



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

BÚSQUEDA DE *LEISHMANIA MEXICANA* EN MUESTRAS NO
CONVENCIONALES PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN
DIAGNÓSTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

P R E S E N T A:
MOISÉS ZACARÍAS GARCÍA

ASESOR:
M. EN C. RAQUEL MARÍA DEL REFUGIO TAPIA ROMERO

CO-ASESOR:
DRA. NORMA DEL CARMEN GALINDO SEVILLA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Búsqueda de *Leishmania mexicana* en muestras no convencionales para su potencial aplicación diagnóstica.

Que presenta el pasante: Moisés Zacarías García

Con número de cuenta: 411010517 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Agosto de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. René Damián Santos</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Carolina Moreno Ramos</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Bertha Ortiz Vázquez</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatoria

A mis padres: Lorenzo y Diana, que gracias a sus palabras de aliento y apoyo incondicional, concluyo una parte integral en mi formación profesional.

Gracias papás por tener las palabras adecuadas que me levantaban en tiempos de flaqueza y que con su ejemplo y sabiduría me enseñaron a conducirme en este camino llamado vida.

A mi hermana Cinthya, que siempre sabe cómo hacerme sentir mejor y se preocupa tanto por mi bienestar.

Gracias por todo el amor, la paciencia, la orientación y la motivación que me brindaron durante este largo pero fugaz camino y hacer que esto fuera posible.

Agradecimientos

A mis padres por ser el apoyo constante e incondicional que me han brindado en cada una de las etapas de mi formación personal y profesional.

A mi hermana por el apoyo emocional y la motivación para continuar a pesar de las adversidades.

A mi asesora, maestra y amiga Raquel Tapia Romero, que con su ejemplo, conocimiento y experiencia, me motivó a ser mejor cada día y me enseñó a que el conocimiento es parte fundamental del desarrollo de una sociedad y que jamás debe esconderse a los demás para el bienestar de la misma.

A mi co-asesora Norma del Carmen Galindo Sevilla que tuvo la confianza en mí en el proyecto.

A todos los profesores que me han visto crecer, y que gracias a su paciencia y enseñanzas, me encuentro en este punto de mi desarrollo profesional. Gracias por compartirme un poquito de su conocimiento.

A las personas que aportaron conocimientos y material para la realización de este proyecto, y que gracias a ellos, no tardé más tiempo en titularme.

A mis amigos, por haber formado la mejor hermandad que jamás existió en la vida y que gracias a su peculiar sentido del humor, me hicieron el camino más ameno y agradable. Gracias a sus vivencias, sus anécdotas, sus bromas y sobre todo, su compañía.

A Andrea por ser siempre un apoyo con el que puedo contar y otro punto de vista con el que puedo complementar el mío. Gracias totales.

A la voz interior que me susurraba al oído y siempre me cuestionaba las decisiones tomadas e inconscientemente me manipulaba para llevarme por el camino del bien.

A todos los japoneses que me motivaron e impulsaron a lograr superar mis límites, y me enseñaron a creer siempre en mí y jamás desistir por muy negativo que fuese el embrollo en el que me encontraba. Por enseñarme que ser competitivo es una virtud cuando se sabe aprovechar y ser humilde y solidario con los demás no es una debilidad.

Contenido.

i.	Índice de tablas.....	4
ii.	Índice de gráficas.....	4
iii.	Índice de abreviaturas.....	5
iv.	Índice de figuras.....	6
v.	Resumen.....	7
1	Antecedentes.....	8
1.1	Leishmaniosis.....	8
1.2	Agente etiológico.....	8
1.2.1	Clasificación taxonómica.....	8
1.2.2	Promastigote.....	10
1.2.3	Amastigote.....	10
1.3	Ciclo de vida.....	11
1.4	Biología del Vector.....	12
1.5	Clasificación y tipos de leishmaniosis.....	14
1.5.1	Leishmaniosis cutánea.....	15
1.5.2	Leishmaniosis cutánea difusa.....	16
1.5.3	Leishmaniosis mucocutánea.....	16
1.5.4	Leishmaniosis visceral (<i>kala azar</i>).....	18
1.5.5	Leishmaniosis dérmica post <i>kala azar</i>	19
1.6	Respuesta inmunológica.....	20
1.7	Epidemiología.....	22
1.8	Diagnóstico.....	25
1.8.1	Impronta.....	26
1.8.2	Biopsia de médula ósea.....	27
1.8.3	Biopsias de hígado, bazo o ganglios linfáticos.....	28
1.8.4	Frotis sanguíneo.....	29
1.8.5	Xenodiagnóstico.....	29
1.8.6	Pruebas inmunológicas y serológicas.....	30
1.9	Tratamiento.....	32
1.10	Organización genómica de <i>Leishmania spp</i>	34
1.11	PCR.....	35
1.11.1	Principios de la PCR.....	36
1.11.2	PCR punto final.....	38

1.11.3	PCR tiempo real	39
1.12	Justificación	42
2	Objetivos.....	43
2.1	Objetivo General	43
2.2	Objetivos Particulares	43
2.3	Hipótesis.....	43
3	Metodología.....	44
3.1	Material biológico	44
3.1.1	Cultivo del parásito y preparación del inóculo.....	44
3.1.2	Modelo animal.....	44
3.1.3	<i>Primers</i> utilizados.....	45
3.2	Muestreo.....	45
3.2.1	Muestras de mucosa oral del ratón.....	45
3.2.2	Muestras de pelo periférico al cojinete plantar del ratón.....	46
3.2.3	Muestras de orina.....	46
3.2.4	Muestras de biopsia por aspiración del cojinete plantar.....	46
3.3	Procesamiento de las muestras.....	46
3.3.1	Extracción y purificación de DNA.....	46
3.3.2	Cuantificación del DNA.....	47
3.3.3	Integridad del DNA.....	47
3.3.4	Estandarización de la PCR punto final.....	47
3.3.5	Amplificación por PCR punto final.....	48
3.3.6	Estandarización de la PCR tiempo real.....	48
3.3.7	Amplificación por PCR tiempo real.....	49
4	Resultados.....	50
4.1	Cuantificación del DNA de las muestras.....	50
4.2	Integridad del DNA de las muestras.....	51
4.3	Estandarización PCR punto final.....	53
4.4	PCR punto final.....	54
4.5	Estandarización PCR tiempo real.....	56
4.6	PCR tiempo real.....	58
5	Discusión.....	64
6	Conclusiones.....	68
7	Referencias	69

Anexos	71
Material biológico.	71
Materiales y equipo.	71
Protocolo de viabilidad.	72
Protocolo para determinar la concentración de parásitos por mL.	72
Protocolo de preparación del inóculo.	73
Protocolo de inoculación en el ratón.	73
Protocolo de preparación del DTT a 1M	74
Protocolo de extracción de DNA con <i>Purelink® Genomic DNA Mini Kit</i>	74
Protocolo de PCR punto final.	75
Protocolo de amplificación en PCR punto final.	76
Protocolo de electroforesis.	76
Protocolo de PCR tiempo real.	77
Protocolo de amplificación en PCR tiempo real.	78

i. Índice de tablas.

<i>Tabla 1. Registro epidemiológico de casos de leishmaniosis del 2001 al 2011 de países de América Latina.</i>	22
<i>Tabla 2. Tasa de incidencia por cada 100,000 habitantes de países con casos de leishmaniosis en América Latina.</i>	23
<i>Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de impronta como técnica de diagnóstico.</i>	26
<i>Tabla 4. Ventajas y desventajas del uso de biopsia de médula ósea como técnica de diagnóstico.</i>	27
<i>Tabla 5. Ventajas y desventajas del uso de biopsia de hígado, bazo o ganglios linfáticos como técnica de diagnóstico.</i>	28
<i>Tabla 6. Ventajas y desventajas del uso del frotis sanguíneo como técnica de diagnóstico.</i>	29
<i>Tabla 7. Ventajas y desventajas del uso del xenodiagnóstico como técnica de diagnóstico.</i>	30
<i>Tabla 8. Ventajas y desventajas del uso de pruebas inmunológicas como técnicas de diagnóstico.</i>	31
<i>Tabla 9. Ventajas y desventajas del uso de pruebas serológicas como técnicas de diagnóstico.</i>	32
<i>Tabla 10. Diferencias en el tratamiento con fármacos dependiendo de la vía de administración al paciente.</i>	33
<i>Tabla 11. Cuantificación del DNA de muestras de biopsia por aspiración.</i>	50
<i>Tabla 12. Cuantificación del DNA de muestras de mucosa oral.</i>	50
<i>Tabla 13. Cuantificación del DNA de muestras de orina.</i>	51
<i>Tabla 14. Cuantificación del DNA de muestras de pelo.</i>	51
<i>Tabla 15. Correspondencia por color de diluciones del control positivo en las reacciones de PCR en tiempo real.</i>	57
<i>Tabla 16. Correspondencia por color de diluciones del control positivo en las reacciones de PCR en tiempo real.</i>	58
<i>Tabla 17. Correspondencia por color de muestras de orina en las reacciones de PCR en tiempo real.</i>	61
<i>Tabla 18. Correspondencia por color de muestras de pelo en las reacciones de PCR en tiempo real.</i>	62

ii. Índice de gráficas.

