasitology*. 109. 423-433. 1994.
- 41.- Separation of Chinese Leishmania isolates into five genotypes by kinetoplast and chromosomal DNA heterogeneity. Hong-Gang tu et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (6). 763-770. 1994.
- 42.- Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. Martin López et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 49 (3). 1993.
- 43.- The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with Leishmania parasites. M. E. Ibrahim, D. C. Barker et al. *Acta Tropica*. Vol. 57. 1994.
- 44.- Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of Leishmania parasites. Riddhi Bhattacharyya et al. *FEMS Microbiology letters* 114 99-104. 1993.
- 45.- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data. Institute for molecular genetics and animal disease and school of veterinary studies, Western Australia.
- 46.- Genetic Analysis using RAPD markers. John G. K. Williams et al. *Methods in enzymology*. Vol. 218. 705-739. 1993.
- 47.- The application of RAPD for sandfly species identification. Rachel E. Adamson et al. *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 7. 203-207. 1993.
- 48.- Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Michael Tibayrene et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90 Feb. 1335-1339. 1993.
- 49.- DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. John G. K. Williams et al. *Nucleic Acid Research*. Aug. 23. Vol. 18. No. 22. 6531-6535. 1990.
- 50.- Applications of RAPD in molecular ecology. Mini Review. H. Hadrys et al. *Molecular ecology*. Vol. 1. 55-63. 1992.
- 51.- Treatment of cutaneous leishmaniasis. Amy Beth Koff y Theodore Rosen. *Dermatology*. Vol. 31 No. 5 Part I Nov. 1994.