



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE  
*Leishmania mexicana* PARA EL  
DESARROLLO DE UN MÉTODO DE  
INMUNODIAGNÓSTICO ESPECÍFICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARÍA NANCY ROBLES BRIONES

**TUTORA:**  
**DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER**

2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Hoja de datos del jurado.

### 1. Datos del alumno.

Apellido paterno: Robles  
Apellido materno: Briones  
Nombre(s): María Nancy  
Teléfono: 56 11 71 70  
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad: Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
No. de cuenta: 300097737

### 2. Datos del tutor

Grado: Dra.  
Nombre(s): Ingeborg Dorothea  
Apellido paterno: Becker  
Apellido materno: Fauser

### 3. Datos del sinodal 1

Grado: Dra.  
Nombre(s): Ana María  
Apellido paterno: Fernández  
Apellido materno: Presas

### 4. Datos del sinodal 2

Grado: Méd. Cir.  
Nombre(s): Oscar  
Apellido paterno: Velasco  
Apellido materno: Castrejón

### 5. Datos del sinodal 3

Grado: Dra.  
Nombre(s): Laila  
Apellido paterno: Gutiérrez  
Apellido materno: Kobeh

### 6. Datos del sinodal 4

Grado: Dra.  
Nombre(s): María Magdalena  
Apellido paterno: Aguirre  
Apellido materno: García

### 7. Datos del trabajo escrito.

Título: Identificación de moléculas de *Leishmania mexicana* para el desarrollo de un método de inmunodiagnóstico específico.  
No. de páginas: 70 p  
Año: 2008

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, bajo la dirección de la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser.

Apoyado por los proyectos: PAPIIT: IN221806-3 y por CONACYT: 47256-M

## **DEDICATORIAS.**

### **A mis Padres**

- Gracias por darme la vida, por su amor, sus caricias, regaños, esfuerzos y sacrificios.
- Por educarme e inculcarme los valores para formarme y ser la mujer que ahora soy.

Gracias por esto y mil cosas más... LOS AMO!!!!!!

### **A mis hermanos (Javier y Beto)**

- Por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido.
- Porque en los momentos difíciles estuvieron ahí para arrancarme una sonrisa.
- Porque nos falta mucho más por vivir, los adoro!!!

### **A mi Abuelo Martín (†)**

- Gracias por haberme regalado tantos días de tu vida, por la paciencia, tu complicidad, por tus cuidados pero sobre todo por todo el amor que siempre me demostraste cuando estuviste conmigo...
- Este trabajo es de todo corazón para ti... TE QUIERO MUCHISIMO!!

### **A Daniel**

- Por llegar en el momento justo que más te necesitaba y enseñarme otra cara de la vida.
- Por toda tu paciencia, comprensión, amor y hacer más ligeros los momentos más difíciles.
- Por quitarme todos mis temores y enseñarme que soy capaz de lograr lo que yo quiera.

TE AMO...!!!

### **A Adriana Ruiz R.**

- Gracias por tu paciencia, apoyo, comprensión y confianza.
- Por brindarme tu amistad, escucharme, pero sobre todo por motivarme a seguir adelante, gracias por enseñarme tantas cosas tan valiosas, sin tu ayuda esto hubiera sido más difícil. MIL GRACIAS!!!

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Ciencias por darme la oportunidad de ser universitaria.
- A los proyectos: PAPIIT: IN221806-3 y CONACYT: 47256-M por el apoyo económico.
- A la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser por su asesoría y apoyo para la culminación y realización de este trabajo. Pero sobretodo por su paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo. Gracias Dra.!!
- A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio por su asesoría en las técnicas de ELISA y Western-blot a lo largo de este trabajo.
- A la M. en C. Rocely B. Cervantes S. y a la Dra. Myriam Berzunza por el cultivo de los parásitos.
- A mis sinodales: Dra. I. D. Becker, Dra. Ma. Magdalena Aguirre, Dra. Laila Kobeh, Dra. Ana Ma. Fernández y el Dr. Oscar Velasco por el tiempo dedicado a corregir esta tesis, por sus consejos y su gran apoyo.
- A los que integran el laboratorio de Inmunoparasitología de Medicina Experimental de la UNAM, por hacerme los días más ligeros, por sus atenciones y ayuda recibida durante la elaboración de esta tesis.
- A la Dra. Ma. Antonieta Aladro y a la Biol. Margarita Reyes por enseñarme el maravilloso mundo de los Protozoos y brindarme su apoyo.
- A Sra. Susana por su ayuda con el material de laboratorio y por distraerme en esos momentos de tensión!!!
- Al técnico Marco E. Gudiño Zayas por su apoyo en la digitalización de las imágenes y por su asesoría en el área de cómputo.
- A mis amigos Enrique, Lizzette, Mónica, Omar, Vladimir, Fernando, Brenda y Citlali, a quienes agradezco su compañía, su amistad, comprensión, sus consejos, ánimos y por los momentos de diversión y tristeza que espero sean muchos más.

**ÍNDICE****Páginas**

<b>Lista de figuras</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>VI</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Generalidades de la leishmaniasis</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Agente etiológico</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1 Taxonomía</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2 Morfología</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3 Ciclo de Vida</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Cuadros Clínicos</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1 Leishmaniasis Visceral o Kala azar (LV)</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2 Leishmaniasis Mucocutánea o espundia (LMC)</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3 Leishmaniasis Cutánea (LC)</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Mecanismos de transmisión</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Métodos de diagnóstico</b>	<b>17</b>
<b>1.5.1 La intradermorreacción de Montenegro o prueba de leishmanina</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2 Diagnóstico parasitológico</b>	<b>19</b>
<b>1.5.3 Diagnóstico inmunológico</b>	<b>23</b>
<b>1.5.4 Diagnóstico molecular</b>	<b>26</b>
<b>1.5.5 Diagnóstico diferencial</b>	<b>27</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>

	II
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo General	29
3.2 Objetivos específicos	29
<b>IV. MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Diagrama de flujo	30
4.2 Cultivo de parásitos	31
4.3 Extracto antigénico	31
4.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	32
4.5 Sueros	33
4.6 ELISA	33
4.7 Ensayos de Western-blot	34
4.7.1 Geles	34
4.7.2 Preparación de las muestras	35
4.7.3 Electroforesis	35
4.7.4 Tinción del gel	35
4.7.5 Transferencia	36
4.7.6 Bloqueo	36
4.7.7 Revelado por fosfatasa alcalina (AP)	36
4.7.8 Obtención del Peso Molecular (PM)	37
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
5.1 Electroforesis de extractos antigénicos	38
5.2 Análisis de tinción inespecífica de anticuerpos (1° y 2°)	39
5.3 Determinantes antigénicos de <i>Leishmania mexicana</i>	40
5.4. Determinantes antigénicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42



	III
<b>5.5. Dilución óptima de sueros de pacientes</b>	<b>44</b>
<b>5.6. Análisis de Western-blot de sueros de individuales de pacientes con LCL y LCD</b>	<b>47</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>60</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

Fig. A. Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea	2
Fig. B. Distribución mundial de la leishmaniasis visceral	2
Fig. C. Amastigotes de <i>Leishmania</i> dentro del macrófago humano	6
Fig. D. Promastigotes de <i>Leishmania major</i>	7
Fig. E. <i>Lutzomyia</i> sp.	8
Fig. F. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	9
Fig. G. Paciente con leishmaniasis visceral	11
Fig. H. Paciente con leishmaniasis mucocutánea	12
Fig. I. Paciente con leishmaniasis cutánea localizada	13
Fig. J. Paciente con leishmaniasis cutánea diseminada	15
Fig. K. Mapa de leishmaniasis en México	16
Fig. L. 1) Aplicación de la leishmanina. 2) Reacción a las 48 horas post-aplicación	19
Fig. M. Diagnóstico histológico de leishmaniasis cutánea en biopsia de piel teñida con hematoxilina	21

- Fig. N. Serodiagnóstico de Kala azar por la tira reactiva rk39 25**
- Fig. 1. Perfil proteico de extractos antigénicos de *L. mexicana* y *T. cruzi* 38**
- Fig. 2. Western-blot para antígenos específicos de *L. mexicana* y *T. cruzi* 39**
- Fig.3. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los sueros de pacientes con LCL y LCD 41**
- Fig. 4. Análisis por Western-blot de las proteínas de *T. cruzi* que reaccionan específicamente con los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas 43**
- Fig. 5. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en diferentes sueros a distintas diluciones 45**
- Fig. 6. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en diferentes sueros a distintas diluciones 46**
- Fig. 7. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en sueros individuales con LCL 48**
- Fig. 8. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en sueros individuales de pacientes con LCL 49**

**Fig. 9. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos de sueros individuales de pacientes con LCL 50**

**Fig. 10. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en sueros individuales de pacientes con LCD 52**

#### LISTA DE TABLAS

**Tabla 1. Distribución geográfica y características clínicas de la leishmaniasis 5**

**Tabla. 2. Prevalencia de la banda de 39 kDa a distintas diluciones del suero humano 47**

**Tabla. 3. Reconocimiento del antígeno de 39 kDa por los sueros individuales de pacientes con LCL 51**

**Tabla. 4. Reconocimiento del antígeno de 39 kDa por sueros individuales de pacientes con LCD 52**

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
H <sub>2</sub> O	Agua
IDR	Intradermoreacción de Montenegro
IFN <sub>γ</sub>	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltones
L	litros
LCD	Leishmaniasis Cutánea Diseminada
LCL	Leishmaniasis Cutánea Localizada
LMC	Leishmaniasis Mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis Visceral
min	minutos
ml	mililitros
mM	Milimolar
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Marcador de Peso Molecular
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
seg	Segundo
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TBST	Amortiguador tris, borato, salino, tween
μg/ml	Microgramos por mililitro
μl	Microlitros
μm	Micrometros
Wb	Western-blot

## Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad cuyos agentes etiológicos son protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania* spp. La Organización Mundial de la Salud reporta de 1.5 a 2 millones de nuevos casos anuales y 12 millones de personas infectadas en el mundo. La enfermedad se manifiesta en tres formas clínicas: visceral, mucocutánea y cutánea. En México se encuentra la especie *Leishmania mexicana mexicana*, la cual es responsable de la Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) y Diseminada (LCD), ambos cuadros clínicos suelen ser confundidos con otros padecimientos como el cáncer. Actualmente, el diagnóstico de la leishmaniasis se basa en la observación del parásito en biopsias, prueba en piel de la leishmanina y recientemente se han desarrollado métodos moleculares como el PCR y antígenos recombinantes en tiras reactivas. Debido a las dificultades que presenta la aplicación de este tipo de técnicas, también se han utilizado métodos serológicos (ELISA y Western-blot), para detectar anticuerpos específicos contra las distintas especies de *Leishmania*, pero pueden presentar reacción cruzada con otros antígenos como *Trypanosoma cruzi* y debido a que ambos parásitos coexisten en las mismas regiones endémicas, se debe desarrollar un método de diagnóstico serológico específico y sensible para *L. mexicana*.

El objetivo de este trabajo fue identificar antígenos específicos de *Leishmania mexicana* que no presentaran reacción cruzada con *Trypanosoma cruzi* en pruebas serológicas. Para ello, se obtuvieron extractos antigénicos de una cepa de *Leishmania mexicana* y de *Trypanosoma cruzi*. Los componentes proteicos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para el análisis de Western-blot. Posteriormente, la membrana se incubó con sueros de pacientes con LCL, LCD y con enfermedad de Chagas (1:100). Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a fosfatada alcalina (1:10,000) y se reveló.

El análisis por Western-blot mostró que la incubación de los diferentes sueros con el antígeno de *Leishmania mexicana*, los sueros de pacientes con LCL y LCD reconocieron un componente de aproximadamente 39 kDa y los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas no reconocieron el antígeno antes mencionado, por lo que no hubo reacción cruzada. Además, los sueros incubados con el antígeno de *Trypanosoma cruzi* no presentaron el componente reconocido por pacientes con LCL y LCD. Con los resultados obtenidos posiblemente se podría desarrollar un método de diagnóstico serológico altamente sensible y específico para la leishmaniasis en México.

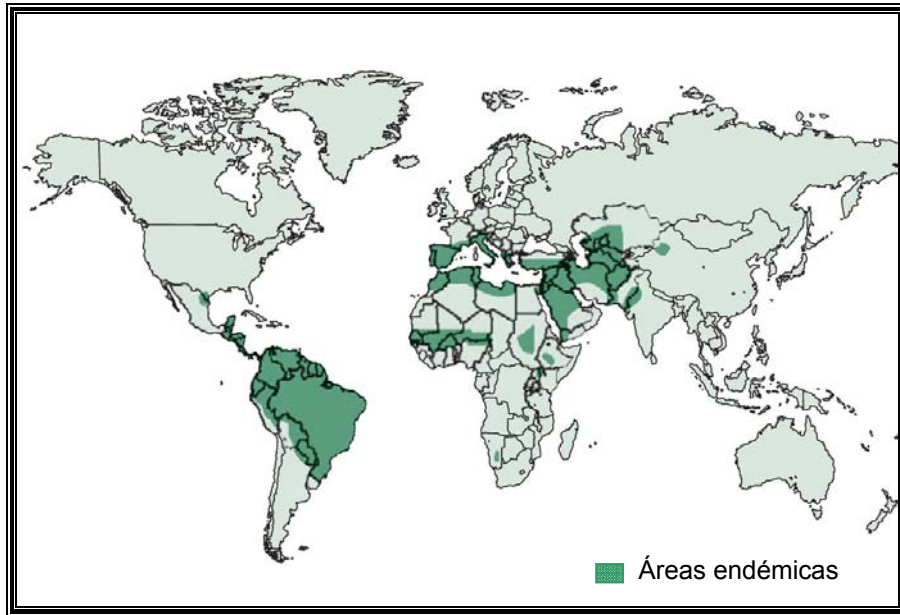
# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de la leishmaniasis

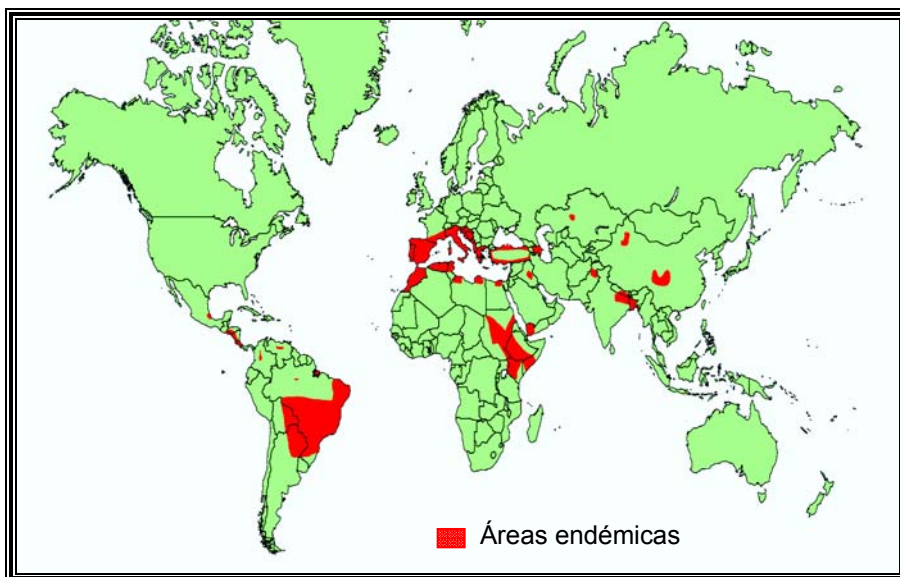
La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozooario hemoflagelado del género *Leishmania*. Es transmitida por la picadura de ciertas especies de mosquitos hembras del género *Phlebotomus*, en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. La enfermedad presenta diversas manifestaciones clínicas tales como: visceral, cutánea y mucocutánea, que dependen de la especie infectiva y del estado inmunológico del hospedero. Se han identificado aproximadamente 21 especies de *Leishmania* como patógenas para el hombre, además de 30 especies de mosquitos que sirven como vectores y los reservorios de esta parasitosis son animales vertebrados silvestres y domésticos como roedores y cánidos (Velasco *et al.*, 1994; Desjeux, 2004; Singh *et al.*, 2005).

La leishmaniasis afecta aproximadamente a 88 países, de los cuales 22 son del Nuevo Mundo y 66 del Viejo Mundo (Fig. A y B). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una incidencia anual de 1-1.5 millones de casos de leishmaniasis cutánea y 500,000 casos de leishmaniasis visceral, esta última se encuentra distribuida en 65 países. La prevalencia es de 12 millones de personas y la población en riesgo es de 350 millones (Pearson & de Queiroz., 1996; Desjeux, 2004; Singh *et al.*, 2005). La enfermedad es característica de regiones tropicales y templadas, lo cual está relacionado con la distribución geográfica del vector (Sundar & Rai., 2002).





**Fig. A. Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea.**  
(Tomado de Reinthinger *et al.*, 2007)



**Fig. B. Distribución mundial de la leishmaniasis visceral.**  
(Tomado de Chappuis *et al.*, 2007)

## 1.2 Agente etiológico

### 1.2.1 Taxonomía

Clasificación taxonómica de *Leishmania* sp. (Corliss, 1994).

- Reino: Protozoa (Goldfuss, 1818)
- Phylum: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)
- Clase: Kinetoplastidea (Honigberg, 1963)
- Orden: Trypanosomatida (Kent, 1880)
- Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901; Grobber, 1905)
- Género: *Leishmania* (Ross, 1903)

El género *Leishmania* pertenece a la familia Trypanosomatidae, que incluye protozoos flagelados como importantes agentes causales de enfermedades en humanos, animales y plantas. En humanos los géneros principales son *Trypanosoma* y *Leishmania*. Los microorganismos pertenecientes a esta familia poseen una amplia gama de hospederos, aún mayor que el de cualquier grupo de eucariontes parásitos, después de los nemátodos. Son conocidos como cinetoplástidos, pues se caracterizan por poseer un cuerpo intracelular llamado cinetoplasto, que es un orgánulo en donde se encuentra el ADN mitocondrial arreglado como una compleja red de maxi y mini círculos y forma parte integral de la mitocondria, la cual típicamente se extiende a lo largo del cuerpo. Los miembros de esta familia pueden o no presentar citostomas (o boca celular) y se alimentan principalmente por absorción. Su ciclo de vida es digenético, ya que involucra a más de un hospedero y su reproducción es por fisión binaria (Gilles, 1999; Lee *et al.*, 2000; Aladro, 2006; Singh, 2006).