<i>Gráfico 1. Amplificación del control positivo a las diluciones.</i>	57
<i>Gráfico 2. Disociación del control positivo a las diluciones.</i>	58
<i>Gráfico 3. Amplificación de muestras de biopsia por aspiración.</i>	59
<i>Gráfico 4. Disociación de muestras de biopsia por aspiración.</i>	59
<i>Gráfico 5. Amplificación de muestras de mucosa oral.</i>	60
<i>Gráfico 6. Disociación de muestras de mucosa oral.</i>	60
<i>Gráfico 7. Amplificación de muestras de orina.</i>	61
<i>Gráfico 8. Disociación de muestras de orina.</i>	62
<i>Gráfico 9. Amplificación de muestras de pelo.</i>	63
<i>Gráfico 10. Disociación de muestras de pelo.</i>	63

iii. Índice de abreviaturas.

μL	Micro litro.
CPA	Células presentadoras de antígeno.
dF	Diferencial de fluorescencia.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNAk	Ácido desoxirribonucleico del cinetoplasto.
dT	Diferencial de temperatura.
DTT	Ditiotreitol.
IFN	Interferón.
Ig	Inmunoglobulina.
IL	Interleucina.
LPG	Lipofosfoglicano.
MCAF	Factor quimiotáctico activador de monocitos.
mL	Mililitro.
NK	Asesinas naturales.
NTD	<i>Neglected tropical diseases.</i>
pb	Pares base.
PBS	Solución amortiguadora fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PMN	Polimorfonucleares.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero.
SSF	Solución salina fisiológica.
TAE	Tris-Ácido acético-EDTA.
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA.
TGF	Factor de crecimiento transformante.
TNF	Factor de necrosis tumoral.

iv. Índice de figuras.

<i>Figura 1. Agrupación taxonómica del parásito Leishmania spp. (OMS, 2015).</i>	9
<i>Figura 2. Estructuras internas de ambos estadios de Leishmania spp. (Besteiro, Williams, Coombs, y Mottram, 2007)</i>	11
<i>Figura 3. Ciclo de vida de Leishmania spp. (Sacks y Noben-Trauth, 2002).</i>	12
<i>Figura 4. Ciclo de vida del vector (Belkis, 2012).</i>	14
<i>Figura 5. Lesión característica de la leishmaniosis cutánea.</i>	15
<i>Figura 6. Lesiones características de la leishmaniosis cutánea diseminada.</i>	16
<i>Figura 7. Estructura nasal dañada por L. braziliensis conocida como trompa de tapir.</i>	17
<i>Figura 8. Infante que presenta hepato-esplenomegalia.</i>	19
<i>Figura 9. Lesiones clásicas en leishmaniosis post kala azar.</i>	19
<i>Figura 10. Incidencia de leishmaniosis cutánea y mucocutánea en América Latina (OMS, 2013).</i>	24
<i>Figura 11. Incidencia de leishmaniosis visceral en América Latina (OMS, 2013).</i>	24
<i>Figura 12. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa expresada gráficamente (Somma y Querci, 2013).</i>	36
<i>Figura 13. Vista de las fases de la PCR a nivel molecular (Somma y Querci, 2013).</i>	37
<i>Figura 14. Mecanismo molecular de los métodos específicos de la PCR en tiempo real (Tamay, 2013).</i>	40
<i>Figura 15. Mecanismo molecular de los métodos no específicos de la PCR en tiempo real (Tamay, 2013).</i>	41
<i>Figura 16. Integridad del DNA de muestras de biopsia por aspiración.</i>	52
<i>Figura 17. Integridad del DNA de muestras de mucosa oral.</i>	52
<i>Figura 18. Integridad del DNA de muestras de orina.</i>	52
<i>Figura 19. Integridad del DNA de muestras de pelo.</i>	53
<i>Figura 20. Gel del gradiente de temperaturas de alineación.</i>	53
<i>Figura 21. Electroforesis de amplificación de muestras de biopsia por aspiración.</i>	54
<i>Figura 22. Electroforesis de amplificación de muestras de mucosa oral.</i>	55
<i>Figura 23. Electroforesis de amplificación de muestras de orina.</i>	55
<i>Figura 24. Electroforesis de amplificación de muestras de pelo.</i>	56

v. Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por microorganismos del género *Leishmania spp*, mismos que son transmitidos comúnmente a través de la picadura de dípteros hembra del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*. En los mamíferos susceptibles puede ocasionar lesiones cutáneas, mucocutáneas y viscerales (Romero, 2007).

Las cifras nacionales registran 6 casos nuevos de leishmaniosis visceral y 428 casos nuevos de leishmaniosis cutánea y mucocutánea hasta la semana epidemiológica 53 del 2014 (Salud, 2015).

El diagnóstico realizado actualmente en los centros de salud está limitado a las técnicas directas que dependen de tinción o indirectas como inmunológicas o serológicas y están sujetas a las desventajas de las mismas, por lo tanto, es necesario implementar nuevas técnicas que cuenten con mayor sensibilidad y especificidad que ofrezcan al paciente un diagnóstico acertado a etapas tempranas de la enfermedad.

En este estudio experimental descriptivo, prospectivo y transversal, haciendo uso de técnicas moleculares como PCR punto final y PCR tiempo real, se amplificó DNA extraído de muestras de mucosa oral, orina y pelo de un modelo murino infectado con *Leishmania mexicana* en donde se encontró con la posibilidad de detectar el material genético de *Leishmania mexicana* en sitios alejados de la inoculación del parásito como lo son las muestras anteriormente descritas, evitando la invasividad de la toma de muestra y eliminando factores críticos como la tinción de muestras y la observación del microscopista, así como desventajas que tienen los métodos serológicos e inmunológicos para la detección actual del parásito, con la finalidad de que en estudios futuros se pueda escalar al diagnóstico con humanos en los centros de salud.

1 Antecedentes

1.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis constituye una variedad de enfermedades transmitidas por vector que son endémicas en 4 continentes, causadas por especies del protozooario flagelado *Leishmania spp.* el cual es intracelular obligado de células del sistema fagocítico mononuclear del ser humano y de otros mamíferos susceptibles que pueden actuar como reservorios: caninos, marsupiales, roedores, entre otros (Romero, 2007).

Estas enfermedades se caracterizan por ser de evolución crónica y por comprometer piel, mucosas y órganos internos dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante y la respuesta inmunitaria del hospedero (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Las personas pueden ser contagiadas si entran en contacto con el vector infectado mediante el ciclo natural de la enfermedad, o bien, mediante el ciclo antroponótico en humanos, que infecta a personas mediante el trasplante de órganos infectados, o por picadura de material quirúrgico infectado (Goldsmith y Heyneman, 1995).

En Europa, es considerada una enfermedad zoonótica debido a que los caninos son los principales reservorios urbanos y se encuentran en cercano contacto con los humanos (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Los agentes causales de estas enfermedades son protozoarios intracelulares del género *Leishmania* que desde el punto de vista morfológico son idénticos entre sí (Tay, 2010).

1.2 Agente etiológico

1.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: **Protista** Haeckel, 1866

Sub-reino: *Protozoa* Goldfuss, 1817

Filo: *Sarcomastigophora* Honigberg y Balamuth, 1963

Sub-filo: *Mastigophora*. Deising, 1866

Clase: *Zoomastigophora*. Calkins, 1909

Orden: *Kinetoplastida*, Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-orden: *Trypanosomatina*. Kent, 1880

Familia: *Trypanosomatidae*. Dofein, 1901, emend. Grobben 1905

Género: *Leishmania* Ross, 1903

(Levine et al., 1980)

En el siguiente esquema (figura 1), se muestra la clasificación de las especies pertenecientes al género *Leishmania spp.* de acuerdo a la descripción que dictamina la Organización Mundial de la Salud.

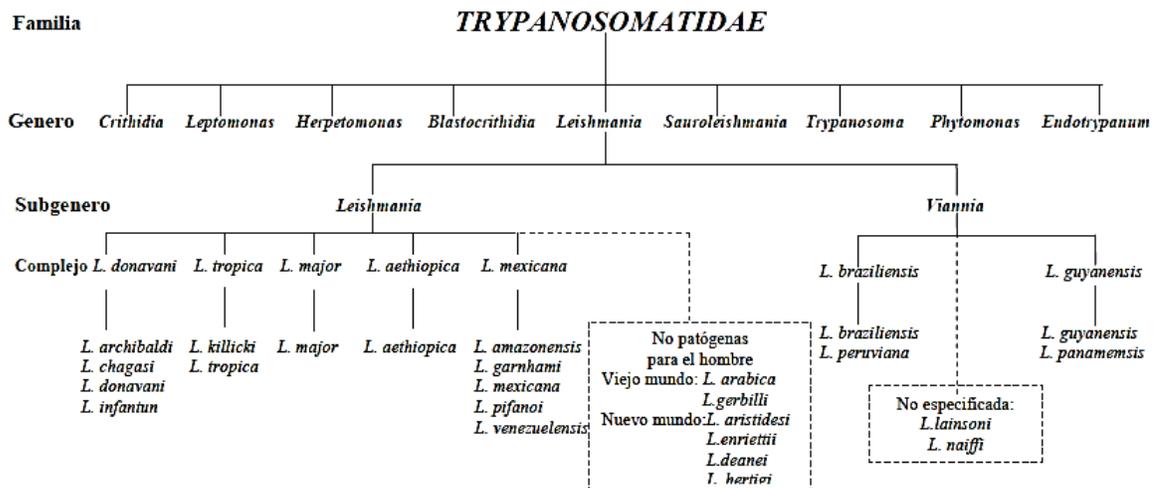


Figura 1. Agrupación taxonómica del parásito *Leishmania spp.* (OMS, 2015)

Los parásitos del género *Leishmania spp.* pasan por dos estadios en su ciclo de vida: el estadio flagelado llamado promastigote, cuyo ciclo alterna entre un invertebrado (vector) y un hospedero vertebrado, y el estadio sin flagelo llamado amastigote, que se encuentra dentro de los macrófagos en los mamíferos infectados. Por lo tanto, el estadio infectante del parásito en el hospedero vertebrado es el promastigote y el estadio que causa la enfermedad es el amastigote (Goldsmith y Heyneman, 1995).

1.2.2 Promastigote

Como se aprecia en la figura 2A, los promastigotes tienen morfología fusiforme, cuyas dimensiones van de 16 a 18 μm de longitud, poseen un núcleo central y el cinetoplasto está en posición anterior al núcleo, de donde emerge un flagelo que sale del parásito en la porción anterior sin formar membrana ondulante; esta fase se encuentra en el hospedero invertebrado y es la forma infectante para los mamíferos al ser inoculada por el mosquito (Tay, 2010).

Son introducidos durante la picadura del vector y son fagocitados por los macrófagos tisulares, en donde pierden el flagelo y la forma alargada característica de este estadio, para convertirse en amastigotes (Tay, 2010).

1.2.3 Amastigote

La enfermedad en humanos y otros mamíferos es causada por amastigotes que se encuentran dentro del citoplasma de los macrófagos tisulares. Como se observa en la figura 2B, conservan una forma ovoide o redonda, mide de 2 a 7 μm de diámetro, presenta una membrana, citoplasma, núcleo esférico y compacto con cromatina granulosa y cinetoplasto pequeño de forma ligeramente alargada (Tay, 2010).

Mediante tinciones tricrómicas (Giemsa o Wright) se pueden apreciar estas estructuras internas a detalle tanto en el estadio infectante como en el estadio patogénico (Goldsmith y Heyneman, 1995).

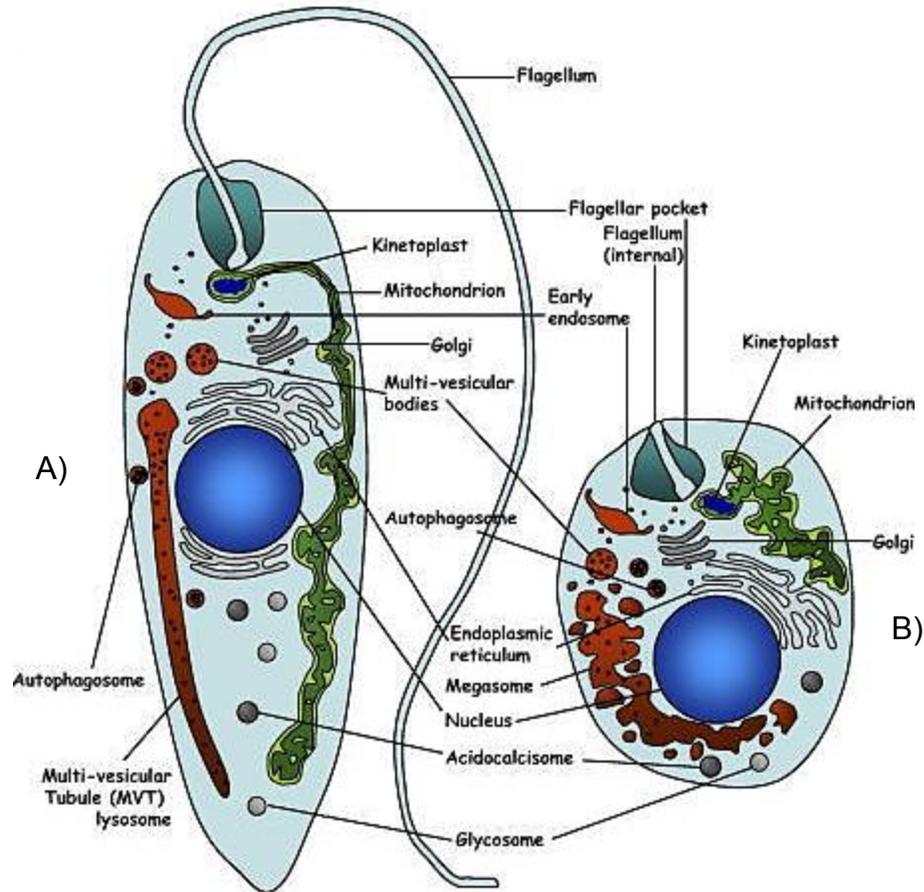


Figura 2. Estructuras internas de ambos estadios de *Leishmania spp.* A) Promastigote; B) Amastigote. (Besteiro, Williams, Coombs, y Mottram, 2007)

1.3 Ciclo de vida

Los amastigotes intracelulares invaden y se reproducen por fusión binaria longitudinal en las vacuolas parasitóforas dentro del citoplasma de los macrófagos hasta reventarlos, ocasionando la nueva infección de macrófagos sanos. En ocasiones son parasitados leucocitos polimorfonucleares, monocitos y células epiteliales de los capilares (Goldsmith y Heyneman, 1995).

El hospedero invertebrado se infecta al alimentarse de células infectadas del mamífero, principalmente macrófagos. Los macrófagos y otras células son digeridas en el intestino del vector liberando a los amastigotes. Estos se transforman en promastigotes mediante un mecanismo llamado metaciclogénesis. Los promastigotes se reproducen de la misma forma que lo hacen los amastigotes, crecen como flagelados fusiformes y migran del aparato

digestivo del vector hacia la faringe, concentrándose en las glándulas salivales y en la probóscide del mismo (Romero, 2007).