El género *Leishmania* se ha dividido en dos subgéneros, *Viannia* y *Leishmania*, según su desarrollo en el intestino de los flebotómos vectores. Los organismos del subgénero *Leishmania* se desarrollan en el intestino medio y

posterior del insecto hospedero, mientras que los organismos del subgénero *Viannia* se sujetan a la pared del intestino posterior y después migran hacia el intestino medio (Lee *et al.*, 2000; Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004). Sin embargo, morfológicamente las distintas especies de *Leishmania* no se pueden identificar. Para llegar a la clasificación a nivel de especie se deben considerar ciertas características como son: a) biológicas: morfología, tipo de desarrollo en el flebotómo vector, crecimiento en los medios de cultivo y desarrollo en el hospedero vertebrado b) bioquímicas: electroforesis de isoenzimas, análisis del ADN del núcleo y del cinetoplasto c) inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales, serotipificación del factor de excreción y taxonomía numérica para definir mejor la evolución molecular y la relación filogenética de los parásitos del género *Leishmania* (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).

Pese a la diversidad del género, sólo algunas especies de *Leishmania* son responsables de la enfermedad en el humano (Tabla 1). La leishmaniasis visceral (LV) es producida por *L. chagasi* (en Latinoamérica), *L. donovani* (en África, India y Asia), y *L. infantum* (en el Mediterráneo) (Pearson & de Queiroz, 1996). Las especies causales de la leishmaniasis cutánea (LC) son *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. chagasi*, *L. peruviana* y *L. braziliensis* en el Continente Americano (Akilov *et al.*, 2007).

**Tabla 1. Distribución geográfica y características clínicas de la leishmaniasis.**

<b>Complejo</b>	<b>Especie</b>	<b>Distribución geográfica</b>	<b>Enfermedad</b>
<b><i>Leishmania donovani</i></b>	<i>L.(L.) donovani</i>	India (India, Nepal y Bangladesh), África	LV, LCL
	<i>L.(L.) infantum</i>	Mediterráneo	LV, LCL
	<i>L.(L.) chagasi</i>	México, América del Sur	LV, LCL
	<i>L.(L.) major</i>	África, Asia, Medio Oriente	LCL
No pertenece a complejos	<i>L.(L.) tropica</i>	Medio Oriente, Asia	LCL
	<i>L.(L.) aethiopica</i>	Etiopía, Kenia	LCL, LCD, LMC
<b><i>Leishmania mexicana</i></b>	<i>L.(L.) mexicana</i>	México, Centroamérica	LCL, LCD
	<i>L.(L.) amazonensis</i>	América del sur	LCL, LCD
	<i>L.(L.) venezuelensis</i>	Venezuela	LCL
	<i>L.(L.) garnhami</i>	Venezuela	LCL
	<i>L.(L.) pifanoi</i>	Venezuela	LCL
<b><i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i></b>	<i>L.(V.) braziliensis</i>	Brasil, Centroamérica	LMC, LCL
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	Guyana, Surinam, Brasil	LMC, LCL
	<i>L.(V.) panamensis</i>	Panamá, Costa Rica, Colombia	LMC, LCL
	<i>L.(V.) peruviana</i>	Perú, Argentina	LMC, LCL

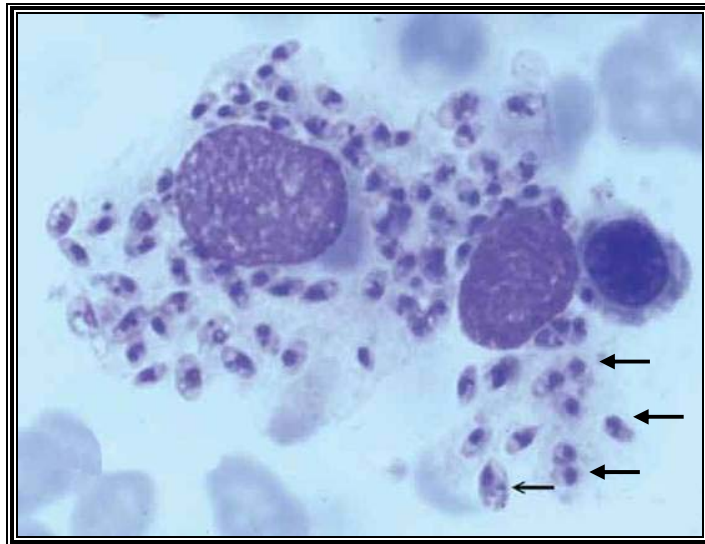
**(LCL, leishmaniasis cutánea localizada; LCD, leishmaniasis cutánea diseminada; LMC, leishmaniasis mucocutánea; LV, leishmaniasis visceral)**

(Tomado de Becker, 2006)

### 1.2.2 Morfología

Durante su ciclo de vida *Leishmania* se presenta en dos formas: el amastigote y el promastigote, los cuales se desarrollan en un hospedero vertebrado y en uno invertebrado (vector) respectivamente.

El **amastigote** (Fig.C) se caracteriza por su forma oval o redondeada, mide entre 2 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, carece de flagelo, presenta un núcleo grande y excéntrico y un cinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote. Es una forma intracelular presente en fagocitos mononucleares de hospederos vertebrados. Se encuentra adaptado a la temperatura corporal del hospedero, así como a las condiciones ácidas del fagolisosoma de las células donde residen (Velasco *et al.*, 1994; Pearson & de Queiroz., 1996).

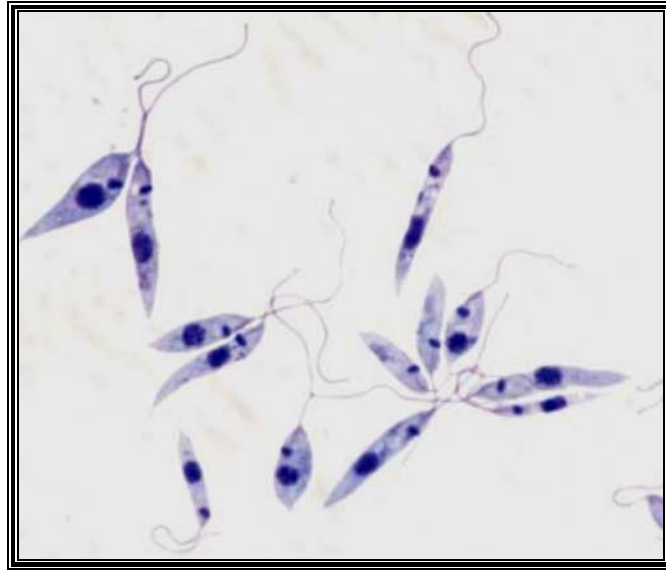


**Fig. C. Amastigotes de *Leishmania* dentro del macrófago humano.**

(Tomado de [www.mja.com.au/public/issues/181\\_08\\_181004/ju10084\\_fm.html](http://www.mja.com.au/public/issues/181_08_181004/ju10084_fm.html))

El **promastigote** (Fig. D) se encuentra en el intestino del vector, es fusiforme y mide de 12 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, tiene un núcleo central y un flagelo

anteronuclear que nace del cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto y sale del cuerpo por el polo anterior, carece de membrana ondulante como otros tripanosomátidos (Velasco *et al.*, 1994; Pearson & de Queiroz., 1996).



**Fig. D. Promastigotes de *Leishmania major*.**

(Tomado de Akilov *et al.*, 2007)

### **1.2.3 Ciclo de Vida**

Los agentes transmisores de la leishmaniasis son mosquitos que miden de 3 a 5 mm de longitud, su cuerpo y sus alas son muy pilosos y estas últimas las mantienen erectas durante el reposo y cuando se alimentan, siendo las hembras las únicas hematófagas. En el Continente Americano son conocidos como papalotillas o jejenes (Fig. E) (Velasco *et al.*, 1994).

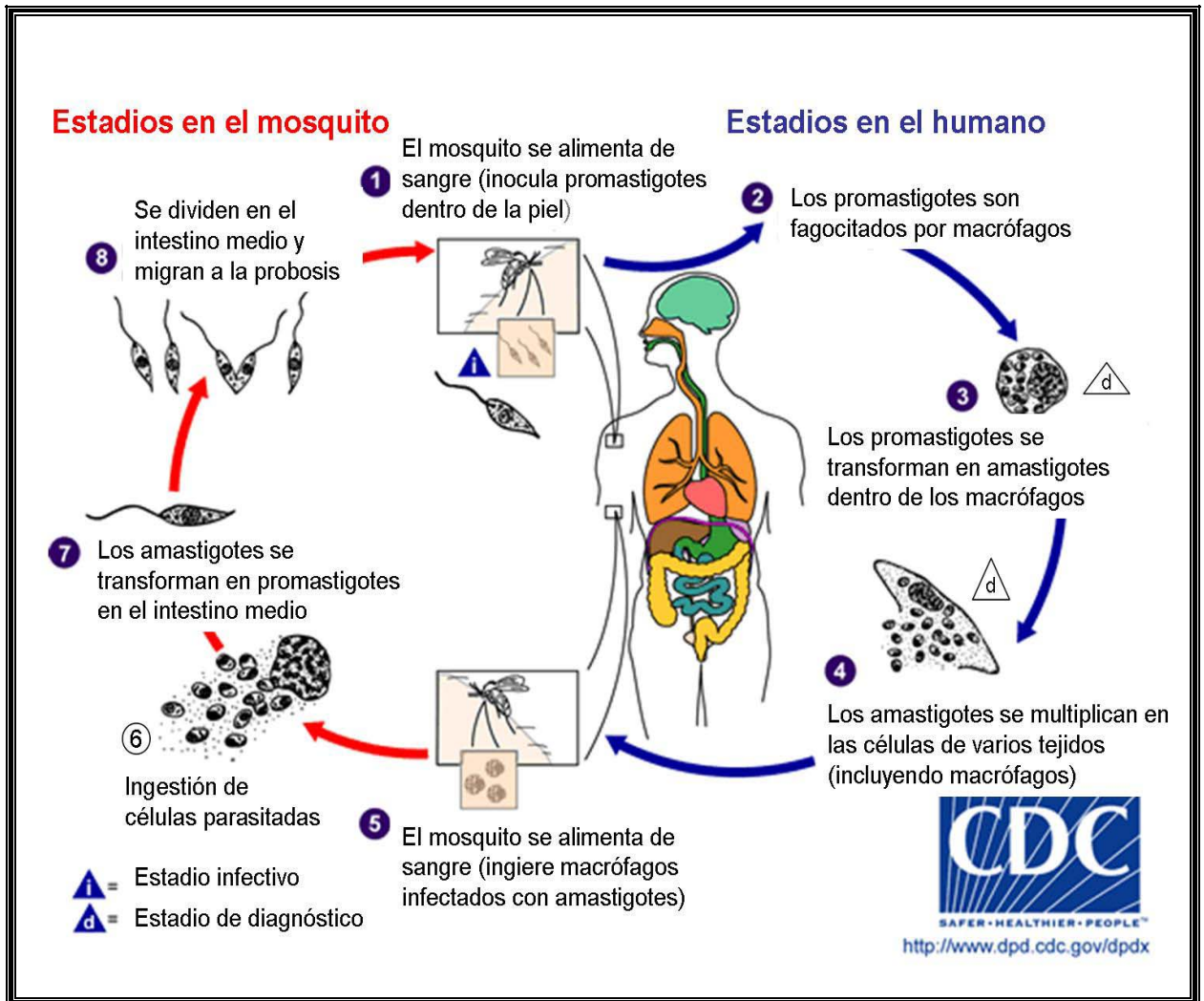


**Fig. E. *Lutzomyia* sp.**

(Tomado de [www.antropozoonosi.it/vettori/flebotomi.htm](http://www.antropozoonosi.it/vettori/flebotomi.htm))

El ciclo de vida (Fig. F) se inicia cuando el mosquito hembra se alimenta de sangre infectada con amastigotes. En el intestino del mosquito los parásitos se diferencian en promastigotes procíclicos, forma no infectiva, entre las 12 y 18 horas posteriores a la ingestión. Estos a su vez se adhieren al epitelio intestinal donde se dividen por fisión binaria y pasan a la forma infectiva, promastigotes metacíclicos, este proceso de maduración es conocido como metaciclogénesis (Cunningham, 2002). Esta parte del ciclo concluye al cabo de una semana después de la infección, los promastigotes metacíclicos migran a la cavidad bucal y son subsecuentemente depositados en la piel del mamífero cuando el mosquito se alimenta (Bogitsh *et al.*, 2005). Una vez que los promastigotes metacíclicos son inoculados, los parásitos se unen a receptores de superficie expresados por la célula hospedera que subsecuentemente los fagocita y se forma el fagosoma en el que los promastigotes se diferencian en amastigotes, el fagosoma se une a los lisosomas formando el fagolisosoma donde los parásitos se dividen por fisión binaria y debido a la alta carga parasitaria la célula se rompe liberando amastigotes, los cuales son fagocitados por otras células favoreciendo la dispersión de la infección y de esta manera el ciclo se cierra (Ilg, 2001; Bogitsh *et al.*, 2005). En general todas las especies de *Leishmania* poseen un ciclo de vida

similar, y es importante conocerlo para poder entender y aplicar ciertas medidas para el control de la enfermedad.



**Fig. F. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.**

(Tomado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm))



## **1.3 Cuadros clínicos**

Los cuadros clínicos se dividen en tres debido a los órganos que afectan y son: visceral, cutánea y mucocutánea. Sin embargo, existen algunas variantes de estos, dependiendo de la virulencia de la especie así como de la respuesta inmune del hospedero. Así mismo, los diferentes cuadros clínicos pueden ser causados por una sola especie de *Leishmania* (Pearson & de Queiroz., 1996).

### **1.3.1 Leishmaniasis Visceral o Kala azar (LV)**

En la LV el periodo de incubación es de entre dos a seis meses, sin embargo puede variar y tardar días, semanas o hasta años. El parásito infecta células del sistema retículo-endotelial (sistema macrófago/monocitos) y los órganos más afectados son el bazo, hígado, nódulos linfáticos y médula ósea. La baja producción de eritocitos y leucocitos resulta en anemia facilitando una segunda infección. Los pacientes generalmente presentan fiebre, tos, dolor abdominal, diarrea, esplenomegalia, hepatomegalia e hipergamaglobulinemia. El curso de la enfermedad y la cura dependen del estado general de salud del paciente, aunque la mala nutrición exacerba la infección (Gilles, 1999; Shore, 2001). En la LV existe supresión de la inmunidad celular hacia el antígeno, mientras que los niveles de anticuerpos específicos de las clases IgG e IgM están muy elevados. Existen complejos antígeno-anticuerpo circulantes que involucran inmunoglobulinas de las clases IgG, IgM e IgA. Estos inmunocomplejos activan complemento lo cual lleva a un daño tisular (Velasco *et al.*, 1994).

El Kala azar o LV puede presentarse en tres modalidades: endémica, esporádica y epidémica. En zonas endémicas la enfermedad afecta principalmente a niños (Fig. G). El periodo de incubación oscila entre 10 días a más de un año y el cuadro clínico se presenta gradualmente. Los síntomas más frecuentes son fiebre, malestar general, anorexia, pérdida de peso, caquexia, hepato-esplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia y palidez de mucosas. El

oscurecimiento de la piel, particularmente de cara, abdomen, pies y manos es común en la India (Kala azar significa fiebre negra en hindú) en tanto que en Latinoamérica es ligero y esporádico. La modalidad presente en México afecta tanto a niños como a adultos. La LV esporádica se observa en personas no nativas que penetran en un área endémica. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre de inicio brusco, rápida pérdida de peso y complicaciones como anemia hemolítica grave, insuficiencia renal aguda y hemorragia grave de mucosas. La forma epidémica de la LV se observa en áreas endémicas y puede involucrar a todos los grupos etáricos particularmente del sexo masculino. Habitualmente cursa en forma crónica. (Velasco *et al.*, 1994; Gilles, 1999). En nuestro país se han registrado casos en el estado de Chiapas y en la Cuenca del Balsas (Puebla, Guerrero y Morelos) (Velasco *et al.*, 1994).



**Fig. G. Paciente con leishmaniasis visceral.**

(Tomado de [www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/leish4.htm](http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/leish4.htm))

### **1.3.2 Leishmaniasis Mucocutánea o espundia (LMC)**

La LMC es causada por especies pertenecientes al complejo *Leishmania Viannia*, siendo más frecuentes las infecciones por *Leishmania (Viannia) braziliensis* que por *Leishmania (Viannia) panamensis* o *Leishmania (Viannia)*

*guyanensis*. Esta forma de la leishmaniasis evoluciona en dos estados: una lesión cutánea primaria seguida del daño a mucosas, el periodo de tiempo entre ambos estados puede variar entre semanas y años (Gilles, 1999). El parásito se expande causando lesiones en la mucosa nasal, orofaríngea, bucal, en piel de nariz y labios y puede ocasionar la destrucción del tabique nasal, lo cual puede entorpecer la fonación y la deglución e incluso causar inanición debido al intenso dolor. La LMC se caracteriza por un elevado nivel de anticuerpos, así como de una respuesta inmune celular con producción de una mezcla de citocinas de tipo TH1 y TH2, como son IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL5 e IL-10 (Velasco *et al.*, 1994). Este cuadro es más frecuente en el género masculino entre 10 y 30 años de edad, no cura espontáneamente y aunque la enfermedad suele ser extremadamente desfigurante, la tasa de mortalidad es baja (Velasco *et al.*, 1994; Shore, 2001). Sin embargo, las consecuencias sociopsicológicas son considerables para los pacientes, llevándolos frecuentemente al suicidio. En México, la LMC se ha observado en Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca (Velasco *et al.*, 1994) (Fig. H).