El ciclo se cumple cuando el vector infectado se alimenta de sangre de un mamífero sano. El vector inocula cantidades variables de parásitos que van de 100-1000 parásitos por picadura a través de la probóscide generando un efecto de sifón para alimentarse, es decir, succiona y empuja varias veces la sangre para desechar el tapón generado por los parásitos en la probóscide (Romero, 2007).

La figura 3 muestra el ciclo de vida y el proceso de infección que realiza el parásito del género *Leishmania spp.* dentro del hospedero y dentro del vector.

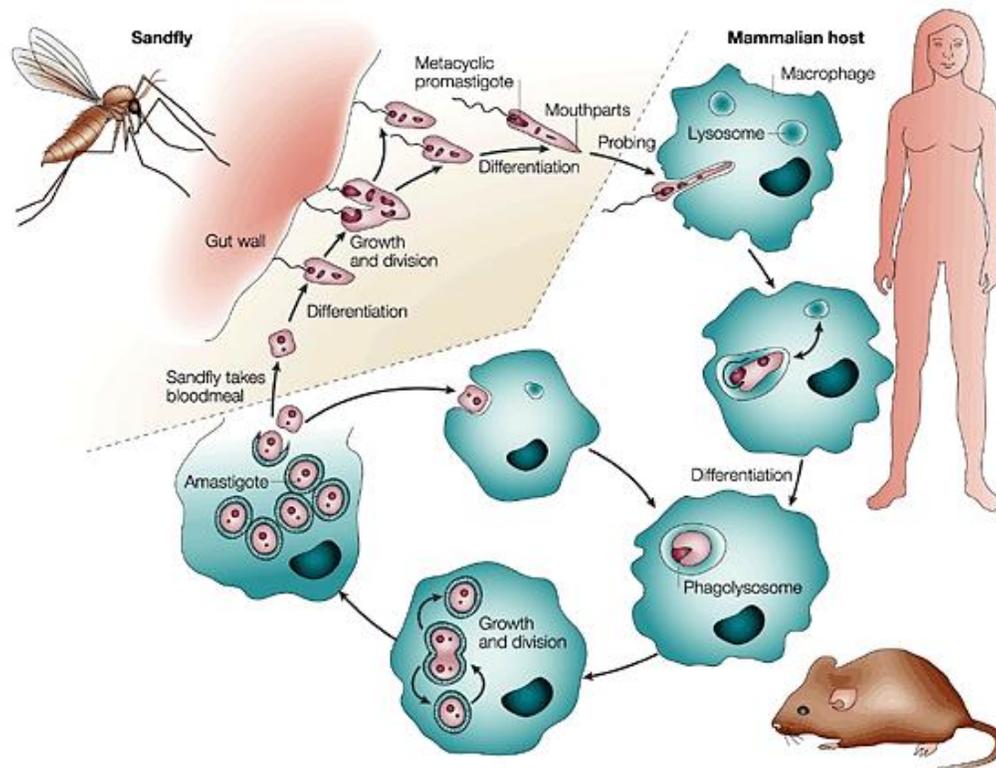


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania spp.* (Sacks y Noben-Trauth, 2002)

1.4 Biología del Vector

Se le llama vector a un organismo que transmite un agente infeccioso desde los individuos afectados a otros que aún no portan ese agente (EcuRed, 2013).

Para la leishmaniosis se tienen dos vectores, cada uno con un territorio confirmado y delimitado. Estos vectores son dípteros hembra de la familia *Psichodidae* y sub-familia

Phlebotominae. En Europa, los organismos que se encargan de la transmisión de la leishmaniosis son dípteros del género *Phlebotomus spp.*, mientras que en América, el género que cumple con esta función biológica es *Lutzomyia spp.* (Romero, 2007).

Los flebótomos, conocidos también como moscas de la arena (*sandfly* en inglés), son insectos nocturnos, por lo que su momento de mayor actividad se registra al atardecer. Entre sus características externas distintivas, destacan su cuerpo peludo y la posición de sus alas (en ángulo sobre el abdomen) cuando están en descanso (Besteiro et al., 2007).

Los flebótomos se alimentan de fuentes naturales de azúcar, pero sus hembras requieren de la ingestión de sangre para poder madurar sus huevos. La alimentación con sangre es precedida por la salivación en la piel del hospedero, ya que la saliva del flebótomo contiene anticoagulantes y vasodilatadores que facilitan la hemorragia. Estos vectores se alimentan de cualquier mamífero, pájaro o reptil (Scalibor, 2015).

Como se aprecia en la figura 4, los flebótomos tienen el siguiente ciclo biológico:

- a) Después de su alimentación con sangre la oviposición ocurre en 4-8 días.
- b) Los huevos de morfología oval alargada, eclosionan después de 7-10 días.
- c) Se dan 4 fases larvarias: Larva 1, Larva 2, Larva 3, y Larva 4. Manteniendo en general la misma morfología basal, variando únicamente su tamaño.
- d) Posteriormente se produce la fase de pupa
- e) Después de 10 días los flebótomos emergen de la pupa.

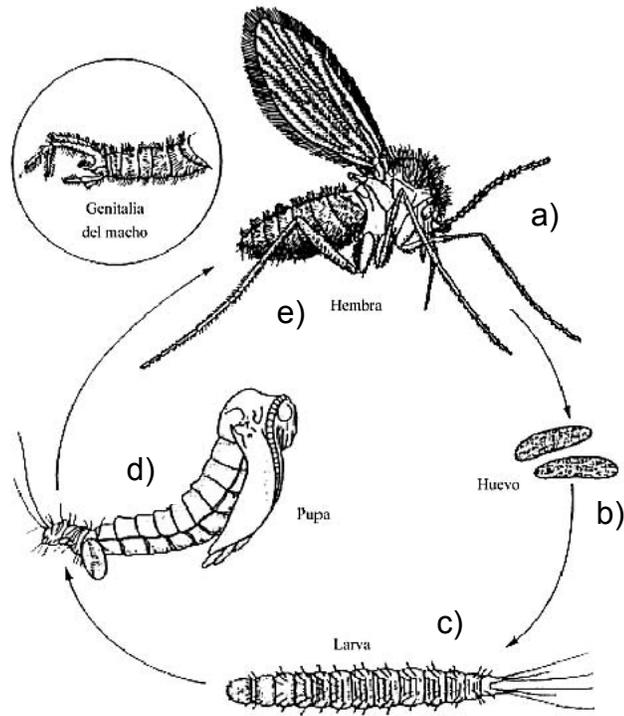


Figura 4. Ciclo de vida del vector. Díptero de la subfamilia *Phlebotominae* (Belkis, 2012).

1.5 Clasificación y tipos de leishmaniosis

Las leishmaniosis se clasifican en tres grupos principales. Esta clasificación está basada en diferencias que presentan las manifestaciones clínicas que se observen en el hospedero vertebrado, las cuales están relacionadas con diversos factores como la especie infectante, el medio ambiente y la respuesta inmunitaria del hospedero:

- a) Leishmaniosis cutánea (localizada y difusa). Causada por las especies *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis* (Goldsmith y Heyneman, 1995).
- b) Leishmaniosis mucocutánea. Causada por las especies *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. viannia* (Goldsmith y Heyneman, 1995).
- c) Leishmaniosis visceral. Causada por las especies *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* y *L. aethiopica* (Goldsmith y Heyneman, 1995).

1.5.1 Leishmaniosis cutánea

La leishmaniosis cutánea tiene características clínico patológicas que la distinguen de otros tipos de úlceras cutáneas, como la inflamación crónica intensa de las papilas dérmicas, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, inflamación granulomatosa, destacando el tejido de granulación en los cráteres (Romero, 2007).

El periodo de incubación va desde las dos semanas hasta varios meses. La atención médica se busca por la aparición de una lesión que no es dolorosa ni pruriginosa, la cual continúa creciendo y no muestra mejoría (Romero, 2007).

La mayor parte de las lesiones primarias son úlceras, verrugas o nódulos. Sus características reflejan su parecido con otras enfermedades de la piel; *frambesia*, *liquenoides*, *lupoides*, *esporotricoides*, entre otras. La apariencia inicial de la lesión puede ser modificada por infecciones secundarias de etiología bacteriana o micótica (Romero, 2007).