**Fig. H. Paciente con leishmaniasis mucocutánea.**

(Tomado de

[www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/05\\_Leishmaniasisp10.htm](http://www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/05_Leishmaniasisp10.htm) )

### 1.3.3 Leishmaniasis Cutánea (LC)

En México encontramos dos formas de leishmaniasis cutánea: Localizada (LCL) y Diseminada (LCD), ambas son causadas por *L. (L.) mexicana*. Por otro lado, se ha determinado que *Lutzomyia olmeca* es el vector más importante de LC en México (Becker *et al.*, 2005).

La **leishmaniasis cutánea localizada (LCL)** o úlcera de los chicleros (Fig. 1), se caracteriza por desarrollar una pequeña pápula en el sitio de la infección, la cual evoluciona hacia la ulceración. Generalmente es redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e indolora. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples, según el número de veces o de vectores que hayan picado al hospedero. Las lesiones comunmente se presentan en áreas expuestas al vector tales como manos, pies, piernas y cara. El periodo de incubación es de 1 semana a 3 meses después de la infección. La LCL tiende a la curación espontánea en 6 meses a 2 años, excepto cuando se localiza en orejas donde es crónica y mutilante (Velasco *et al.*, 1994; Shore, 2001). Se caracteriza por una baja producción de anticuerpos y la presencia elevada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 lo cual con frecuencia lleva a una cura espontánea.



**Fig. 1. Paciente con leishmaniasis cutánea localizada.**  
(Tomada de [www3.baylor.edu/~Charles\\_Kemp/hand.jpg](http://www3.baylor.edu/~Charles_Kemp/hand.jpg))

La **leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)** se le considera la forma anérgica de la LC donde no hay respuesta inmune celular y humoral. La enfermedad se caracteriza por la formación de un nódulo no ulcerado, los parásitos se diseminan por vía linfática dando lugar a múltiples nódulos. Esta diseminación generalmente es muy lenta, los parásitos también se diseminan por el líquido tisular o por la sangre produciendo lesiones en todo el cuerpo, cara y nariz con la excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos, las plantas de los pies y manos (Velasco *et al.*, 1994; Shore, 2001) (Fig. J). Estos pacientes presentan una baja producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. El granuloma de estos pacientes muestra predominantemente una respuesta mediada por Th2, es decir, la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 que es elevada.

La enfermedad se caracteriza por ser crónica y no tener cura, los pacientes pueden presentar anemia específica. Las lesiones no están aisladas por una pared de linfocitos, como en las lesiones clásicas de borde elevado, y por este motivo no se ulceran, a no ser que sean traumatizadas. De esta manera, los parásitos no están restringidos y pueden dispersarse por la superficie de la piel, particularmente en las partes con temperaturas bajas (OPS, 1996).



**Fig. J. Paciente con leishmaniasis cutánea diseminada.**  
(Fotografía tomada en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Depto. de Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de México).

Se han reportado casos de leishmaniasis en general en 19 estados de la República Mexicana (Fig. K), principalmente en Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, en la Cuenca del Balsas y en el Norte en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Velasco *et al.*, 1994; Monroy-Ostria *et al.*, 1997). Se han reportado algunos casos de militares y campesinos que cultivan estupefacientes en regiones apartadas de algunos estados, pero no son considerados como zonas endémicas (Becker *et al.*, 2005).



**Fig. K. Mapa de leishmaniasis en México.**  
(Tomado de Becker *et al.*, 2005).

#### 1.4 Mecanismos de transmisión

La vía más común de transmisión de la leishmaniasis es por la picadura del vector la cual puede ser de tipo selvática, intradomiciliaria o peridoméstica, donde reservorios silvestres, individuos infectados o animales domésticos funcionan como una fuente de infección (Aguinaga-Cuenca *et al.*, 2000).

Todas las especies de *Lutzomyia* pueden ser vectores potenciales de las leishmanias pero dependerá de sus preferencias alimentarias. Las especies que se alimentan de sangre son las que pueden transmitir la enfermedad, mientras que las especies no antropofílicas que solo ocasionalmente pican al hombre pueden

ser muy importantes en el mantenimiento de las leishmanias en los reservorios animales. La mayoría de las especies son silvestres y solo atacan a los hombres que penetran su hábitat. Existen algunas especies que muestran una antropofilia acentuada y se adaptan al domicilio y peridomicilio humano (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).

Sin embargo, se conocen otras rutas de infección como son: transfusión sanguínea, sexual, adquirida en laboratorio, por contacto con fluidos de pacientes infectados y por vía congénita (Herdwalt, 2001). Se han reportado algunos casos de transmisión congénita de LV, en donde las madres son o no sintomáticas para la enfermedad durante el embarazo. Por otro lado, se ha reportado la presencia de amastigotes en la placenta de feto que han sido abortados espontáneamente por madres infectadas con *Leishmania*, sin embargo, el feto no presentaba parásitos en los órganos (Grevelink & Lerner.,1996; Meinecke *et al.*, 1999).

### **1.5 Métodos de diagnóstico**

La identificación de parásitos causantes de infecciones es importante para el diagnóstico de la enfermedad, evaluación de la terapia y pronóstico. Consecuentemente, se han diseñado varias técnicas diagnósticas de laboratorio para la identificación especie-específica de parásitos dentro del género *Leishmania* (Singh, 2006). Los métodos comúnmente utilizados para el diagnóstico de la leishmaniasis son: demostración del parásito en tejidos por microscopía, tinción o inoculación animal, prueba de hipersensibilidad en piel, inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en sangre, suero u orina y detección de ADN del parásito en muestras de tejido (Salotra & Singh., 2006).



### 1.5.1 La intradermoreacción de Montenegro o prueba de leishmanina

La intradermoreacción (IDR), llevada a cabo por Montenegro en 1926, es una importante herramienta en estudios epidemiológicos de la leishmaniasis, así como para el diagnóstico. Este análisis de hipersensibilidad retardada presenta sensibilidad de entre 86 y 100% y una especificidad de alrededor del 100% (Mayrink *et al.*, 2006). Mediante esta prueba se analiza la respuesta de linfocitos T CD4 (Th1) a una suspensión de promastigotes muertos por fenol o formol de un cultivo *in vitro* de *Leishmania* sp. o por un extracto total de los parásitos, que son inyectados por vía intradérmica. La prueba se examina entre las 48 y 72 horas y la induración debe de tener un diámetro mínimo de 5 mm para ser considerada positiva (Velasco *et al.*, 1994; Gilles, 1999) (Fig. L).

Aparentemente, la prueba no presenta reacción cruzada con la enfermedad de Chagas. Esta prueba generalmente es positiva en pacientes con LCL y permanece positiva el resto de la vida del sujeto, mientras no curse con una inmunosupresión. Los pacientes con LCD son negativos, mientras que pacientes con LMC presentan una reacción positiva y en sujetos con LV la reacción es negativa. Sin embargo, en pacientes con tratamientos exitosos la respuesta se vuelve positiva (Velasco *et al.*, 1994; Guilles, 1999; Shore, 2001). La IDR no es específica para las especies, por lo tanto debe ser interpretada con cuidado, particularmente en los pacientes que tienen más de un tipo de leishmaniasis. (Shore, 2001). Una desventaja de esta prueba es que el antígeno no se encuentra comercialmente disponible (Singh & Sivakumar., 2003), así mismo, aún no se ha logrado establecer un compuesto adecuado para la preservación del antígeno y uno de los grandes problemas es el uso de diversas sustancias como el timerosal (Merthiolate™), que contiene mercurio y puede producir reacciones alérgicas que pueden ser interpretadas como falsos positivos. De esta manera se ha recurrido al uso de fenol y formol, ya que aparentemente los pacientes no presentan ninguna respuesta al colocar la solución como control negativo (Mayrink *et al.*, 2006; Fagundes *et al.*, 2007).



**Fig. L. 1) Aplicación de la leishmanina. 2) Reacción a las 48 horas post-aplicación.**

(Tomadas de [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/Medicina\\_Experimental/v16\\_n1-2/images\\_eval.htm#Figura4](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/Medicina_Experimental/v16_n1-2/images_eval.htm#Figura4))

### **1.5.2 Diagnóstico parasitológico**

Estas pruebas se basan en la detección del parásito en las lesiones del paciente y son las siguientes:

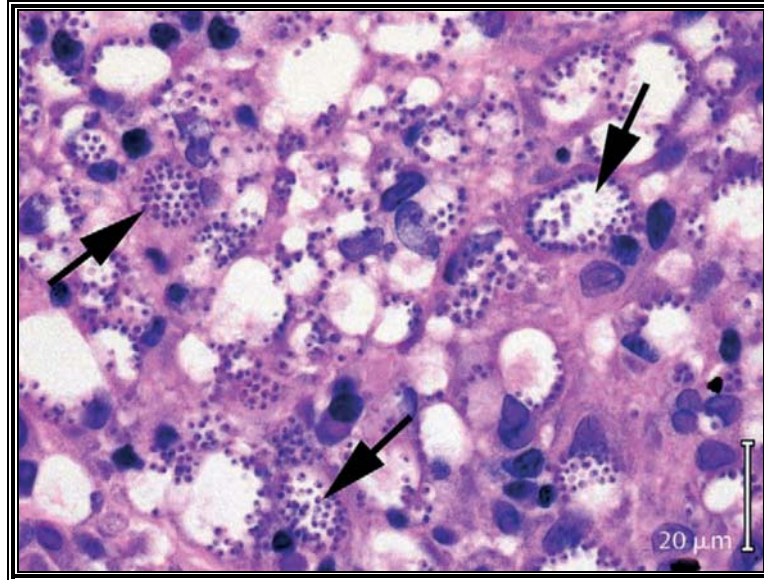
- a) Observación microscópica de parásitos en biopsias y frotis.

Los parásitos se observan comúnmente en frotis hechos a partir de aspirados de lesiones. Los aspirados se obtienen al inyectar un pequeño volumen de solución salina estéril en la lesión u órgano y sin retirar la aguja se realiza un aspirado suave. En el caso de pacientes con LV los aspirados se obtienen de nódulo linfático, médula ósea o bazo, o bien en pacientes con LC la muestra se debe tomar de lesiones recientes y activas, así mismo debe tomarse del borde de la induración y no del centro necrótico (Gilles, 1999; Shore, 2001). Los frotis se colocan en portaobjetos para ser teñidos con Giemsa, los frotis se deben secar al aire y fijarse con metanol al 100% antes de la tinción. Los amastigotes se observan como cuerpos redondos u ovoides de un tamaño de entre 2 y 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, se logra observar el núcleo y el cinetoplasto. Con la tinción de Giemsa

los amastigotes presentan un citoplasma teñido de color azul claro, el núcleo se presenta de color morado a rojo y el cinetoplasto presenta un color con rango entre violeta y marrón (Fig. M). La tinción por inmunoperoxidasa mejora la sensibilidad en los casos de LMC y LC. Los aislados también son utilizados para el cultivo *in vitro* del parásito. (Sundar & Rai., 2002; Singh, 2006).

Otro método utilizado comúnmente es la toma de biopsias, a las que se les realizan diversos cortes bajo condiciones de esterilidad con un instrumento especializado. Posteriormente, pueden ser teñidos con hematoxilina y eosina. Sin embargo, es más difícil identificar a los amastigotes en las secciones del tejido que en los frotis (Shore, 2001).

En pacientes con LC la habilidad para detectar parásitos en aspirados o biopsias depende del número de amastigotes presentes, el nivel de la respuesta inmune y la ausencia o presencia de contaminación por bacterias u hongos dentro de la lesión. Si el paciente tiene múltiples lesiones, la muestra se debe tomar de las más recientes y activas. Estas se deben limpiar con alcohol al 70 % y los cúmulos necróticos se deben remover para prevenir la contaminación por bacterias u hongos. Esto es obligatorio si la muestra se utiliza para aislar y crecer parásitos ya que el exceso de bacterias y hongos limita el desarrollo de los promastigotes. También, la muestra se debe tomar del margen de la lesión con el fin de no coleccionar residuos necróticos (Velasco *et al.*, 1994, Shore, 2001).



**Fig. M. Diagnóstico histológico de leishmaniasis cutánea en biopsia de piel teñida con hematoxilina. Se observan los parásitos dentro de vacuolas de macrófagos presentes en la infección por *L. mexicana*.**  
(Tomado de Murray *et al.*, 2005)

b) Cultivo *in vitro* del aspirado de una lesión

El cultivo del parásito puede mejorar la sensibilidad de la detección, ya que aunque solo se obtengan pocos parásitos al cultivarlos aumenta su número por lo que pueden ser detectados. Esto no es posible en la observación de frotis y biopsias (Gilles, 1999).

El aspirado se debe realizar bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Una vez realizado el aspirado se inocula en tubos con medio de cultivo bifásico NNN (Novy, McNeal y Nicolle) o RPMI 1640, enriquecido con suero fetal bovino al 10 %. Estos también pueden contener antibióticos como penicilina o estreptomycin para evitar contaminación, así mismo, se debe contar con un tubo control (sin muestra) con el fin de determinar, si es el caso, que factores no permitieron el crecimiento del parásito. Los tubos se incuban entre 22 y 28 °C y se examinan semanalmente durante cuatro semanas para detectar la presencia de

promastigotes, si no se observan, el diagnostico es negativo (Shore, 2001; Sundar & Rai., 2002; Becker, 2006).

En el caso de la LV el aspirado se hace del bazo y de la médula ósea y la metodología para el cultivo es similar al descrito anteriormente. Estos procedimientos son de alto riesgo y requieren ser realizados en centros hospitalarios con personal especializado. Para poder obtener la muestra el paciente debe reunir ciertas características: tener un tiempo de protrombina no mayor a 5 segundos en relación con el testigo y una cuenta de plaquetas superior a 40,000 por mm<sup>3</sup> (Velasco *et al.*, 1994; Sundar & Rai., 2002). Si se cumple con los requisitos la aspiración se realiza mediante la introducción de 2 a 3 ml de solución salina en la pulpa del bazo y jalando suavemente el émbolo de la jeringa para obtener la muestra. Lo anterior se realiza de acuerdo con los movimientos respiratorios del paciente, cuando el diafragma esté quieto (Velasco *et al.*, 1994).

### c) Xenodiagnóstico

Un método alternativo es la inoculación de los parásitos en animales de laboratorio como los hámsters sirios o ratones BALB/c, debido a que son especies susceptibles a *Leishmania*. Generalmente no se utiliza como método de diagnóstico debido a que se requieren varios meses para obtener un resultado positivo (Gilles, 1999; Sundar & Rai., 2002). El aislado de la lesión se inyecta en el cojinete plantar, la nariz, las membranas de mucosas, o intraperitonealmente y el animal es monitoreado semanalmente para registrar si existen signos de infección tales como lesiones cutáneas o hepato-esplenomegalia, si los presenta, el animal se sacrifica para obtener aspirados y biopsias de bazo, hígado y/o lesiones cutáneas. Si el animal no manifiesta infección se sacrifica después de 4 meses y se practican los diagnósticos parasitológicos tales como la observación de parásitos en biopsias y el cultivo de aspirados en medios de cultivo (Sundar & Rai., 2002).

Los métodos parasitológicos en el diagnóstico de la leishmaniasis no son considerados específicos ya que solo se puede identificar el género del parásito y no la especie. Así mismo, no permiten detectar infecciones ocultas o subclínicas (Singh & Sivakumar., 2003). Otra desventaja es que el cultivo prolongado de promastigotes normalmente resulta en la pérdida de infectividad, lo cual puede estar determinado por diversos parámetros como el tipo de medio utilizado (Gilles, 1999).

### **1.5.3 Diagnóstico inmunológico**

Existen diversas pruebas que nos permiten detectar anticuerpos específicos para las diferentes especies de *Leishmania*, entre ellas están:

#### a) Western-blot

El Western-blot (Wb) permite identificar proteínas específicas expresadas durante el curso de la enfermedad. En este método electroforético se separan proteínas presentes en extractos crudos, además de combinación de antígenos y antígenos recombinantes o sintéticos o bien moléculas simples. Posteriormente las bandas de proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, las cuales se exponen a anticuerpos (suero, sangre u orina), se lavan y se incuban con un anticuerpo policlonal o monoclonal radiomarcado o unido a una enzima específica para la proteína de interés. Los complejos Ag-Ac que se forman pueden visualizarse por la adición de un sustrato cromógeno que produce un producto de color intenso e insoluble. El diagnóstico por Wb se ha reportado como uno de los más sensibles y específicos presentando rangos de entre 68 y 100% (Gilles, 1999; Goldsby *et al.*, 2004). La mayoría de los trabajos reportados conciernen al uso del Wb para el diagnóstico de la LV, incluso el patrón de proteínas puede ser correlacionado con el estado de la enfermedad (Singh & Sivakumar., 2003). De Colmenares y colaboradores (1995) analizaron la orina de pacientes con antígeno de *Leishmania* detectando dos fracciones polipeptídicas de 72 a 75 kDa y otro

componente de 123 kDa, los cuales no fueron detectados por lo pacientes después de tres semanas de tratamiento. Este método puede ser muy útil en casos donde la carga parasitaria es muy pobre, ya que el Wb permite analizar la respuesta humoral del paciente.

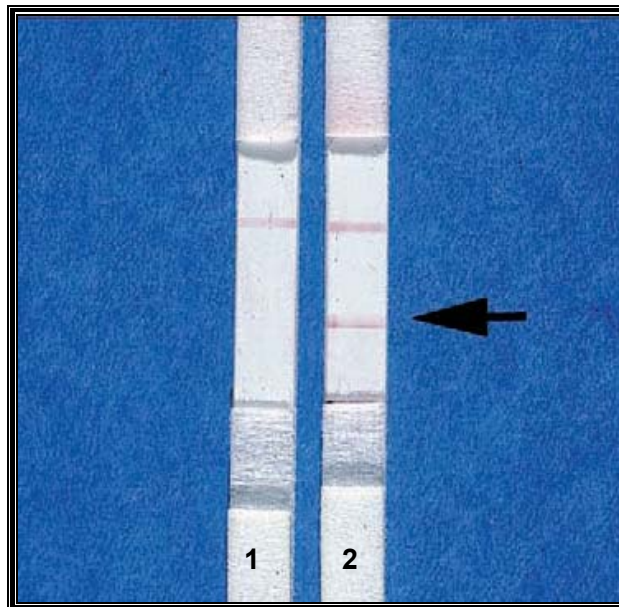
#### b) ELISA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) es un método serológico ampliamente usado para el diagnóstico de la leishmaniasis. En esta técnica se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima en los que el anticuerpo conserva su capacidad de unirse específicamente al antígeno mientras que la enzima reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con reacción de color (Goldsby *et al.*, 2004). Sin embargo la sensibilidad y especificidad esta determinada por el tipo de antígeno utilizado (Sundar & Rai., 2002). Actualmente, con el fin de optimizar esta prueba serológica se han desarrollado diversos antígenos tales como extractos citoplásmicos (antígenos solubles), péptidos sintéticos y proteínas recombinantes utilizadas como antígeno entre los que se reportan la rGBP (proteína del gen B) de *L. donovani*, Ld-r GBP (homólogo del gen B de *L. donovani*), rKE16 de *L. donovani*, roRFF de *L. infantum*, rgp63, rk9, rk26 y rk39 de *L. chagasi*, A2, rH2A, rH2B entre otros (Singh & Sivakumar., 2003; Salotra & Singh., 2006; Sivakumar *et al.*, 2006).

#### c) Tira reactiva rk39

El antígeno recombinante rk39 se refiere a 39 repeticiones de aminoácidos de una proteína tipo cinesina, la cual forma parte de una proteína predominante en amastigotes de *L. chagasi*. El análisis de secuenciación mostró que está relacionada a la superfamilia de las proteínas motoras. También se observó que esta secuencia se conserva entre *L. chagasi* y *L. donovani* (Burns *et al.*, 1993). La proteína recombinante fue utilizada inicialmente en ELISA, dando buenos resultados para el diagnóstico de pacientes con LV, los cuales después del

tratamiento presentaban bajos títulos de anticuerpos (Schallig & Oskam., 2002). Posteriormente, se desarrolló una tira reactiva de nitrocelulosa donde el antígeno se encuentra inmovilizado, a esta se le agrega una gota de sangre del paciente, posteriormente se agregan 5 o 6 gotas de amortiguador de fosfato salino. Si los anticuerpos están presentes en la tira se presentan dos líneas rosas (la banda superior sirve como control) (Fig. N). En la literatura se reportan varios estudios que han mostrado resultados variables dependiendo del sitio de estudio, la marca de la tira reactiva (Corixa Corp®, InBios Inc.®, DiaMed IT®) y el tipo de metodología, con ello se han determinado diversos valores en cuanto a sensibilidad y especificidad que varía de entre 67 y 100 % y de 71 a 100% respectivamente. Sin embargo, la tira reactiva de la rk39 es una de las pruebas más utilizadas debido que los valores de sensibilidad y especificidad se encuentran dentro de rangos aceptados para los métodos de diagnóstico (Sundar & Rai., 2002; Chappuis *et al.*, 2005; Salotra & Singh., 2006).



**Fig. N. Serodiagnóstico de Kala-azar por la tira reactiva rk39. En el carril 1 se muestra un resultado negativo. En el carril 2 se muestra un resultado positivo, donde aparece una segunda banda de color rosa (señalada por la flecha)**

(Tomado de Murray *et al.*, 2005)



#### 1.5.4 Diagnóstico molecular

La biología molecular es una herramienta de la ciencia que ha incrementado su importancia en el diagnóstico y el control de las enfermedades infecciosas. La información de los ácidos nucleicos ha sido explotada ampliamente para el diseño de técnicas que permitan detectar el ADN del parásito en tejidos del paciente aún a pocas semanas después de la aparición de los primeros síntomas o lesiones. Una de estas técnicas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que es una amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN, para ello se han desarrollado diversos oligonucleótidos específicos para la especie de interés que permiten la hibridización de ADN. Dentro de los genes blanco y ácidos nucleicos más utilizados se reportan la S18 del ARNr, la subunidad pequeña de ARNr (SSU ARNr), la secuencia genómica repetitiva de ADN, la repetición genética de mini exón (spliced ladder), la región genética de la  $\beta$ -tubulina, *locus* genético de la gp63, regiones internas del espaciador transcrito (ITS) y ADNs microsatélite tales como maxi y mini círculos del ADN del cinetoplasto (Grevelink & Lerner., 1996; Singh & Sivakumar., 2003; Singh, 2006).

El análisis de PCR puede llevarse a cabo, la mayoría de las veces, con pequeñas cantidades de muestra tales como, aspirados de nódulo linfático, médula ósea, biopsias de piel o frotis y muestras de sangre, en contraste con otros métodos que requieren cultivos de organismos (Grevelink & Lerner., 1996). La amplificación de genes a través del PCR tiene diversas ventajas comparadas con las técnicas tradicionales, pues es extremadamente sensible (detectan entre 50-100 parásitos), rápido y se puede adecuar a la diversidad de especímenes clínicos pero su uso está restringido debido a que es un proceso muy complejo y costoso (Grevelink & Lerner., 1996; Singh, 2006).

### 1.5.5 Diagnóstico diferencial

Existen diversas enfermedades que presentan síntomas o manifestaciones clínicas similares a las de la leishmaniasis y deben ser consideradas antes de dar un diagnóstico.

Dentro del diagnóstico de la LV deben considerarse padecimientos como malaria, síndrome tropical de esplenomegalia, esquistosomiasis o cirrosis, tripanosomiasis africana, tuberculosis miliar, brucelosis, fiebre tifoidea, endocarditis bacteriana, histoplasmosis, linfoma, leucemia y desnutrición (Herwaldt, 1999).

La LMC suele ser confundida con paracoccidiomicosis, reticulosis polimórfica, esporotricosis, blastomicosis, linfoma, histoplasmosis, lepra, neoplasma, tuberculosis y carcinoma nasofaríngeo entre otras (Grevelink & Lerner., 1996, Herwaldt, 1999).

La LC es confundida con infecciones de la piel, picaduras de insectos, lepra, lupus vulgaris, blastomicosis, sífilis o cáncer de piel, paracoccidiosis, blastomicosis y malaria, por mencionar algunas. (Grevelink & Lerner., 1996, Herwaldt, 1999).

Cabe mencionar, que se ha reportado la existencia de reacción cruzada entre la leishmaniasis, tripanosomiasis americana y africana, lepra (*Mycobacterium leprae*) y tuberculosis (*M. tuberculosis*) en técnicas serológicas como lo son el Wb y el ELISA complicando el diagnóstico y control de la leishmaniasis (Reed *et al.*, 1987).

## II. JUSTIFICACIÓN

La permanencia de la leishmaniasis como problema de salud pública es debido a la falta de medidas para el control del vector, de los reservorios, de la co-infección con enfermedades oportunistas (VIH) y del surgimiento de resistencia a los fármacos (Reithinger *et al.*, 2007). Así mismo, debido a que su diversidad epidemiológica y clínica la hace una enfermedad patognómica, es importante desarrollar y optimizar diversos métodos de diagnóstico, de manera que se confirme el análisis clínico.

El diagnóstico definitivo de la LC y LV depende de la detección de amastigotes en muestras de tejido cutáneo, médula ósea y bazo, respectivamente. El método es considerado como sensible, pero el procedimiento para la obtención de la muestra suele ser doloroso y riesgoso para el paciente además, la identificación del parásito requiere de experiencia y entrenamiento por parte del observador. Debido a estas limitantes, se han desarrollado métodos serológicos que permiten detectar antígenos y anticuerpos específicos, los cuales han tenido diversas aplicaciones, aumentando así la especificidad del diagnóstico (Ashford, 2000; Chang, 2001). En México, existen pocos reportes acerca de antígenos inmunodominantes de *Leishmania mexicana* contra los que está dirigida la respuesta humoral de los pacientes con leishmaniasis, por lo tanto no se ha logrado el desarrollo de un método de diagnóstico estándar para la LCL y la LCD.

Por ello, este trabajo se realizó con la finalidad de estandarizar un método serológico (Western-blot) específico y sensible que permitiera diagnosticar las formas clínicas de la leishmaniasis cutánea (LCL y LCD), mediante la identificación de antígenos específicos de *Leishmania mexicana* y consecuentemente, aportar información de la respuesta inmune contra el parásito y contribuir en el desarrollo de medidas para el control de la enfermedad.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

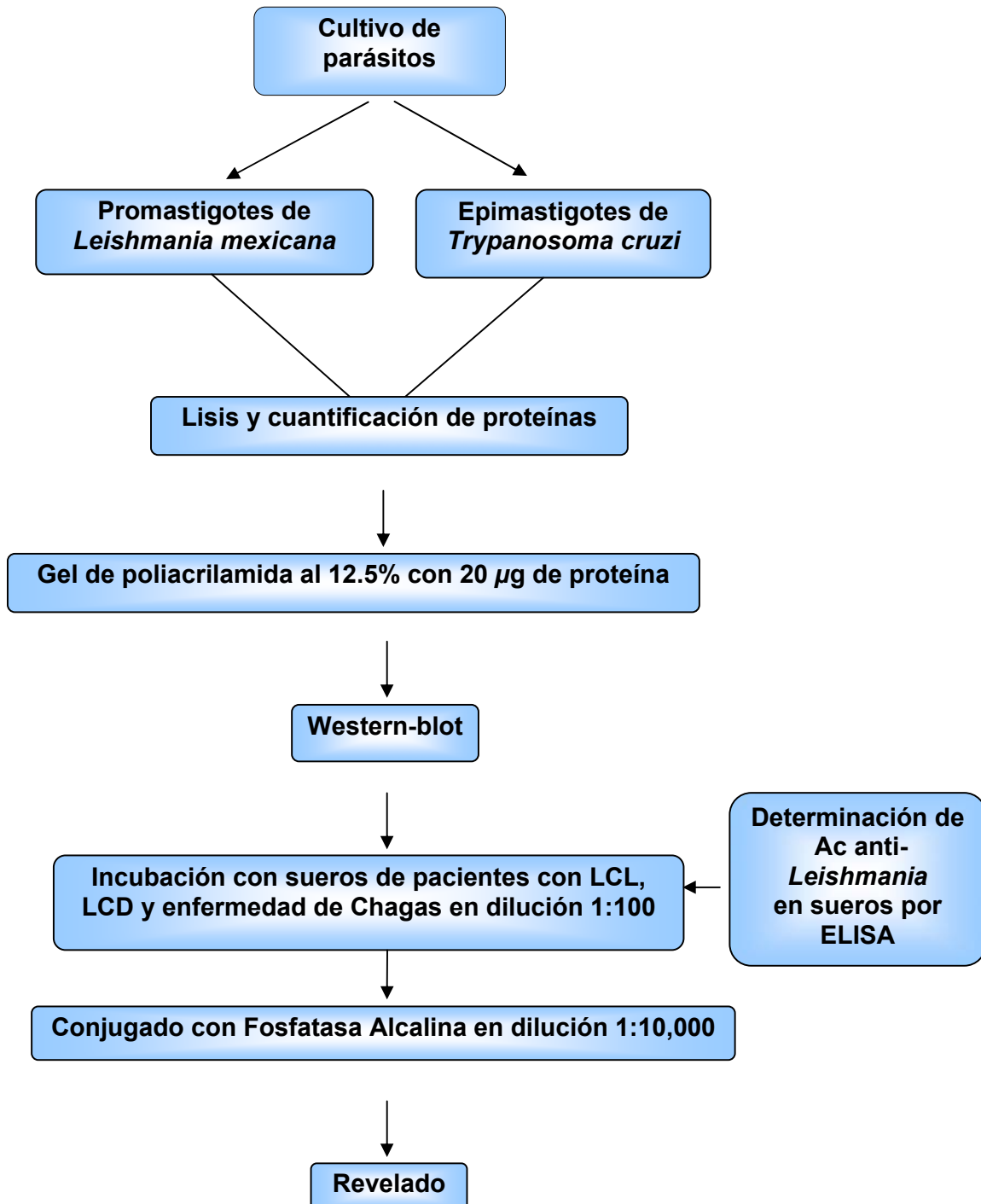
- Identificar antígenos específicos de *Leishmania mexicana* que no tengan reacción cruzada con *Trypanosoma cruzi* utilizando el Western-blot.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos antigénicos de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Querétaro).
- Analizar electroforéticamente antígenos de *L. mexicana* y *T. cruzi* para verificar su patrón proteico.
- Analizar por Western-blot el patrón de proteínas de *L. mexicana* y *T. cruzi* incubando sueros de sujetos sanos y de pacientes con Leishmania Cutánea Localizada, Leishmania Cutánea Diseminada y enfermedad de Chagas
- Buscar antígenos específicos de *Leishmania mexicana* de diferente peso molecular que no tengan reacción cruzada con *Trypanosoma cruzi*.
- Identificar el antígeno con mayor sensibilidad y especificidad para serodiagnóstico por Western-blot.

## IV. MÉTODOS

### 4.1 Diagrama de flujo



\* EL EQUIPO Y LOS REACTIVOS UTILIZADOS PUEDEN SER CONSULTADOS EN LOS APÉNDICES CORRESPONDIENTES

## 4.2 Cultivo de parásitos

Se utilizaron parásitos de *Leishmania mexicana mexicana* de la cepa MHOM/MX/92/VADY 68 aislada de un paciente con LCL procedente de Campeche. Los parásitos se cultivaron por 5 días en medio RPMI 1640 (Gibco) con 5 % de suero fetal bovino (Gibco) descomplementado por calor a 56°C. Después de este tiempo los parásitos se recuperaron en su fase estacionaria en forma metacíclica. También se utilizaron parásitos de *Trypanosoma cruzi* (cepa Querétaro) cultivados en medio RPMI 1640 enriquecido con suero fetal bovino al 5 % y se recuperaron en su fase logarítmica en forma de epimastigote.

## 4.3 Extracto antigénico

Los extractos se obtuvieron de promastigotes metacíclicos para *L. mexicana* y de epimastigotes para *T. cruzi* en condiciones de esterilidad. Los parásitos se colectaron en tubos nuevos de 50 ml y se centrifugaron a 3400 rpm durante 15 min a 4°C. Al terminar la centrifugación, el sobrenadante se decantó y el botón de cada tubo se resuspendió en 1 ml de amortiguador fosfato salino PBS 1X a pH 7.2. Al final todos los botones se colocaron en un solo tubo (pesado previamente) llevándolo a un volumen de 45 ml con PBS 1X. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X para eliminar los residuos de RPMI. En el último lavado se tomó una alícuota, se agregó glutaraldehído en dilución 1:2, esto con el fin de fijar los parásitos, contarlos en la cámara de Neubauer y obtener el total de microorganismos cosechados con la siguiente formula:

**Promedio del No. de parásitos contados en los 4 cuadrantes X Factor de la cámara de Neubauer: 10, 000 X Factor de dilución = No. de parásitos / ml**

Al terminar los lavados, el sobrenadante se decantó y se pesó el botón con el fin de obtener su peso húmedo. Posteriormente, el botón se resuspendió en buffer de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM a pH 7.4 con inhibidores de

proteasas: aprotinina 10  $\mu\text{g/ml}$ , leupeptina 2  $\mu\text{g/ml}$  y benzamidina 1 mM. La suspensión de parásitos fue lisada en frío por sonicación durante cinco ciclos de un minuto con cinco minutos de reposo entre cada uno. La suspensión se centrifugó a 18,000 rpm a 4°C durante 1 hora. El sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso.

#### 4.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas del extracto de los parásitos se utilizó el método de Bradford (1976) en donde cada condición se realizó por triplicado. Para elaborar la curva estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de 5 mg/ml y como blanco el buffer de lisis con el que se procesó la muestra.

Para la curva estándar se utilizaron las siguientes concentraciones:

Concentración ( $\mu\text{g}$ )	BSA (5mg/ml)	Buffer de lisis cbp 10 $\mu\text{l}$	Agua desionizada	Reactivo de Bradford
1	(Dilución 1:10) 2 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
3	(Dilución 1:10) 6 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
5	1 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
10	2 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
15	3 $\mu\text{l}$	7 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
Blanco	—	10 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$

Para las muestras se colocó 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de los extractos antigénicos en 150  $\mu\text{l}$  de agua desionizada, 9  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis y 40  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford. La placa se leyó a 595 nm en el lector de microplacas EL312e. Los

resultados se interpolaron a la curva estándar y se analizaron en el programa KC4 V. 2.7. para conocer la concentración de proteínas de las muestras.

#### **4.5 Sueros**

Se utilizaron 18 sueros de pacientes diagnosticados serológicamente con LCL y ocho con LCD procedentes de los estados de Campeche, Tabasco y Veracruz, los cuales no habían recibido ningún tratamiento. Los sueros utilizados resultaron con un valor positivo en ELISA. Se seleccionaron cinco sueros de los pacientes de cada cuadro clínico y cinco sueros de sujetos sanos provenientes de áreas no endémicas. En el caso de los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas se utilizaron 8 sueros diagnosticados serológicamente por ELISA e IFI, los cuales fueron proporcionados por la Dra. Paz María Salazar Schettino, del laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM.