La lesión empieza al lado de la picadura como una pápula pequeña incolora similar a un granuloma por picadura de insecto. Crece formando un nódulo, el cual en cuatro semanas mide 1 cm de diámetro y desarrolla un pequeño hundimiento en el centro. Este se pierde varias veces y cada vez va cubriendo una úlcera de mayor tamaño (Goldsmith y Heyneman, 1995).

La úlcera clásica (ver figura 5) es circular de hasta 4 cm de diámetro, posteriormente tiende a hacerse irregular, con un borde elevado incoloro y un piso granular, casi siempre cubierto con un exudado húmedo (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Se le da el nombre de *úlceras de los chicleros* cuando esta ulceración se presenta en la oreja, erosiona el cartílago de la oreja y es muy común que el causante de la infección sea *L. mexicana*. (Goldsmith y Heyneman, 1995)



Figura 5. Lesión característica de la leishmaniosis cutánea (Uribarren, 2015).

1.5.2 Leishmaniosis cutánea difusa

Esta rara manifestación clínica se parece a la lepra, observándose solamente en pacientes que no desarrollan respuesta inmunológica mediada por células, por lo que la lesión no se auto-limita a una úlcera. Las primeras en aparecer son papulares y se diseminan en placas. Los parásitos migran a través de la dermis y se pueden encontrar en la piel que tiene apariencia normal o despigmentación ligera, como se aprecia en la figura 6. El proceso evoluciona con lentitud durante varios años y puede llegar a cubrir el cuerpo respetando el cuero cabelludo, plantas de los pies y palmas de las manos. Las lesiones son variables serosas y con remisiones esporádicas (Goldsmith y Heyneman, 1995).

En la leishmaniosis cutánea difusa, las imágenes histológicas se muestran con muchos histiocitos vacuolados, también llamados células espuma, empacadas con amastigotes (Romero, 2007).

Aparecen un gran número de parásitos presentes en la piel intacta así como en las placas y nódulos (Goldsmith y Heyneman, 1995).



Figura 6. Lesiones características de la leishmaniosis cutánea diseminada (Uribarren, 2015).

1.5.3 Leishmaniosis mucocutánea

Se llama así porque después de la lesión cutánea primaria, se afectan las mucosas. Se tiene a *L. braziliensis* como al agente etiológico clásico de esta forma clínica (Romero, 2007).

La leishmaniosis mucocutánea, también llamada *espundia*, es causada por la diseminación hematógica o linfática del parásito, puede aparecer tan solo en unos cuantos meses

mientras que la lesión primaria aún se encuentra activa, o bien, se retrasan hasta 20 años después de que la lesión primaria ha desaparecido (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Los primeros signos clínicos con los que se sospecha de diseminación son: epistaxis, perforación del septo nasal anterior y ronquera. Se han reportado casos raros en donde los ojos también están comprometidos, ya que la lesión radica en la córnea y conjuntiva parpebral (Romero, 2007).

La leishmaniosis mucocutánea se presenta en dos formas distintas:

a) Tipo ulcerativo:

Se caracteriza por mutilación extensa y rápida, por destrucción de tejidos blandos por formación de escaras, es resultado de hipersensibilidad aguda así como de destrucción directa del cartílago por la presencia de amastigotes.

b) Tipo no ulcerativo:

Caracterizado por el edema local y la hipertrofia en especial del labio superior, dan la apariencia "*facies leishmaniatica*" o la nariz alargada llamada "*trompa de tapir*". Ambos tipos provocan lesión del paladar blando y duro. El proceso nasal empieza teniendo áreas circunscritas de hiperemia del tamaño de la cabeza de un alfiler en el septo anterior, que puede o no ulcerarse, o en algunos casos formar pólipos, como se muestra en la figura 7. Las lesiones del septo anterior son tan comunes que pueden tomarse como patognomónicas de la enfermedad. La hiperemia, el edema de la laringe y la destrucción posterior del tejido originan disfonía. Por lo regular la úvula está comprometida: primero aumenta su tamaño y posteriormente se necrosa. (Goldsmith y Heyneman, 1995)



Figura 7. Estructura nasal dañada por *L. braziliensis* conocida como trompa de tapir (Uribarren, 2015).

1.5.4 Leishmaniosis visceral (*kala azar*)

Esta forma clínica tiene un periodo de incubación que va por lo general de 4 a 6 meses, teniendo reportes de un rango que va de 10 días hasta 24 meses (Romero, 2007).

Se manifiesta como un pequeño nódulo cutáneo no ulceroso. A partir de esto se pueden observar signos como escalofríos, fiebre y vómito (Romero, 2007).

Inicialmente la fiebre es elevada y se da por lo general dos veces al día, sin embargo, en poco tiempo esta fiebre se vuelve intermitente y puede desaparecer por días (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Posterior al aparente estado de mejoría, aparece la hepatomegalia, la esplenomegalia y la linfadenopatía generalizada.

La patología de la enfermedad se debe a la multiplicación de amastigotes en los macrófagos, en especial en el bazo, hígado, médula ósea, nódulos linfáticos y mucosa del intestino delgado. Todos los signos y síntomas de la patología son resultado del proceso de inmunosupresión extrema inducida (Goldsmith y Heyneman, 1995).

La hematopoyesis se deprime, la vida de granulocitos y eritrocitos se reduce, y se ocasiona un estado de pancitopenia, anemia, y existe la posibilidad de que se origine hemorragia mucosa grave (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Como se puede apreciar en la figura 8, el bazo presenta atrofia importante en las zonas paracorticales (pulpa blanca) con necrosis y fibrosis, aunque persisten numerosas células plasmáticas. En el hígado hay atrofia por presión de las células con inflamación húmeda y degeneración grasa; algunas de las funciones hepáticas permanecen normales pero la producción de protrombina cae y la hipoalbuminemia induce edema y ascitis (Goldsmith y Heyneman, 1995).

En casos de pacientes con deficiencias nutrimentales, que se encuentren bajo estrés o pacientes muy jóvenes, la enfermedad puede tornarse mortal (Romero, 2007).



Figura 8. Infante que presenta hepato-esplenomegalia (Uribarren, 2015).

1.5.5 Leishmaniosis dérmica post *kala azar*

Es un trastorno cutáneo poco frecuente que se observa de uno a varios años después de que se ha dado un tratamiento contra la leishmaniosis visceral. Se desarrollan nódulos múltiples, líquido infiltrado con linfocitos y macrófagos infectados. La enfermedad es crónica y muy resistente a la quimioterapia. Presenta riesgo de infectar flebótomos y reestablecer infecciones en áreas ya libres de la enfermedad. Pueden aparecer máculas en cualquier parte del cuerpo y en forma tardía en la cara, en ocasiones con inflamación masiva tipo lepromatosa (Goldsmith y Heyneman, 1995), ver figura 9.



Figura 9. Lesiones clásicas en leishmaniosis post *kala azar* (Uribarren, 2015).

1.6 Respuesta inmunológica

La leishmaniosis es una enfermedad en la que se pueden observar diversos tipos de cuadros clínicos dependiendo de tres factores principalmente:

- a) La especie del parásito presente
- b) El medio ambiente
- c) La respuesta inmunitaria del hospedero

En la respuesta inmunitaria están involucrados los procesos humorales y celulares que se llevan a cabo dentro del hospedero y van dirigidos contra del parásito, observándose una serie de alteraciones que tratan de devolver la homeostasis al individuo (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

El primer contacto que tiene el hospedero con *Leishmania spp.* es cuando el promastigote metacíclico es inoculado por el vector, utilizando su probóscide para acceder a la sangre periférica de un vaso sanguíneo (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Cuando el díptero termina de alimentarse, los componentes de la saliva (anticoagulantes y vasodilatadores) dejan de hacer efecto y se induce la primera respuesta inflamatoria, ocasionando la migración de células PMN, macrófagos y linfocitos hacia el sitio de la picadura (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Los promastigotes metacíclicos inoculados poseen moléculas de superficie que actúan como factores de virulencia. Las principales son el LPG que compone al denso glucocálix que presenta el estadio flagelado del parásito, la metaloproteasa gp63 y cuya función es inhibir la lisis mediada por el complemento. Ambas son las moléculas de superficie que más abundan en los promastigotes y son altamente inmunogénicas (McFarlane et al., 2008).