#### **4.6 ELISA**

Este método fue utilizado para conocer el título de anticuerpos de los sueros. La técnica es la siguiente:

En una placa de 96 pozos de fondo plano, se agregaron 100  $\mu$ l de antígeno diluido en PBS 1X (GIBCO) a una concentración de 0.6  $\mu$ g por pozo. Los pozos considerados como blanco solo tenían 100  $\mu$ l de PBS sin antígeno. Se cubrió la placa y se incubó en cámara húmeda durante 1 hr a temperatura ambiente.

Para bloquear se eliminó la solución anterior y se agregaron 200  $\mu$ l de solución bloqueadora por pozo, incluyendo el blanco y se dejó por 1 hr a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de eliminar la solución bloqueadora se agregó el anticuerpo primario (suero humano) diluido 1:100, 1:500 y 1:1000 en solución bloqueadora, colocando 100  $\mu$ l por pozo. El blanco solo tuvo solución bloqueadora. Así mismo, se incluyeron control positivo (paciente positivo)



y negativo (suero de sujeto sano). Esto se incubó 2 hrs. en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa con PBS-Tween 80 cuatro veces, asegurando la eliminación completa de líquido residual.

Después se agregó el anticuerpo secundario HRP rabbit anti-human (IgA, IgG, IgM,  $K$  y  $\lambda$ ) (DAKO no. cat. P0212) en dilución 1: 12,000 en solución bloqueadora, colocando 100  $\mu$ l por pozo y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al blanco se agregó solo solución bloqueadora. Por otro lado, se colocaron 100  $\mu$ l de la solución reveladora compuesta por “TMB peroxidase substrate (KPL, no. cat. 50-76-02)” y “Peroxidase solution B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)” (KPL, no. cat. 50-65-02) en dilución 1:2 y se incubó hasta una lectura de 0.75 o 30 min en el lector de microplacas (EL312e) leyendo a 660 nm. Finalmente la reacción se detuvo agregando 100  $\mu$ l por pozo de una solución 1 M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Después se leyó la placa a una densidad óptica de 450 nm y a los resultados se les restó el valor del blanco.

Se calculó el punto de corte, que se obtiene tomando tres veces la desviación estándar de la muestra analizada, más el promedio del control negativo. Los valores que se encuentren por arriba del punto de corte se consideran positivos y los que sean iguales o menores serán considerados negativos.

## **4.7 Ensayos de Western-blot.**

### **4.7.1 Geles**

Se limpió el equipo de electroforesis con alcohol y se prepararon los geles de poliacrilamida al 12.5%.

Se colocó la fase de separador con una pipeta Pasteur limpia y se agregaron unas gotas de alcohol isopropílico para eliminar las burbujas que se formaron y para alinear el gel. Una vez que polimerizó el gel, se lavó con agua

bidestilada para eliminar el alcohol y se secó con papel filtro. Posteriormente se agregó la fase del concentrador y se colocó el peine. Una vez que polimerizó el gel, se retiró el peine, se lavó con agua bidestilada y se dejó secar.

#### **4.7.2 Preparación de las muestras**

Las muestras contenían 200  $\mu\text{g}$  de proteína de un extracto total de *Leishmania mexicana* o *Trypanosoma cruzi*, se les agregó buffer de muestra 2X en dilución 1:2 y se hirvieron a 95 °C durante tres minutos antes de la electroforesis. Al concluir este tiempo se colocaron en hielo.

#### **4.7.3 Electroforesis**

Se montaron los geles en la cámara de electroforesis y se agregó buffer de corrida. Posteriormente se cargaron las muestras, colocando 20  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron Precision Plus Protein Standards Dual color de 250 a 10 kDa (Bio-Rad Cat #161-0374).

La cámara se conectó a la fuente de poder e inicialmente se utilizó un voltaje de 70 V hasta que las muestras salieron de la fase del concentrador. Posteriormente se incrementó el voltaje a 120 V hasta que las muestras comenzaron a salir del separador.

#### **4.7.4 Tinción del gel**

Posterior a la electroforesis, se sacaron los geles y se eliminó la parte del concentrador. Se cortó un carril para teñirlo con azul de Coomasie, con el fin de conocer el estado del antígeno observando el patrón de proteínas. Se dejó en agitación 1 hora, después se agregó solución desteñidora hasta que las proteínas se pudieran observar claramente.

#### **4.7.5 Transferencia**

El resto del gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue activada previamente con buffer de transferencia durante 30 min en agitación. La transferencia se realizó en un equipo transblot semi-seco a amperaje constante, el cual se obtiene con base a la siguiente fórmula:

$$\text{Á cte.} = \frac{\text{base x altura del gel x 0.3}}{100} \text{ (No. de geles)}$$

Después de la transferencia, se tiñó el gel transferido con azul de Coomassie para observar si quedaron proteínas en él. Por otro lado, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para comprobar que las proteínas se habían transferido y se marcaron los carriles con pequeños cortes. La membrana se lavó con TBST 1X hasta eliminar el rojo de Ponceau.

#### **4.7.6 Bloqueo**

La membrana transferida se bloqueó durante 1 hr en una solución al 5 % de leche descremada disuelta en TBST 1X, en agitación constante y a temperatura ambiente. Después la membrana se lavó cada 10 min durante 1 hr con TBST 1X, bajo agitación. Posteriormente, se cortaron los carriles y se colocan en una charola para ser incubados con los sueros.

#### **4.7.7 Revelado por fosfatasa alcalina (AP)**

Como anticuerpo primario se utilizaron sueros de sujetos sanos, pacientes con LCL, con LCD y con enfermedad de Chagas, los cuales se habían conservado en glicerol en dilución 1:2. El anticuerpo primario se utilizó en dilución 1:100 en leche descremada al 5 % disuelta en TBST 1X y para el control del anticuerpo secundario, se colocó solo 1 ml de la misma solución. La membrana se incubó durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se lavó durante 30 min con TBST 1X cada 10 min. Se agregó el anticuerpo secundario

AP-goat anti-human IgG (ZYMED no. cat. 62-7122) en dilución 1: 10,000 en leche descremada al 5 % en TBST 1X. Se agregó 1 ml a cada carril y se dejó en agitación por 1 hora. Después se hicieron 3 lavados con TBST 1X cada 10 min durante 30 min y luego 3 lavados con buffer AP compuesto por Tris-HCl 100 mM pH= 9.5, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM cada 10 min durante 30 min.

Para revelar se preparó una solución compuesta por: 10 ml de buffer AP, 66  $\mu$ l de NBT (nitroazul de tetrazolium, SIGMA) y 33  $\mu$ l de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, SIGMA). A cada tira se le agregó 1 ml de esta solución y se mantuvieron en agitación hasta que las proteínas fueron visibles. La reacción se detuvo con agua destilada.

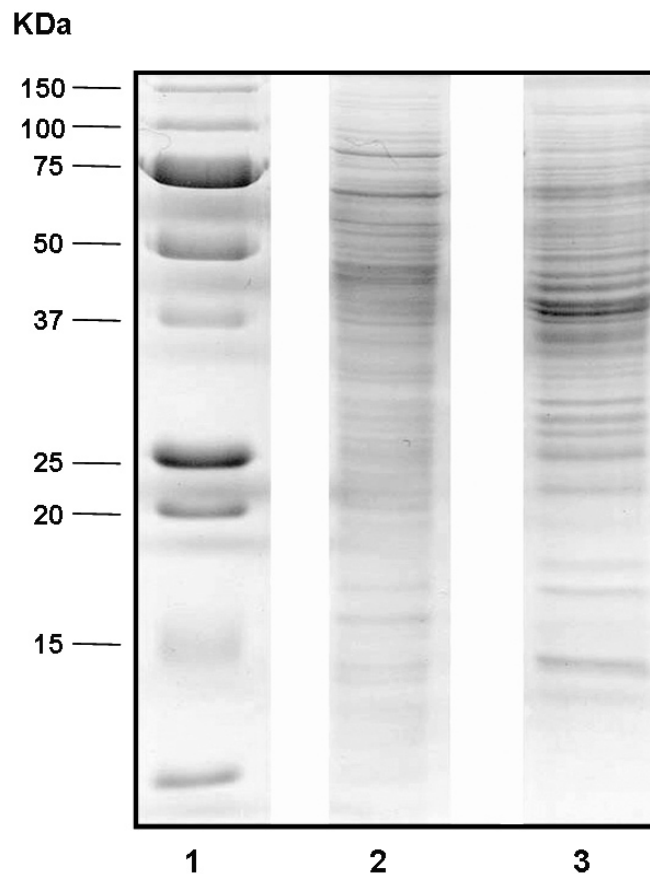
#### **4.7.8 Obtención del Peso Molecular (PM)**

El cálculo del peso molecular de las bandas antigénicas se realizó midiendo la distancia de migración a partir de la base de la membrana, extrapolando la distancia de cada banda con la curva de marcadores de peso molecular.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Electroforesis de extractos antigénicos

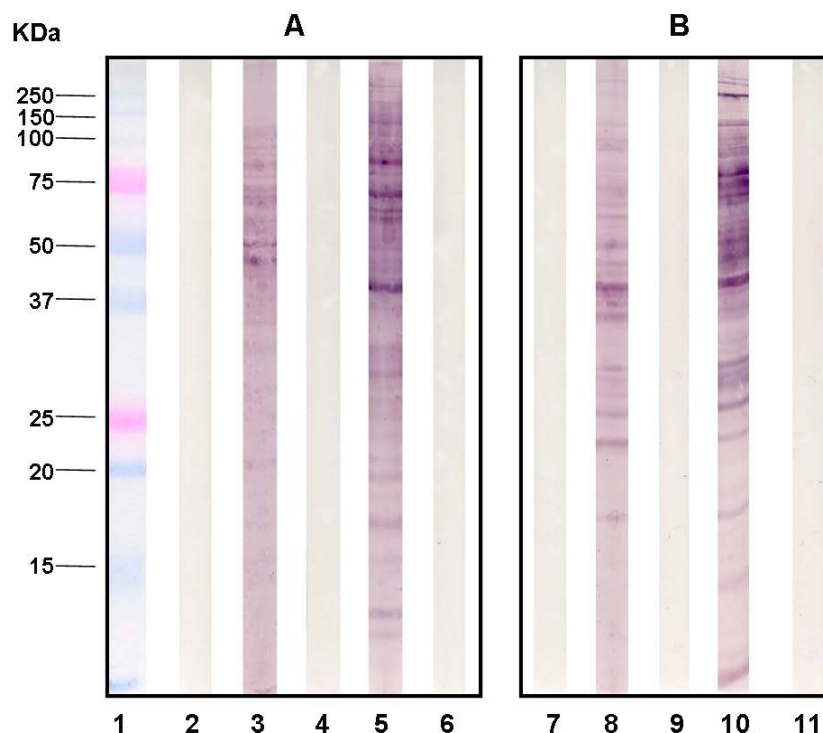
Con la finalidad de observar si los antígenos no presentaban degradación proteolítica después de ser procesados, se realizó un gel de poliacrilamida al 12.5% y se colocaron 20  $\mu\text{g}$  de los extractos proteicos de *L. mexicana* y *T. cruzi*. El gel se tiñó con azul de Coomasie para observar el perfil proteico. En la figura 1 se observan bandas bien definidas en ambos extractos distribuidas entre los 150 y 10 kDa, con esto verificamos que el lisado antigénico se encontraba en condiciones óptimas para la realización de los ensayos de Western-blot.



**Fig. 1. Perfil proteico de extractos antigénicos de *L. mexicana* y *T. cruzi*. 1.- Estándar de pesos moleculares, 2.- extracto de *L. mexicana* (20  $\mu\text{g}$ ), 3.- extracto de *T. cruzi* (20  $\mu\text{g}$ )**

## 5.2. Análisis de tinción inespecífica de anticuerpos (1° y 2°)

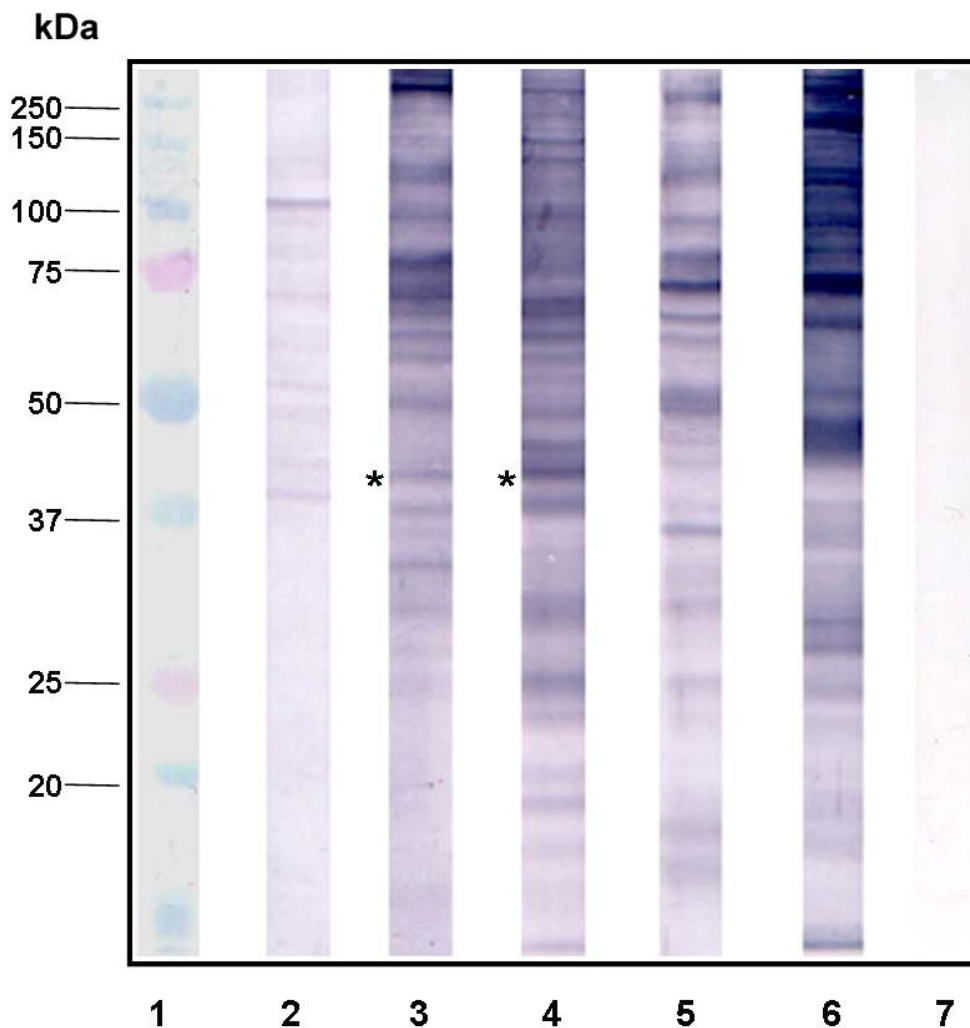
Este ensayo se realizó con el objeto de verificar si el suero humano y el anticuerpo 2° (AP-goat anti-human IgG) por si solos nos presentaba algún tipo de reacción. Para el primer análisis, se realizó un Western-blot con los antígenos de *L. mexicana* y *T. cruzi*. Posteriormente se incubaron los pool de sueros de sujetos sanos, LCD y Chagas utilizando una dilución de 1:100. En la figura 2 se observa que los carriles 2, 4, 7, y 9 no presentan ningún tipo de fondo. Así mismo, la reactividad del anticuerpo 2° con el extracto de *L. mexicana* (carril 6) y *T. cruzi* (carril 11) también fue negativa. Con estos ensayos corroboramos que las tinciones observadas en los Western-blots eran específicas.



**Fig. 2. Western-blot para antígenos específicos de *L. mexicana* y *T. cruzi*.** En esta figura el carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. Se utilizó extracto de *L. mexicana* (A) y de *T. cruzi* (B). Los carriles 2, 4, 7, 9 fueron incubados con los diferentes pool de sueros y revelados sin el Ac. 2°. Los carriles 3, 5, 8 y 10 fueron incubados con los diferentes pool de sueros y revelados con el Ac. 2°. Los carriles 6 y 11 solo se incubaron con el Ac 2°.

### **5.3. Determinantes antigénicos de *Leishmania mexicana***

Para la identificación de los antígenos específicos de *L. mexicana* se realizó un ensayo donde se analizó la reactividad del pool de sueros de sujetos sanos y sueros de pacientes con LCL, LCD y enfermedad de Chagas contra los componentes proteícos de *L. mexicana*. También se analizó la reactividad del pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas contra el extracto de *T. cruzi*. En la figura 3 se muestra el revelado inmunoenzimático que permitió detectar una proteína de aproximadamente 39 kDa, que fue reconocida específicamente por los sueros de pacientes con LCL y LCD, y no fue reconocida por los sueros de sujetos sanos ni por los pacientes con enfermedad de Chagas. Observamos que esta banda es muy prominente. Adicionalmente, este antígeno no se encontró en los lisados de *T. cruzi* cuando estos fueron incubados con sueros de pacientes con leishmaniasis o con enfermedad de Chagas. Este Western-blot permitió identificar un antígeno específico de *Leishmania mexicana* que no tuvo reacción cruzada con antígenos de *T. cruzi* y que adicionalmente fue reconocido específicamente por pacientes con ambas formas clínicas de leishmaniasis.

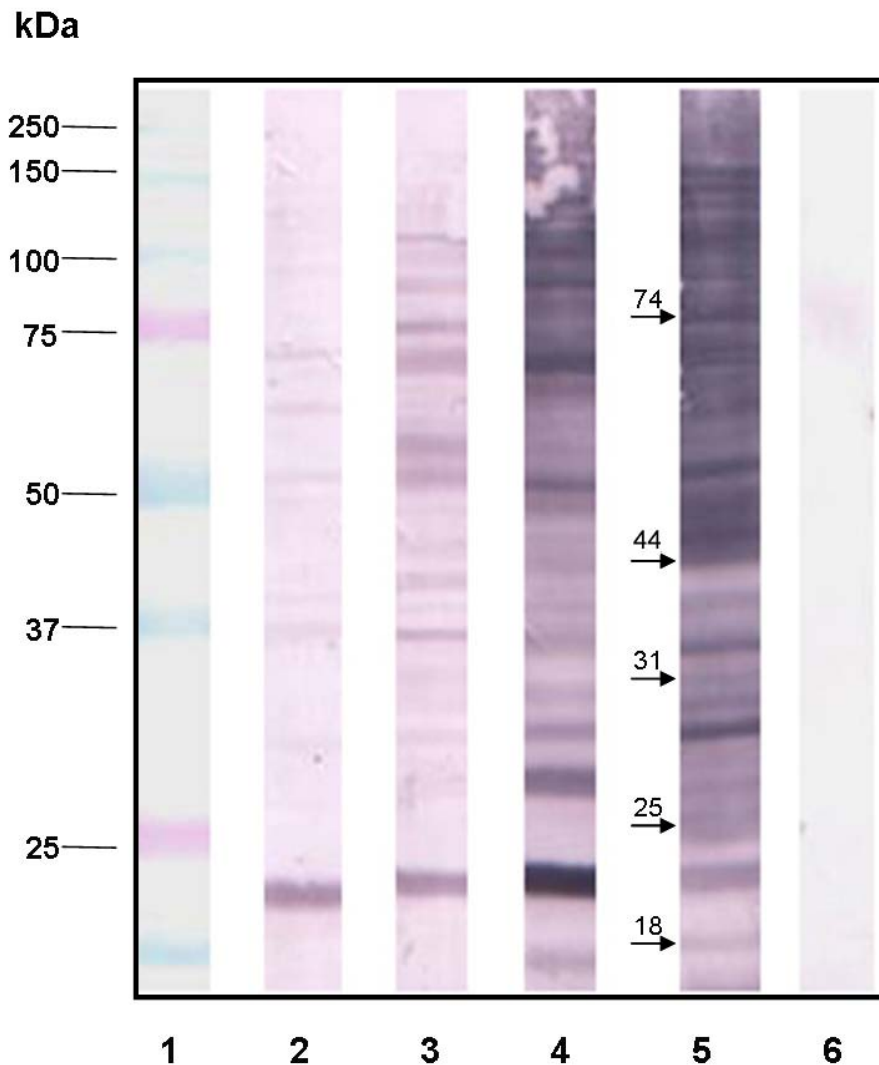


**Fig. 3. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los sueros de pacientes con LCL y LCD.** En esta figura se muestra un blot que contiene extracto antigénico de *L. mexicana* (2-5) y *T. cruzi* (6) que se incubó con diferentes pool de sueros. El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El carril 2 se incubó con un pool de sueros sanos, el carril 3 con un pool de LCL, el carril 4 con un pool de LCD y los carriles 5 y 6 con un pool de sueros con enfermedad de Chagas. El carril 7 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 4. \* Indica proteína de 39 kDa.



#### **5.4. Determinantes antigénicos de *Trypanosoma cruzi***

Este ensayo se realizó con la finalidad de observar la reactividad de “pools” de sueros sanos y sueros positivos para LCL, LCD y Chagas contra los componentes antigénicos de *T. cruzi*. En la figura 4 se muestra el revelado inmunoenzimático que permitió detectar los componentes ya reportados como inmunodominantes de *T. cruzi* y reconocidos únicamente por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y que son proteínas de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa (Bucio, *et al.*, 1999). Por otro lado, no se observó la banda de 39 kDa en el perfil antigénico de *T. cruzi* reconocido por los pacientes con LCL y LCD. Mediante esta prueba confirmamos la especificidad del antígeno de 39 kDa, presente únicamente en *Leishmania*.

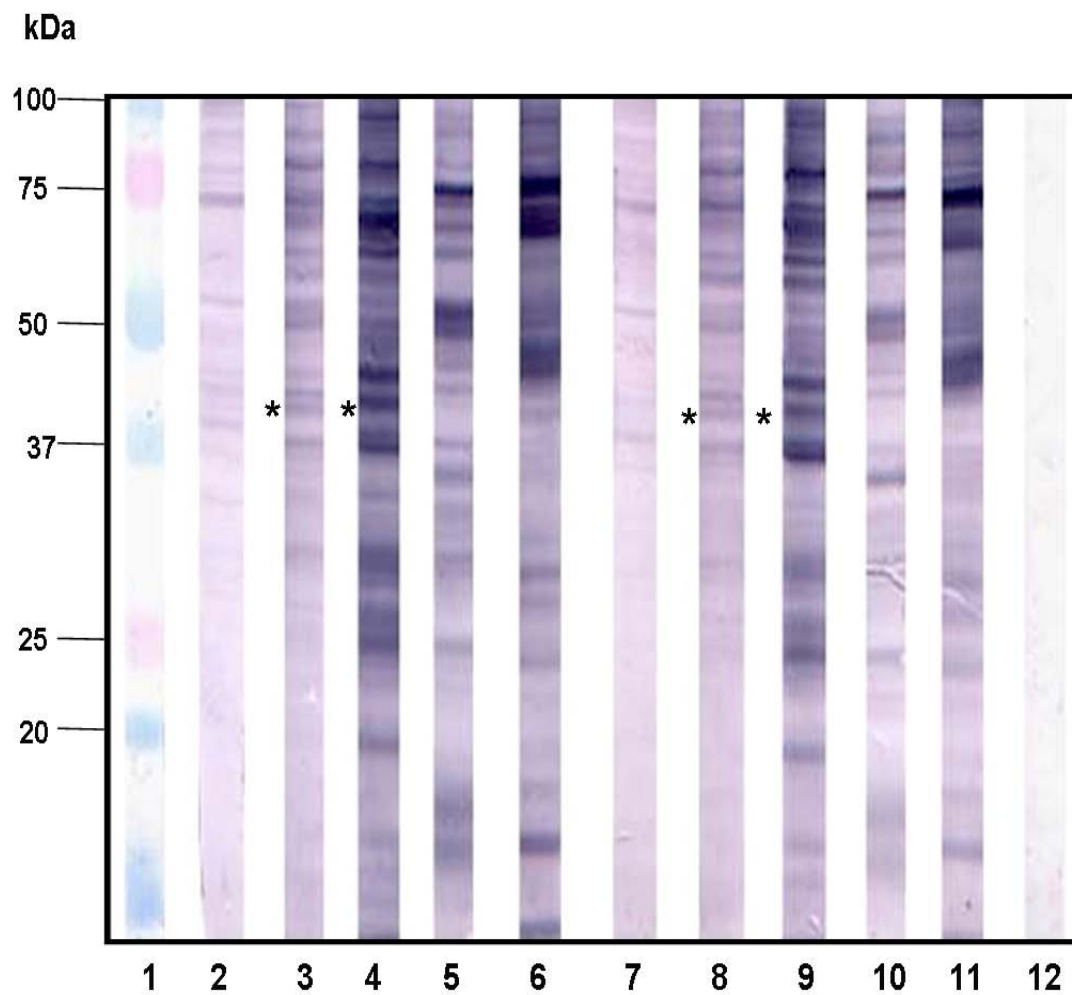


**Fig. 4. Análisis por Western-blot de las proteínas de *T. cruzi* que reaccionan específicamente con los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.** En esta figura se muestra un Western-blot hecho con extracto proteico de *T. cruzi*, el cual fue incubado con diferentes “pools” de sueros. El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El carril 2 corresponde a un pool de sueros sanos, el carril 3 corresponde a un pool de pacientes con LCL, el carril 4 a un pool de sueros de pacientes con LCD y el carril 5 a un pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. El carril 6 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 4.

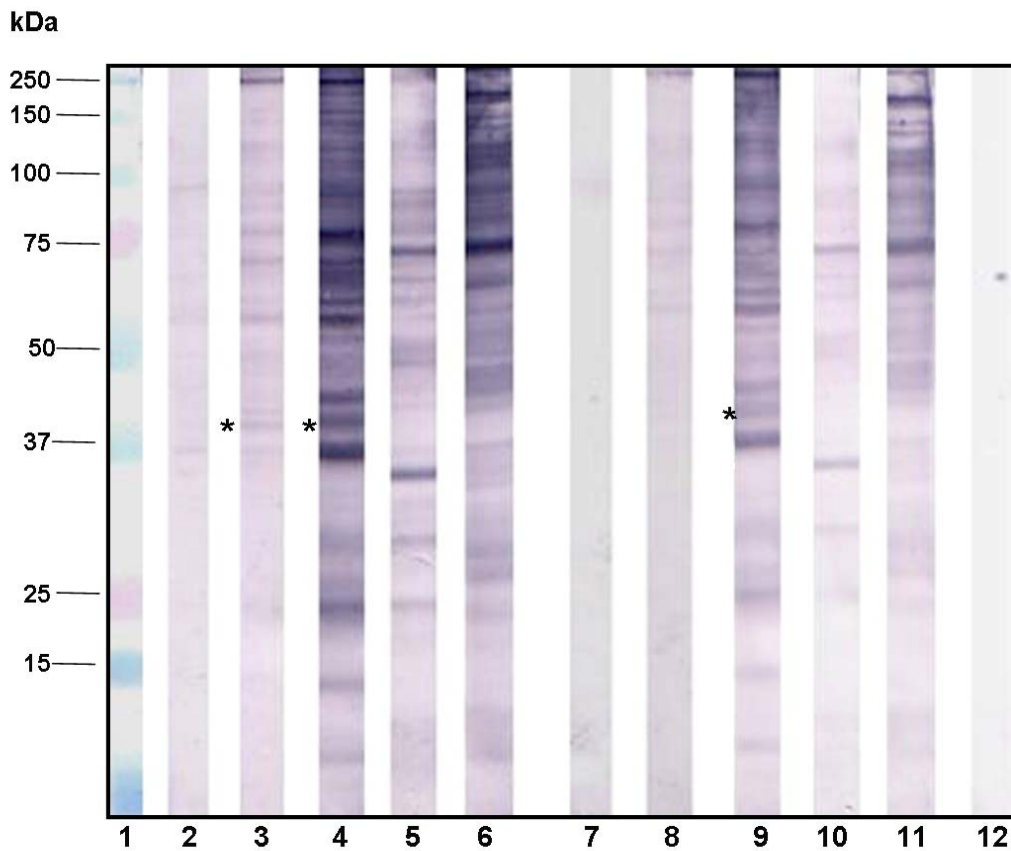
## **5.5. Dilución óptima de sueros de pacientes.**

Este ensayo se realizó para conocer la dilución óptima de los sueros para observar la banda de 39 kDa en pacientes con LCL, LCD. Como controles negativos se utilizaron el pool de sueros sanos y el pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Las diluciones utilizadas fueron de: 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:4000. En las figuras 5 y 6 podemos observar que la banda de 39 kDa disminuye su intensidad proporcionalmente con el aumento del factor de dilución de los sueros humanos. Se observó que prevalece aún en altas diluciones en pacientes con LCD. Así mismo, determinamos que la dilución 1:100 de los sueros fue la mas adecuada ya que el perfil proteico se observa claramente y nos permite determinar que hay antígenos que no presentan un cruce inmunológico y nos permitió optimizar el uso del suero (Tabla 2).

Adicionalmente, en la figura 6 se observa que los sueros de pacientes con LCD reconocen el antígeno de 39 kDa aún con diluciones altas y que esta proteína no es reconocida por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Los pacientes con LCD cursan con una hipergamaglobulinemia y estos títulos elevados de anticuerpos permiten reconocer los antígenos a diluciones altas en las cuales los sueros de pacientes con LCL ya no reconocen a los antígenos específicos.



**Fig. 5. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en diferentes sueros a distintas diluciones.** El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El extracto de *L. mexicana* se incubó con pool de sueros sanos (2 y 7), pool de sueros de pacientes con LCL (3 y 8), con LCD (4 y 9) y con enfermedad de Chagas (5 y 10). Como controles positivos de los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas se incluyeron dos carriles con extracto de *T. cruzi* incubados con un pool de sueros de pacientes con Chagas (carril 6 y 11) a dilución 1:10 (2-6) y 1:100 (7-11). El carril 12 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 3 \* **Indica proteína de 39 kDa.**



**Fig. 6. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en diferentes sueros a distintas diluciones.** El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El extracto de *L. mexicana* se incubó con pool de sueros de sujetos sanos (2 y 7), pool de pacientes con LCL (3 y 8), con LCD (4 y 9) y con enfermedad de Chagas (5 y 10) y el extracto de *T. cruzi* se incubó solo con un pool de sueros con enfermedad de Chagas (carril 6 y 11) a dilución 1:1000 (2-6) y 1:4000 (7-11). El carril 12 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 3. \* Indica proteína de 39 kDa.

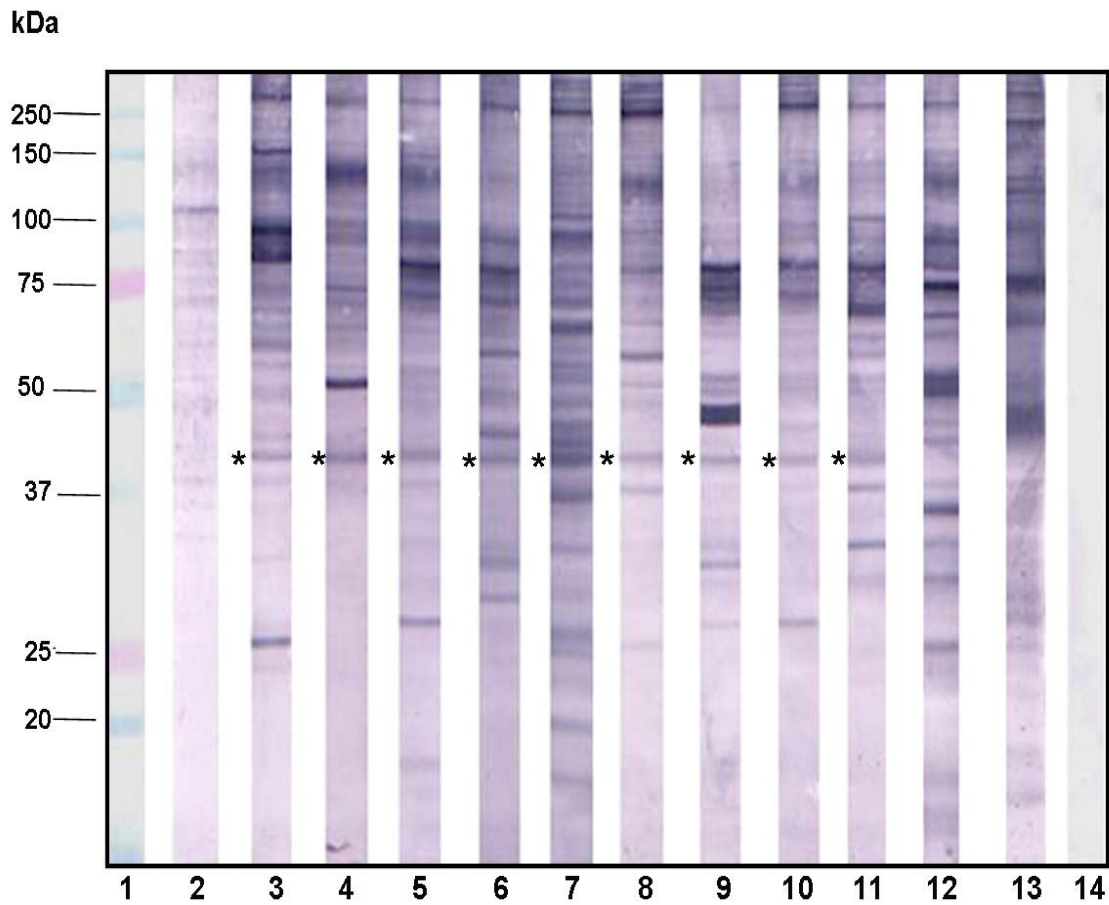
**Tabla. 2. Prevalencia de la banda de 39 kDa a distintas diluciones del suero humano.**

	1:10	<b>1:100 *</b>	1:1000	1:4000
<b>LCL</b>	39 kDa	39 kDa	39 kDa	No se observó
<b>LCD</b>	39 kDa	39 kDa	39 kDa	39 kDa

En esta tabla se observa que los sueros de pacientes con LCD aún reconocen el antígeno a diluciones elevadas, donde los sueros de pacientes con LCL, que contienen menores niveles de anticuerpos que los pacientes con LCD, ya no reconocen al antígeno.