En la membrana de los promastigotes también se encuentran otras moléculas de superficie como los glucosil-inositol-fosfolípidos, glicoconjugados de secreción, proteo-fosfo-glicanos y fosfatasa ácida (McFarlane et al., 2008).

Los macrófagos reconocen las moléculas de superficie de los promastigotes (LPG y gp63) gracias al receptor TLR-9 (toll like receptors). Estas células se activan y comienzan a producir abundantes citocinas mediadoras de inflamación: IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , TGF- β , y reclutan más células gracias al MCAF (factor quimiotáctico activador de los monocitos) (McFarlane et al., 2008).

Las moléculas de superficie LPG y gp63 provocan la fagocitosis del parásito y facilitan su internalización a la célula (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Los neutrófilos sugieren dos papeles extremistas. Un papel benéfico, que durante la etapa temprana de la infección (McFarlane et al., 2008) la relacionan con la disminución del tamaño de lesión, haciéndolas menos graves y controlando la infección obteniendo una menor carga parasitaria (Hernandez-Ruiz y Becker, 2006).

Por otro lado, un papel perjudicial en donde el neutrófilo es el intermediario que aporta daño tisular y facilita la aparición de lesiones de mayor tamaño. Su participación genera la disminución de los títulos de IFN- γ (relacionada con la resistencia a la infección) y se genera el aumento de IL-4 (relacionada con la susceptibilidad a la infección) (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Se ha descrito que la molécula de superficie LPG también es ligando de receptores TLR-2 en las células NK e inducen la producción de IFN- γ por estas células (Hernandez-Ruiz y Becker, 2006).

En estudios *in vitro*, las células dendríticas que han sido estimuladas con DNA genómico de *L. infantum* secretan altos niveles de IFN- α/β y es dependiente de TLR-9 (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Por otra parte, en la respuesta inmunitaria adaptativa, los antígenos del parásito, al ser expresados en la membrana del macrófago infectado, y según sea el tipo de CPA, los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, los Linfocitos T CD4+ y CD8+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes:

a) Citocinas de tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α :

Participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además induce una respuesta humoral con los isotipos opsonizantes IgG1 e IgG3 en seres humanos (Hernandez-Ruiz y Becker, 2006)

b) Citocinas de tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13:

Regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata y eliminación de parásitos (Hernandez-Ruiz y Becker, 2006).

1.7 Epidemiología

La leishmaniosis es una enfermedad de distribución mundial cuyo nicho ecológico son zonas tropicales en los continentes: América, Europa, Asia y parte de África (OMS, 2013).

Debido a la disminución de investigación para la creación de tratamientos efectivos, la constante incidencia y prevalencia a nivel mundial, y sobre todo, la falta de técnicas para su diagnóstico oportuno, la Organización Mundial de la Salud la contempla dentro del grupo de Enfermedades tropicales desatendidas NTD (OMS, 2013).

Se estima que a nivel mundial tiene una incidencia anual de 1.3 millones de casos y es prevalente en 98 países, entre ellos México (OMS, 2013).

La situación epidemiológica en América Latina (ver tabla 1) marca que se han registrado casos de leishmaniosis cutánea y mucocutánea en 18 países, de los cuales 16 reportaron a la Organización Panamericana de la Salud, cuyos datos corresponden al periodo de 2001 al 2011, teniendo un estudio completo a 11 años, sin embargo, México y Venezuela sólo reportaron datos del 2011 (OPS, 2013).

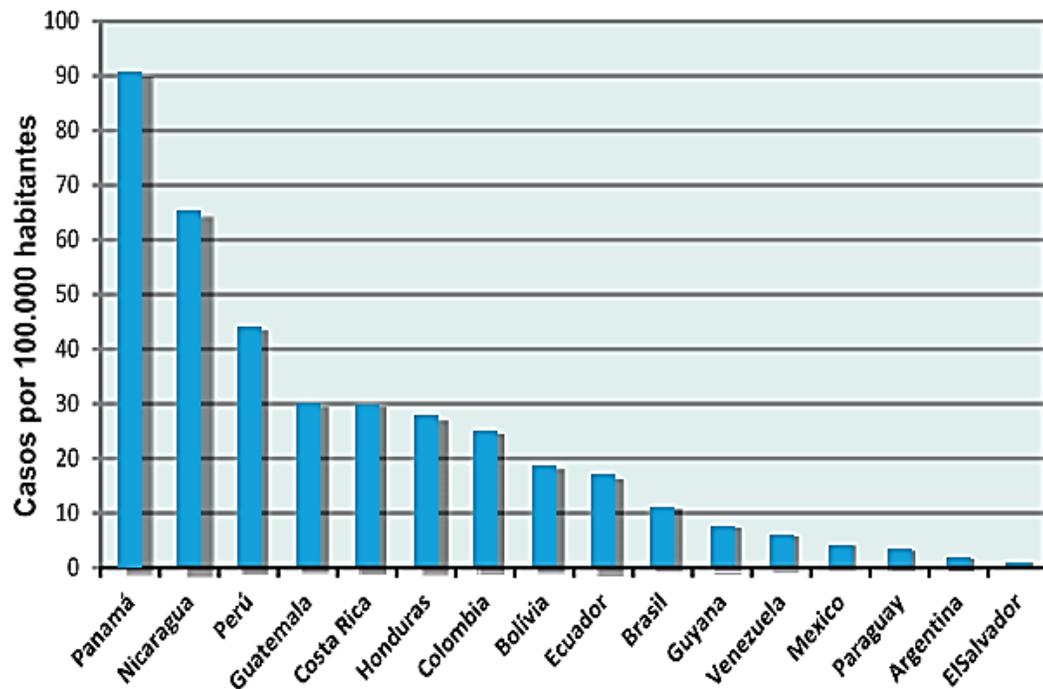
Tabla 1. Registro epidemiológico de casos de leishmaniosis del 2001 al 2011 de países de América Latina.

Sub-región/país	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Américas	47.286	56.243	61.518	59.439	67.949	62.017	59.027	52.324	57.265	58.347	57.287
México	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	468
Área Andina	13.165	17.841	19.864	22.860	30.697	29.177	27.852	20.562	24.886	25.868	25.040
Bolivia	2.043	2.518	2.452	2.819	2.657	3.152	3.153	1.838	1.218	1.809	1.636
Colombia	4.130	7.038	9.267	10.698	18.043	16.241	13.331	9.595	15.420	14.818	9.684
Ecuador	1.754	1.253	1.336	2.494	1.925	1.536	1.185	1.479	1.735	1.629	965
Perú	5.238	7.032	6.809	6.849	8.072	8.248	10.183	7.650	6.513	7.612	11.204
Venezuela	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.551
Centroamérica	7.186	8.135	9.336	6.744	9.687	9.717	8.903	11.037	9.959	9.637	10.134
Costa Rica	425	690	948	1.061	1.676	1.870	1.807	818	2.025	1.143	1.376
El Salvador	18	46	24	76	24	46	36	31	-	4	17
Guatemala	-	1.549	1.143	870	1.243	602	287	494	519	410	549
Honduras	957	1.260	1.684	797	1.574	1.300	855	1.759	1.502	1.362	1.736
Nicaragua	2.924	2.200	3.716	2.103	3.521	2.125	3.719	5.826	4.047	3.497	3.235
Panamá	2.862	2.390	1.821	1.837	1.649	3.774	2.199	2.109	1.866	3.221	3.221
Brasil	26.328	28.268	30.812	28.737	26.685	22.397	21.530	20.123	21.989	22.397	21.306
Cono Sur	607	1.999	1.496	1.089	873	720	736	588	422	430	324
Argentina	157	748	348	358	282	257	201	208	163	166	140
Paraguay	450	1.251	1.148	731	591	463	535	380	259	264	184
Caribe No-Latino	-	-	10	9	7	6	6	14	9	15	15
Guyana	-	-	10	9	7	6	6	14	9	15	15

(OPS, 2013)

Como se aprecia en la tabla 2, México ocupa el 13° lugar en la tasa de incidencia por cada 100,000 habitantes. Asimismo, México es uno de los países que presenta un mayor porcentaje de casos para los que se tiene evolución favorable de leishmaniosis cutánea y mucocutánea (92.3%) (OPS, 2013), véase figura 10.