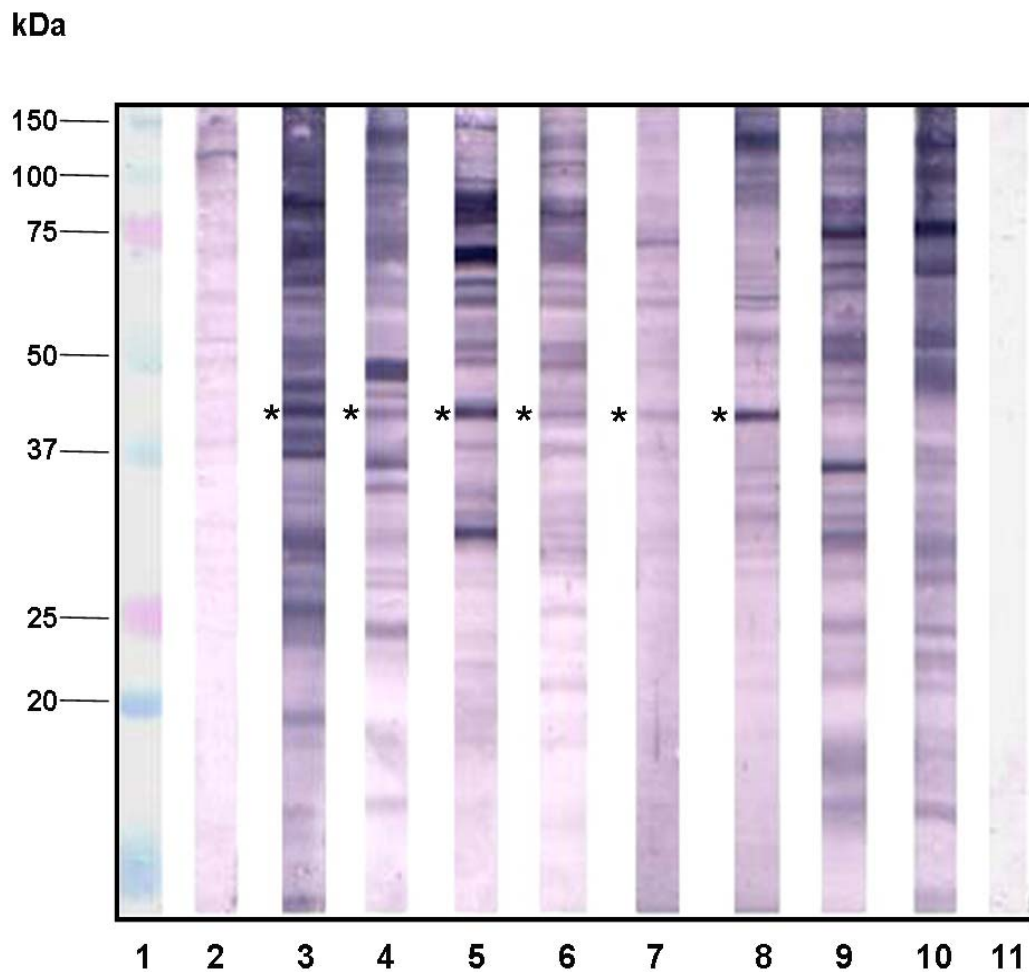
#### **5.6. Análisis de Western blot de sueros individuales de pacientes con LCL y LCD.**

Este ensayo se realizó con la finalidad de observar en cuantos pacientes con LCL (n= 18) y LCD (n= 8) prevalece el reconocimiento de la banda de 39 kDa. Observamos en las figuras 7, 8 y 9 que todos los sueros de pacientes con LCL presentan una reacción positiva para esta proteína (Tabla 3) al igual que todos los sueros de pacientes con LCD representados en la figura 10 (Tabla 4). Por otro lado, esta proteína no es reconocida por el pool de sueros sanos ni por pacientes con enfermedad de Chagas.



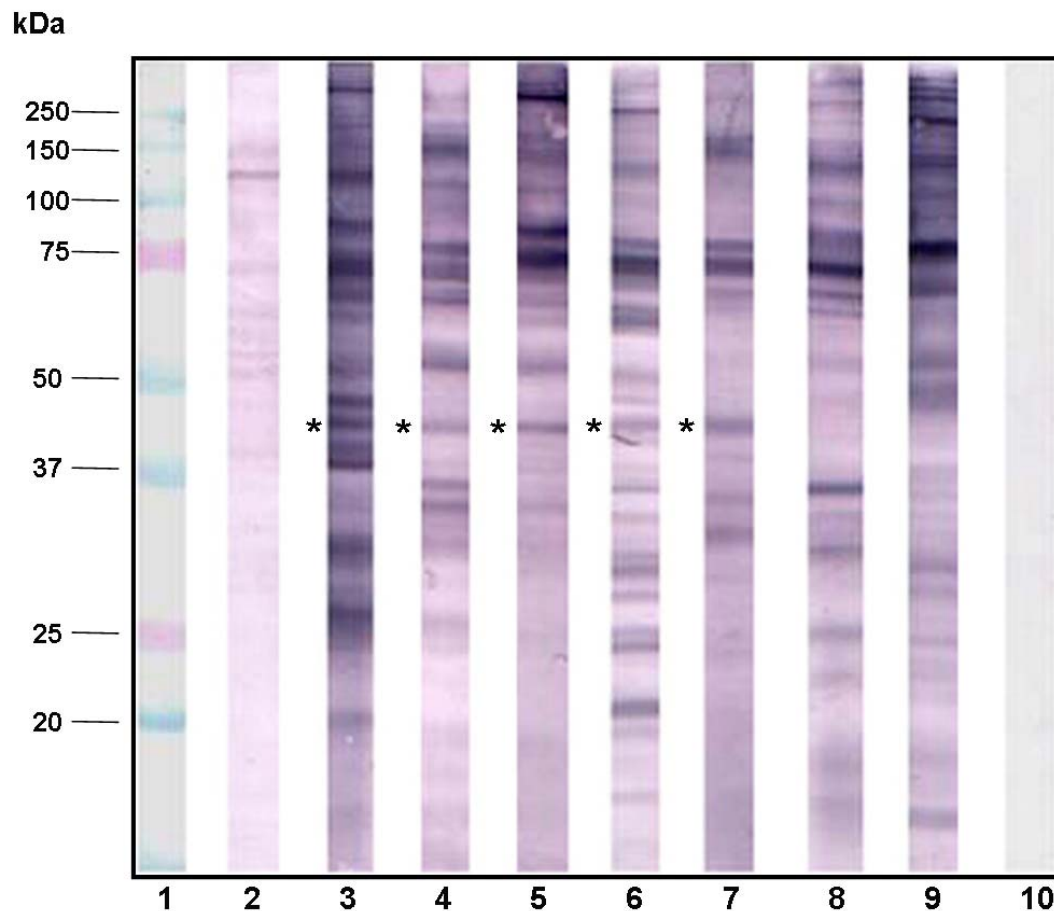
**Fig. 7. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en sueros individuales con LCL.** El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El extracto de *L. mexicana* se incubó con sueros sanos (2), pacientes individuales con LCL (3-11) y pool de pacientes con enfermedad de Chagas (12). Como control positivo para los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas se incluyó el extracto de *T. cruzi*, el cual se incubó con un pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (carril 13). El carril 14 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 6. \* **Indica proteína de 39 kDa.**

Se observa que el antígeno de 39 kDa es reconocido por todos los pacientes con LCL.



**Fig. 8. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en sueros individuales de pacientes con LCL.** El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El extracto de *L. mexicana* se incubó con un pool de sueros de sujetos sanos (2), pool de sueros de LCD (3), sueros individuales de pacientes con LCL (4-8) y pool de sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas (9). Adicionalmente se realizó el control positivo de los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas utilizando un extracto de *T. cruzi* (carril 10). El carril 11 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 6. \* **Indica proteína de 39 kDa.**



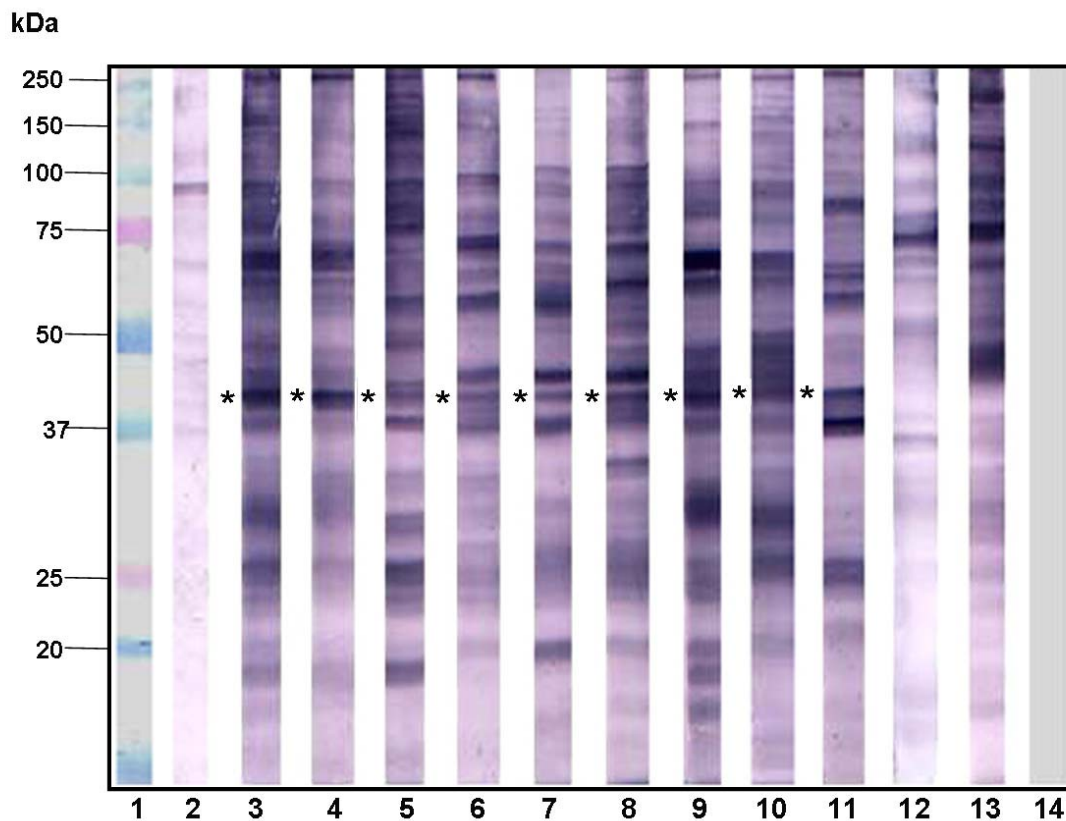


**Fig. 9. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos de sueros individuales de pacientes con LCL.** El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El extracto de *L. mexicana* se incubó con sueros sanos (2), pool de sueros de LCD (3), sueros individuales de pacientes con LCL (4-7) y pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (8) y el control positivo de un pool de sueros de pacientes con Chagas incubado con extracto de *T. cruzi* (carril 9). El carril 10 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 6. \* **Indica proteína de 39 kDa.**

Nuevamente se observa que todos los sueros individuales de pacientes con LCL reconocen la proteína de 39 kDa, aunque con distinta intensidad. Esta proteína no es reconocida por el pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y tampoco se encuentra entre las proteínas de *T. cruzi*.

Tabla. 3. Reconocimiento del antígeno de 39 kDa por los sueros individuales de pacientes con LCL (n = 18)

Banda	No. Pacientes que reconocen la banda	% de positivos
39 kDa	18/ 18	100%



**Fig. 10. Análisis por Western-blot de las proteínas de *L. mexicana* que reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en sueros individuales de pacientes con LCD.** El carril 1 corresponde al estándar de pesos moleculares. El extracto de *L. mexicana* se incubó con pool de sueros sanos (2), pool de pacientes con LCD (3), pacientes con LCD de manera individual (4-11) y un pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (12). Adicionalmente se incubó el extracto de *T. cruzi* con un pool de sueros de pacientes con enfermedad Chagas (13). El carril 14 corresponde al control de Ac. 2°. Experimento representativo de 6. \* Indica proteína de 39 kDa.

**Tabla. 4. Reconocimiento del antígeno de 39 kDa por sueros individuales de pacientes con LCD**

Banda	No. de Pacientes que reconocen la banda	% positivos
39 kDa	8/8	100%

## VI. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha visto un aumento en el número de personas infectadas por las distintas especies de *Leishmania*, convirtiéndose en una de las enfermedades emergentes más importantes a nivel mundial. Esto debido no solo a su creciente magnitud, sino por las consecuencias socioeconómicas y psicológicas que caracterizan a la enfermedad, la cual puede llegar a ser deformante e incluso incapacitante (Velasco, 1987). A pesar de que la enfermedad es una zoonosis, las constantes modificaciones que el hombre ha causado a los ecosistemas naturales tales como la urbanización, deforestación, los nuevos asentamientos, el desarrollo de la agricultura, la disminución y exterminio de los animales que sirven como reservorio y de alimento al vector, han llevado a alterar el ciclo de transmisión, obligando al vector a alimentarse de sangre humana y subsecuentemente reduciendo el número de hospederos intermediarios y aumentando el número de personas infectadas (Desjeux, 2001; Reithinger *et al.*, 2007).

Las medidas recomendadas para el control del vector en zonas endémicas son el uso de mosquiteros en puertas y ventanas de la casa, el uso de repelentes, así como de sabanas impregnadas con insecticidas. Sin embargo, el control del vector requiere de medidas costosas de buena infraestructura. Además el control de la leishmaniasis depende de la detección temprana y del tratamiento químico. Por otro lado, aún no hay tratamientos específicos para la leishmaniasis que sean de bajo costo y accesibles a la población más pobre, de manera que los enfermos no acuden al médico y tratan la enfermedad con remedios caseros dentro de los que destacan los procedimientos de cauterización utilizando sulfato de cobre, ácido sulfúrico de las baterías o la aplicación de una fuente de calor como agua caliente u objetos metálicos calentados al fuego (al rojo vivo) (Becker, 2006; Alvar, *et al.*, 2006).

El desarrollo de un método serológico y específico de diagnóstico en áreas endémicas en donde se presenta la enfermedad es extremadamente importante

ya que la leishmaniasis suele coexistir con otro tipo de padecimientos como la enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*. Diversos autores sugieren la existencia de pacientes que sufren de coinfección con ambos parásitos (Chiaramonte *et al.*, 1999; Mendes *et al.*, 2007). La técnica de Western-blot es considerada dentro de los métodos serológicos más sensibles y específicos para el diagnóstico de la leishmaniasis, adicionalmente nos provee información acerca de la respuesta humoral generada contra el parásito durante la infección y permite utilizar y comparar diferentes antígenos simultáneamente (Saha *et al.*, 2005). Por otro lado, poco se sabe sobre la relativa importancia del potencial diagnóstico de moléculas antigénicas de *Leishmania* y *Trypanosoma* (Reed *et al.*, 1987), por ello en el presente estudio se evaluó la reactividad de sueros de pacientes con leishmaniasis y enfermedad de Chagas contra extractos antigénicos específicos de cada especie y con base en estos se identificaron antígenos específicos para *L. mexicana* que no presentaron reacción cruzada con *Trypanosoma cruzi*.

En los ensayos por Western-blot donde se analizó la reactividad de los sueros con leishmaniasis y con enfermedad de Chagas utilizando extractos antigénicos de *L. mexicana* y *T. cruzi* observamos perfiles antigénicos similares, como se ha reportado por diversos autores. Esto puede explicarse debido a que diversos organismos tanto procariontes como eucariontes presentan proteínas conservadas resultado de asociaciones simbióticas evolutivas lo cual resulta en reacciones cruzadas serológicas (Mendes *et al.*, 2007).

En la literatura son muy pocos los reportes sobre la identificación de antígenos específicos de *Leishmania mexicana*, entre ellos Pérez y colaboradores (1996) mediante el método de Western-blot analizaron y reportaron fracciones polipeptídicas de *L. mexicana* de 84, 77, 63, 28 y 18 kDa las cuales fueron reconocidas por sueros de pacientes con LCL incubadas con las proteínas del parásito. Por otro lado, Monroy-Ostria y colaboradores (1997) también utilizando la técnica de Western-blot reportaron antígenos de *L. mexicana* reconocidos por pacientes con LCD (105, 139, 117 y 205 kDa) y con LCL (205 y 175 kDa). Sin

embargo, ninguno de estos trabajos logró establecer un método rutinario para el diagnóstico de la leishmaniasis en México. El perfil antigénico que detectamos en los ensayos de Western blot, mostrado en la fig. 3, para los pacientes con LCL y LCD fue de una proteína de aproximadamente 39 kDa. Así mismo, confirmamos la presencia de antígenos que habían sido reportados como específicos para *Trypanosoma cruzi* y reconocidos por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa (Bucio *et al.*, 1999) (fig. 4). Con este tipo de información probablemente se podría detectar coinfección de pacientes con ambos padecimientos. Por otra parte, el que hayamos detectado solo una banda específica para *Leishmania mexicana* pese a lo ya reportado, es probablemente debido a diferencias entre los métodos aplicados, antígenos utilizados y al tamaño de la población analizada.

Los sueros de pacientes con ambas formas clínicas de la leishmaniasis cutánea (LCL y LCD) utilizados en este estudio reconocen a la proteína de 39 kDa que es específica para *L. mexicana*, aunque en general también reconocen otras proteínas compartidas con *Trypanosoma cruzi*. En el trabajo de Monroy-Ostria y colaboradores (1997) se observó que los pacientes con LCL y LCD infectados con *Leishmania mexicana* reconocen una proteína de 205 kDa. En otro estudio previo se observó el mismo fenómeno entre pacientes con LCL y LCD pero infectados con *L. amazonensis*, aunque no mencionan cuales son las bandas identificadas para cada uno de los pacientes (León *et al.*, 1990). Las diferencias que presentan los pacientes con LCL y LCD en cuanto al reconocimiento de proteínas antigénicas del mismo aislado se debe a que durante la infección por *Leishmania* se expresan diversos factores genéticos los cuales son diferentes entre las diversas razas humanas o a nivel de individuo, esta resistencia y susceptibilidad a la infección también se ha observado en modelos murinos donde los ratones C57BL/6 son resistentes ya que inducen un patrón de citocinas del tipo Th1 con elevados niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  lo que lleva a la resolución de la enfermedad tal como los pacientes con LCL y los ratones BALB/c considerados susceptibles como los LCD, presentan una respuesta Th2 con una producción predominante de

IL-4 e IL-10, lo cual reduce las funciones efectoras del macrófago exacerbando la enfermedad. Por otro lado, la virulencia del parásito infectante determina los factores inmunoreguladores de la infección, todo lo anterior determina la diversidad clínica entre las leishmaniasis (León *et al.*, 1990; Trujillo *et al.*, 1999).

Por otro lado, se observó que la banda de 39 kDa fue reconocida por pacientes con LCL y LCD, pero se presentó un mayor reconocimiento en los pacientes con LCD. Aún no hay información acerca de la función de esta proteína de 39 kDa que es reconocida ampliamente por pacientes con leishmaniasis cutánea. Existen reportes donde se menciona que los pacientes con LV reconocen una proteína de 40 kDa, con una frecuencia del 86% (Salotra *et al.*, 1999). Así mismo, en otro estudio utilizando sueros de pacientes con LV y post kala-azar infectados con *L. donovani*, se reportó que hubo reconocimiento de una proteína de 39 kDa, aunque su frecuencia fue muy baja (aproximadamente de 48 %) (Saha *et al.*, 2005).

Debido a su alta reactividad, la banda de 39 kDa está siendo caracterizada para posteriormente purificarla, expresarla y obtener una proteína recombinante que nos permita el desarrollo de un método de diagnóstico específico que resuelva el problema de la reacción cruzada entre pacientes con leishmaniasis y enfermedad de Chagas. Esto tal vez permita mejorar la sensibilidad y especificidad del método de ELISA, como se ha intentado en otros estudios utilizando antígenos recombinantes (Singh, *et al.*, 2005) Entre los diversos estudios que han analizado el potencial diagnóstico de antígenos recombinantes tenemos a la proteína recombinante de 11 kDa llamada Proteína-11 de la Membrana del Cinetoplasto (KMP11). La KMP11 se encuentra asociada a la LPG que está localizada en toda la superficie del parásito y fue descrita por primera vez en *L. donovani* y posteriormente en *L. infantum* y se ha visto que esta proteína posee un alto potencial para inducir linfoproliferación en pacientes con LCL y LV, sin embargo al probar la recombinante en ELISA se ha observado reacción cruzada con *T. cruzi* (Trujillo *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001). Por otra parte, en

un estudio posterior en *T. cruzi* se observó que los pacientes con enfermedad de Chagas reconocían péptidos lineares de la KMP11 ubicados en la región carboxilo-terminal de la proteína, mientras que los pacientes con LV reconocían epítopes conformacionales, por lo que la proponen como buena candidata para el diagnóstico serológico diferencial de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Thomas *et al.*, 2001). Otra de las proteínas recombinantes desarrolladas más prometedoras es la rK39, la cual se encuentra disponible en forma de tira reactiva para el diagnóstico de la LV con niveles de sensibilidad y especificidad aceptables, con un costo mínimo (~ 1 – 1.5 dólares) y de fácil aplicación aún en condiciones desfavorables. Actualmente no hay otro método de diagnóstico basado en antígenos clonados de *Leishmania* (Sundar & Rai., 2002).

Se sabe que tanto la leishmaniasis como la enfermedad de Chagas pueden ser transmitidas por transfusión sanguínea. En México, debido a la falta de estudios, hay pocos reportes para leishmaniasis, sin embargo, para la enfermedad de Chagas en 1998 Guzmán y colaboradores reportaron un estudio donde se estimó la prevalencia nacional de la infección en candidatos donantes de sangre de 18 bancos de sangre de la Secretaría de Salud, el análisis reveló una prevalencia de infección del 1.5 % en la población analizada. Por lo tanto, el haber encontrado un antígeno específico para *Leishmania* también permitiría realizar un análisis masivo de los donadores de sangre, sobre todo los provenientes de zonas endémicas y con ello evitar este tipo de transmisión.

Es importante implementar pruebas diagnósticas específicas para áreas endémicas donde se ha reportado la coexistencia de ambos parásitos, pues el tratamiento para ambas enfermedades está basado en distintos compuestos químicos. En el caso de la leishmaniasis el tratamiento es a base de antimoniales pentavalentes mientras que para la enfermedad de Chagas es común utilizar Nifurtimox, sin embargo, este último no se encuentra disponible en nuestro país dificultando el control sobre la enfermedad de Chagas (Croft *et al.*, 2005; Berzunza, comunicación personal).



La importancia de implementar la técnica de Western-blot radica en que puede ser una herramienta útil en estudios seroepidemiológicos e incluso podría ser incluida dentro de programas de diagnóstico para salud pública, ya que ofrece ventajas como son la comparación y observación del reconocimiento de perfiles antigénicos específicos. El haber encontrado una proteína específica para *Leishmania mexicana* permitirá en un futuro producirla de manera recombinante para ser utilizada para diagnósticos serológicos, tanto para la prueba de ELISA como para un Western-blot o bien una tira reactiva. La estandarización de esta técnica para su aplicación en el diagnóstico de leishmaniasis, no permitiría únicamente reducir el tiempo de diagnóstico, sino que representaría un reactivo de alta especificidad para la leishmaniasis y podría ser aplicado en laboratorios rurales de zonas endémicas.

## VII. CONCLUSIONES

- Se identificó una proteína de 39 kDa que es específica para *Leishmania mexicana* y es reconocida por los sueros de los pacientes con LCL y LCD (39 kDa), la cual no presentó reacción cruzada con antígenos de *Trypanosoma cruzi*, así mismo, no fue reconocido por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.
- La especificidad de la proteína de 39 kDa para leishmaniasis la hace una molécula candidata interesante para ser purificada, clonada y sintetizada de manera recombinante para ser utilizada como antígeno recombinante en pruebas de ELISA y Western-blot.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Una vez identificada a la proteína de 39 kDa como específica de *Leishmania mexicana* y reconocida únicamente por sueros de pacientes con LC, se aislará la proteína y se obtendrán secuencias parciales.
- Se buscará el gen que codifica para esta proteína en el banco de genes (Genbank), esto será posible ya que se conoce la secuencia completa del genoma de *Leishmania major* (Ivens *et al.*, 2005).
- Una vez identificado el gen se obtendrá la proteína recombinante, la cual nos permitiría utilizarla en la técnica de ELISA.
- Buscar la banda de 39 kDa en otras especies de *Leishmania*, lo cual sugeriría una banda conservada dentro del género y por lo tanto, se desarrollaría un método específico para la leishmaniasis.

## IX. REFERENCIAS.

- Aguinaga-Cuenca, A., Mesalina-Gutiérrez, A., Minaya-León, P., Del Águila-Vázquez, R., Falcón- Rosadio, E. & Reyes-Puma, N. 2000. Leishmaniasis. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Lima, Perú. pp.8-83.
- Akilov, O. E., Khachemoune, A. & Hasan, T. 2007. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int.J.Dermatol.* 46: 132-142.
- Aladro L., Ma. A. 2006. Principales clasificaciones de los Protozoos. Fac. Ciencias. UNAM. México. 8-25.
- Alvar, J., Yactayo, S. & Bern, C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22 (12) : 552-557.
- Ashford, R. W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 30(12-13):1269-81.
- Becker, I. 2006 Leishmaniasis. En Flisser A. y R. P. Tamayo. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos, ETM. México, D. F. pp. 394- 409.
- Becker, I., Carrada, G., Gudiño, M., González, C., Berzunza M., Rivas, B. y Velasco, O. 2005. Análisis de la Leishmiasis en México. OPS/OMS. 27-33.
- Bogitsh, B.J., Carter, C.E., Oeltman, T. N. 2005. *Human Parasitology*. Third edition. Elsevier, academic Press. USA. pp. 97-114.

- Bucio, M. I., M. Cabrera, E. L. Segura, E. Zenteno y P. M. Salazar- Schettino. 1999. Identification of immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunol. Invest. 28 (4): 257-268
- Burns, J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R. & Reed, S. G. 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 775-779.
- Chang, K.P. 2001. Leishmaniasis. Encyclopedia of life sciences. pp. 1-9
- Chappuis, F., Mueller, Y., Nguimfack, A., Rwakimari, J. B., Couffignal, S., Boelaert, M., Cavailer, P., Loutan, L. & Piola, P. 2005. Diagnostic accuracy of two rk39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral Leishmaniasis in Northeastern Uganda. J.Clin. Microbiol. 43 (12) : 5973-5977.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. & Boelaert, M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. Nat. Rev. Microbiol. 5 (11): 873-882
- Chiaramonte, M.G., Frank, F.M., Furer, G.M., Taranto, N.J., Margni, R.A. & Malchiodi, E.L. 1999. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. Acta Trop. 72 (3): 295-308.
- De Colmenares, M., Portus, M., Riera, C., Gallego, M., Aisa, M.J., Torras, S. & Munoz, C. 1995. Short report: Detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. Am J. Trop. Med. Hyg. 52 (5) : 427-428.

- Corliss, J. O. 1994. An interim utilitaria (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*. 33: 1-51.
- Croft, S.L., Barret, M.P., & Urbina, J.A. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 21 (11) : 508-512
- Cunningham, A.C. 2002. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol*. 72 (2): 132-141
- Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 95: 239-243.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. 27: 305-318.
- Fagundes, A., Marzochi, M.C., Perez, M., Schubach, A., Ferreira, A., Silva, J.P., Schubach, T. & Marzochi, K.B. 2007. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. *Acta Trop*. 101 (1): 25–30.
- Gilles, H.M. 1999. Protozoal Diseases. Ed. Arnold, Oxford University Press Inc. USA. 414- 529.
- Golsdby, R.; Kindt T.; Osborne, B y Kuby J. 2004. Inmunología. Ed. Mc Graw Hill. México. Págs. 158-161.
- Grevelink, S. & Lerner, E.1996. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol*. 34:257-72
- Guzmán, C.; García, L.; Floriani, J. Guerrero, S.; Torres, M. Ramírez, C. Y Velasco, O. 1998. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Pan Am J Public Health* 4 (2) : 94-98.

- Herwaldt, B.L. 1999. Leishmaniasis. Lancet. 354: 1191-1199.
- Herwaldt, B. L. 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin. Microbiol Rev. 14(4):659-88.
- Ilg, T. 2001. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. Med. Microbiol. Immunol. 190: 13-17.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., *et al.* 2005. The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. Science. 309: 436-442.
- Lee, J.J., Leedale, G.F. & Bradbury, P. 2000. An illustrated guide to the Protozoa. 2<sup>a</sup> ed. Society of Protozoologist. Lawrence, Kansas. pp. 1159-1177.
- León, L.L.; Machado, G.M.; Paes L.E. & Grimaldi, Jr. G. 1990. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84 ( 5 ) : 678-680.
- Mayrink , W., Coelho, G. L., P.D. Guimaraes, T.M., de Andrade, H. M., de Castro Peres, E. , da Costa, C.A., Coelho, V. & de Toledo, P. 2006. Immuno-biochemical evaluations of phenol and thimerosal as antigen preservatives in Montenegro skin test. Acta Trop. 98: 87-93.
- Meinecke, C. K., Shottelius, J., Oskam, I. & Fleischer, B. 1999. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis ( Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. Pediatrics. 104 (5): e65
- Mendes, D.G.; Lauria-Pires, L.; Nitz, N.; Lozzi, S.P.; Nascimento, R.J.; Monteiro, P.S.; Rebelo, M.M.; Rosa. A. de C.; Santana, J.M.; Teixeira, A. R. L.

2007. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. Trop. Med. Int. Health. 12 (5):629-636.

- Monroy-Ostria A., Sosa-Cabrera, T., Rivas-Sánchez, B., Ruiz-Tuyu, R., Mendoza-González, A. & Favila-Castillo, L. 1997. Seroepidemiological Studies of Cutaneous Leishmaniasis in the Campeche State of Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92 (1): 21-26.
- Murray, H., Berman, J., Davies, C. & Saravia, N. 2005. Advances in Leishmaniasis. Lancet. 366: 1561-1577.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (1996). Epidemiología y Control de la Leishmaniasis en las Américas, por País o Territorio. Cuaderno Técnico No. 44.
- Pearson, R.D. & de Queiroz S.A. 1996. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. 22: 1-13.
- Pérez, M. J., Cob, G. B., Cabrera, T. S. & Castro, J. Z. 1996. Identificación de antígenos específicos de *Leishmania mexicana* con sueros humanos inmunes de la Península de Yucatán, México. Rev. Biomed. 7(4): 197-204.
- Reed, S.G., Badaro, R. & Lloyd, R. 1987. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. J. Immunol. 138 (5) : 1596-1601.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. & Brooker, S.. 2007. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 7: 581-96.

- Saha, S., Mazumdar, T., Anam, K., Ravindran, R., Bairagi, B., Saha, B., Goswami, R., Pramanik, N., Guha, S.K., Kar, S., Banerjee, D. & Ali, N. 2005. *Leishmania* promastigote membrane Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting for differential diagnosis of Indian Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 43 (3): 1269-1277.
- Salotra, P., Raina, A. & Negi, N.S. 1999. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. *Br. J. Biomed. Sci.* 56 (4): 263-267.
- Salotra, P. & Singh, R. 2006. Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123: 295-310.
- Sánchez-Saldaña, Sáenz-Anduaga, L.E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N. & Regis-Roggero, A. 2004. Leishmaniasis. *Dermatol. peru.*, vol.14, no.2, p.82-98. ISSN 1028-7175.
- Schalling, H.D. & Oskam, L. 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health.* 7 (8): 641-651.
- Shore, G. L. 2001. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4<sup>o</sup> ed. ASM Press, American Society for Microbiology. pp. 205-234.
- Singh, S. y Sivakumar, R. 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49: 55-60.
- Singh, S., Dey, A. & Sivakumar, R. 2005. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5 (2): 251-265.



- Singh S. 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian. J. Med. Res. 123: 311-330.
- Sivakumar, R., Sharma, P., Chang, K-P. & Singh, S. 2006. Cloning, expression, and purification of the novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. Protein Expr Purif. 46(1):156-65. Epub 2005.
- Sundar, S. & Rai, M. 2002. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9 (5): 951-958.
- Thomas, M.C., Longobardo, M.V., Carmelo, E., Marañón, C., Planelles, L., Patarroyo, M.E. Alonso, C. & López, M.C. 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. Clin. Exp. Immunol. 123: 465-471.
- Trujillo, C., Ramírez, R., Vélez, I.D. & Berberich, C. 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrana protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. Immunol. Lett. 70: 203-209.
- Velasco, O. 1987. Las leishmaniasis en México. Rev. Lat-amer. Microbiol. 29: 119-126.
- Velasco, O., Bracho, C., Sánchez, B., Aguilar, F. & Hernández, J.G. 1994. La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de Cuadernos Técnicos del INDRE. SSA. México. p.p. 1-28

## APÉNDICE

- **Soluciones**

### **Acrilamida: Bis-Acrilamida**

Acrilamida	29.2 g
Bis-Acrilamida	0.8 g

### **Azul de Coomasie**

Etanol 95%	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua desionizada	400 ml
Azul brillante R-250	2. g

### **Amortiguador de Corrida 10 X pH 8.3**

Tris 25 mM	30.3 g
Glicina 190 mM	144 g
SDS 0.1%	10 g

### **Buffer AP (500 ml)**

Tris-HCl 100 mM pH = 9.5	50 ml
NaCl 100 mM	50 ml
MgCl <sub>2</sub> 5 mM	25 ml
dH <sub>2</sub> O	375 ml

### **Buffer de muestra 2 X**

Glicerol	2 ml
SDS 10 %	4 ml
Buffer concentrador pH 6.8	2.5 ml
Mercaptoetanol	10 ml

### **Buffer de lisis**

Tris-HCl	50 mM pH 7.4
Aprotinina	10 µg /ml
Leupeptina	2 µg /ml
Benzamidina	1mM

Esta solución se prepara en el momento de ser utilizada.

### **Gel concentrador (1Gel)**

Tris 0.5 M pH 6.8	375 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	875 $\mu$ l
Bis-acrilamida	250 $\mu$ l
Persulfato de Amonio al 10 %	20 $\mu$ l
Temed	1 $\mu$ l

### **Gel separador (1 gel)**

Tris 1.5 M pH 8.8	1250 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	1687 $\mu$ l
Bis-acrilamida	2062 $\mu$ l
Persulfato de amonio al 10 %	50 $\mu$ l
Temed	2.5 $\mu$ l

### **PBS 10 X pH= 7.4 ( 5 L )**

NaCl	539.1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	85.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.7 g
dH <sub>2</sub> O aforar a 5 L	

### **PBS-T**

PBS 1 X pH= 7.2 a 7.4	1 L
Tween 80	100 $\mu$ l

### **Solución de bloqueo ( Western-blot)**

Leche descremada Svelty	0.5 g
TBST 1 X	10 ml

### **Solución bloqueadora ( ELISA)**

NaOH 0.1 N	100 ml
Caseína	0.5 g
PBS 1 X pH = 7.2- 7.4	900 ml

\* Se ajusta pH con HCl concentrado

### **Solución desteñidora**

dH <sub>2</sub> O	1.25 L
Ácido acético	0.25 L
Metanol	1.0 L

### **Solución de transferencia**

Tris-Glicina 10 X	100 ml
Metanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	700 ml

### **TBST 10 X**

Tris	100 mM	pH 7.4
NaCl	1.5 M	
Tween 20	0.05 %	

### Reactivos, aparatos y material.

<b>Marca</b>	<b>Producto</b>
BIO-RAD	Acrilamida Bis-acrilamida Protein Assay (Bradford) Papel de nitrocelulosa (poro de 0.45 $\mu$ m) Marcadores de peso molecular Temed
Gibco	RPMI 1640 Suero fetal bovino PBS 1x (ELISA)
DAKO	HRP rabbit anti-human (IgA, IgG, IgM, K y $\lambda$ )
KPL	TMB peroxidase substrate Peroxidase solution B (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Scy-clon	Albumina Serica Bovina
SIGMA	Aprotinina Leupeptina Banzamidina Caseína 2-mercaptoetanol Azul Brillante R-250 Nitrotetrazolium blue chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
ZYMED	Ac. 2° AP-goat anti-human IgG

<b>Marca</b>	<b>Equipo</b>
BECKMAN	Centrífuga Potenciometro
BIO-RAD	Equipo de electroforesis Trans-blot Semi-dry
BIO-TEK	Lector de ELISA
EPPENDORF	Micropipetas
NUAIRE	Campana de flujo laminar
OHAUS	Balanza analítica
SCIENCE	Congelador de -70°C
SONICS	Sonicador
THERMOLYNE	Vortex