Tabla 2. Tasa de incidencia por cada 100,000 habitantes de países con casos de leishmaniosis en América Latina.



(OPS, 2013)

Por otra parte, se registraron en el mismo periodo un total de 38,808 casos de leishmaniosis visceral, de los cuales, México y Venezuela sólo reportaron cifras del 2011 (OPS, 2013), véase figura 11.

Aunque el 96.6% de estos casos (37,503) fueron reportados por Brasil, se observó un incremento en algunos países de América Latina (OPS, 2013).

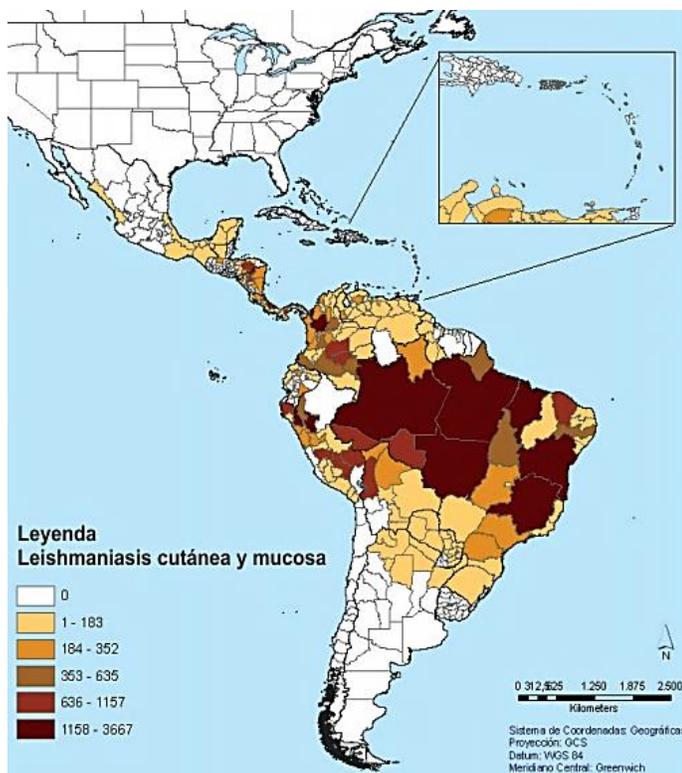


Figura 10. Incidencia de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en América Latina (OPS, 2013).

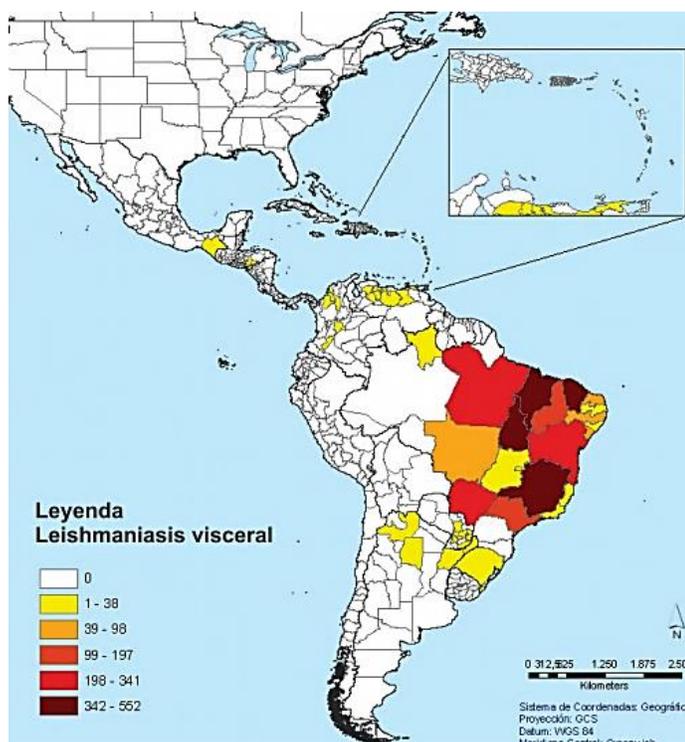


Figura 11. Incidencia de leishmaniasis visceral en América Latina (OPS, 2013).

Por otra parte, la situación epidemiológica de la leishmaniosis en México hasta la semana epidemiológica 53 del 2014, indica que hubo un total de 6 casos de leishmaniosis visceral, distribuidos de la siguiente manera: 4 casos en Chiapas, 1 en Guerrero y 1 más en Jalisco (Secretaría de Salud, 2015).

Los datos referidos a leishmaniosis cutánea y mucocutánea en México indican un total de 433 casos, los cuales se distribuyen de la siguiente manera en el territorio nacional: 51 casos en Campeche, 35 casos en Chiapas, 1 caso en Guerrero, 2 casos en Jalisco, 1 caso en el Estado de México, 1 caso en Michoacán, 73 casos en Nayarit, 96 casos en Quintana Roo, 153 casos en Tabasco, 1 caso en Tamaulipas, 18 casos en Veracruz y 1 caso en Yucatán (Secretaría de Salud, 2015).

En los datos reportados en el boletín epidemiológico hasta la semana 24 del año 2015, se reportan 217 casos nuevos de leishmaniosis cutánea y solo 1 caso de leishmaniosis visceral en Chiapas (Secretaría de Salud, 2015).

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico inicia desde la elaboración de la historia clínica del paciente. La labor del clínico es generar un diagnóstico presuntivo asertivo mediante la observación a detalle del paciente, y hacer uso de los datos epidemiológicos de manera correcta.

La sospecha de esta enfermedad surge cuando se interroga al paciente de los síntomas que ha manifestado desde la posible exposición al vector, el riesgo inherente de contacto con el vector debido a la zona en la que habita, o bien, por visitar la zona endémica en la que se encuentra el parásito y el vector.

La exploración física brinda al clínico datos importantes como el agrandamiento del hígado y/o bazo, la visualización de una lesión crateriforme, con inflamación en los bordes y el estado general del paciente (Tay, 2010).

Es importante que el clínico mande a hacer estudios de laboratorio para poder orientar el diagnóstico adecuadamente y diferenciar este cuadro clínico de otros similares como: tripanosomiosis, esporotricosis, cromoblastomycosis, paracoccidiodomycosis, bartonelosis, lepra o incluso carcinoma de células basales. Para ello en los exámenes de laboratorio, se realiza la búsqueda intencionada del agente causal mediante la observación directa de

material obtenido de zonas en donde el parásito puede encontrarse, buscando células del sistema fagocítico mononuclear que contengan en su interior la forma de amastigote del parásito, o la forma de promastigote en el medio extracelular; sin embargo en ocasiones no se puede observar por técnicas directas al parásito, y por ello, se busca utilizar otros componentes biológicos que sean de importancia diagnóstica, apoyándose en el diagnóstico indirecto (Goldsmith y Heyneman, 1995).

1.8.1 Impronta

El principal recurso con el que se cuenta para la observación microscópica es la impronta. Esta se realiza mediante la recolección del exudado seroso de las úlceras, utilizando un vidrio portaobjetos, este material se fija con alcohol absoluto y se tiñe con colorante Giemsa para su observación directa (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Los parásitos se observan dentro del citoplasma de los macrófagos tisulares, y existe la posibilidad de que se encuentren en la matriz extracelular formando nidos de amastigotes libres (Romero, 2007).

Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de impronta como técnica de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
<input type="checkbox"/> Es un método muy sencillo de elaborar ya que no presenta dificultad técnica.	<input type="checkbox"/> La preparación cuenta con demasiados artefactos que dificultan la observación.
<input type="checkbox"/> Se basa en la observación directa del parásito de forma circular con un borde bien definido que contrasta con un fondo lila.	<input type="checkbox"/> El operador tiene que estar previamente capacitado para distinguir al parásito de artefactos que pertenecen a la celularidad normal del paciente.

1.8.2 Biopsia de médula ósea

Este método es el método de referencia para la detección de la enfermedad. También llamado “Gold Standard”, el extendido o frotis de médula ósea se realiza como prueba confirmatoria sobre un vidrio portaobjetos. El procedimiento es muy similar a la impronta, pero con la particularidad de que el extendido de médula ósea busca intencionadamente la presencia del parásito en un área totalmente estéril, siendo este sitio el productor de células troncales hematopoyéticas que incluyen a células progenitoras que se diferenciarán en células pertenecientes al linaje leucocitario y células que pertenecen al linaje eritrocitario, entre otras (Goldsmith y Heyneman, 1995).

La médula ósea es un sitio que se encuentra conectado por vasos capilares por donde corre la linfa o la sangre oxigenada, por lo que es el sitio al que regresan macrófagos infectados a través de la linfa, y por donde salen nuevos monocitos al torrente sanguíneo (Rodak, 2004).

Cuando el parásito se ha detectado en este sitio se habla de una leishmaniosis totalmente diseminada y de estado crónico, en donde será difícil que un tratamiento erradique a toda la población de amastigotes (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Tabla 4. Ventajas y desventajas del uso de biopsia de médula ósea como técnica de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
	
<input type="checkbox"/> Es un método con mucha confiabilidad: al ser un sitio inócuo y estéril de patógenos en condiciones normales, encontrar a un parásito en este sitio, es indicativo de leishmaniosis.	<input type="checkbox"/> La clara dificultad técnica que genera el perforar hueso y extraer células troncales, matriz extracelular y otros componentes vitales.
<input type="checkbox"/> Es el método de referencia usado actualmente para la detección de leishmaniosis visceral.	<input type="checkbox"/> La técnica diagnóstica conlleva gran peligro por la invasividad que causa al paciente.

1.8.3 Biopsias de hígado, bazo o ganglios linfáticos

La biopsia consiste en tomar una muestra directamente del tejido infectado para su análisis histopatológico. Los sitios de preferencia para realizar la toma de biopsias en esta enfermedad, además de la médula ósea son: hígado, bazo y ganglios linfáticos (Romero, 2007).

Estos sitios anatómicos son los órganos blanco que el parásito prefiere debido a que en ellos se encuentran ciertas particularidades que no se presentan en otros sitios: el hígado, al ser un sitio de alta vascularización, los parásitos llegan a él por torrente sanguíneo y generan obstrucción en los vasos que irrigan de sangre a todos los hepatocitos, generando nidos de amastigotes en este órgano. Por otro lado, en el bazo, es el lugar en donde se extiende la infección debido a que los parásitos, al llegar dentro de macrófagos infectados, los lisan e infectan nuevas células del sistema fagocítico mononuclear, abundantes en éste órgano (Goldsmith y Heyneman, 1995).

En los ganglios linfáticos se encuentran linfocitos T y B que buscan ser activados por la migración de células presentadoras de antígeno, y la presencia del parásito totalmente viable dentro de CPA representa un alto peligro de infección a las demás células que se encuentran en este sitio (Hernandez-Ruiz y Becker, 2006).

Tabla 5. Ventajas y desventajas del uso de biopsia de hígado, bazo o ganglios linfáticos como técnica de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
<input type="checkbox"/> Son métodos de gran confiabilidad diagnóstica.	<input type="checkbox"/> Existe dificultad técnica para realizar la biopsia.
<input type="checkbox"/> La biopsia se hace en sitios de concentración de células blanco, que son de predilección del parásito.	<input type="checkbox"/> Método totalmente invasivo para el paciente, en donde se genera sangrado interno.
	<input type="checkbox"/> Es un procedimiento muy peligroso.

1.8.4 Frotis sanguíneo

Este método es de los menos invasivos. Al igual que en la impronta, la muestra, generalmente sangre capilar o venosa, se extiende en un vidrio portaobjetos y se tiñe con colorante de Giemsa. Se realiza una búsqueda intencionada del parásito que se puede encontrar dentro de macrófagos o monocitos, o bien, fuera de ellos indicando una lisis celular resiente (Goldsmith y Heyneman, 1995).

El método no es el adecuado para la búsqueda de este parásito debido a que el periodo de visualización en sangre es muy corto (de días o hasta semanas) por la clara tendencia de internalización tisular que prefiere la *Leishmania spp.* y se presenta únicamente cuando la enfermedad aún es asintomática para el paciente (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Tabla 6. Ventajas y desventajas del uso del frotis sanguíneo como técnica de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
<input type="checkbox"/> Un método sencillo de realizar.	<input type="checkbox"/> No es un método adecuado para la detección del parásito por el corto periodo en el que se encuentra en circulación.
<input type="checkbox"/> Permite la visualización de células infectadas en torrente sanguíneo mediante una tinción tricrómica.	<input type="checkbox"/> Necesita personal capacitado para la visualización del parásito.

1.8.5 Xenodiagnóstico

Este método diagnóstico consiste en la obtención de material proveniente de la lesión y la posterior inoculación en animales susceptibles con la finalidad de recuperar e identificar al parásito en el estadio de amastigote, además de observar la formación de la lesión en el animal (Romero, 2007).

Además del uso de animales, se pueden utilizar medios de cultivo especiales que buscan proliferar al parásito tras colocar tejidos o sangre del paciente. Algunos ejemplos de medios para el desarrollo de *Leishmania spp.* son: el medio de NNN (medio semisólido de Locke-sangre-agar) o RPMI-1640, y son suplementados con suero fetal bovino cultivado entre 22 y 28°C. Cuando se recupera el promastigote en el medio de cultivo, es evidencia indirecta de infección (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Tabla 7. Ventajas y desventajas del uso del xenodiagnóstico como técnica de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Métodos que no generan mayor invasividad que la recolección de material de lesión.	<input type="checkbox"/> Necesita de tiempo para que se establezca la infección y para desarrollar la etapa patente de ésta.
<input type="checkbox"/> Permite observar si existe la reproducción de signos y síntomas en animales.	<input type="checkbox"/> El personal debe estar capacitado para inocular el material contaminado en animales de laboratorio.
	<input type="checkbox"/> Riesgo para el clínico.

1.8.6 Pruebas inmunológicas y serológicas

La intradermorreacción de Montenegro, también llamada prueba de Leishmanina, es una prueba de hipersensibilidad celular tardía (tipo IV) hacia antígenos de *Leishmania spp.* Es correlacionada con la transformación linfoblástica, sin embargo, no es indicativa de protección (Romero, 2007).

Para esta prueba diagnóstica, se utilizan promastigotes cultivados *in vitro*. Estos parásitos se dejan morir y se preservan en fenol salina al 0.5% o tiomersal a relación 1:10,000 (Goldsmith y Heyneman, 1995).

El procedimiento es sencillo: se administra intradérmicamente, en la superficie interna del brazo, un inóculo de 10^5 parásitos en 0.1 mL (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Una reacción positiva es aquella que genera una induración rodeada de eritema, que alcanza su máximo tamaño en 48 horas y después mejora. Por otra parte, la prueba es negativa cuando no existe una induración (Romero, 2007).

Tabla 8. Ventajas y desventajas del uso de pruebas inmunológicas como técnicas de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
<input type="checkbox"/> Se utiliza la mezcla de todos los antígenos del promastigote, por lo que hay mayor posibilidad del reconocimiento antigénico.	<input type="checkbox"/> Inoculación de parásitos.
<input type="checkbox"/> Resultados a los dos días.	<input type="checkbox"/> El significado diagnóstico sólo dice si el paciente ha estado en contacto con el parásito, no si se encuentra infectado.
	<input type="checkbox"/> Molestias tras la formación de la induración.

Por otra parte, existen pruebas que determinan la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito: las pruebas serológicas son útiles cuando el diagnóstico parasitológico es difícil. De éstas, las pruebas de inmunofluorescencia indirecta son las más confiables, las cuales utilizan amastigotes como antígeno. El ELISA es una técnica que a pesar de que no existe una estandarización adecuada a nivel comercial, es de las pruebas que detecta títulos de anticuerpos y ayuda al diagnóstico a obtener información de la exposición que ha sufrido el paciente y en qué fase de la patología se encuentra (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Tabla 9. Ventajas y desventajas del uso de pruebas serológicas como técnicas de diagnóstico.

Ventajas	Desventajas
<input type="checkbox"/> Se realiza fácilmente con suero del paciente.	<input type="checkbox"/> Es difícil establecer un valor de corte en determinadas poblaciones debido a la variación biológica.
<input type="checkbox"/> Informa la etapa en la que se encuentra la leishmaniosis: aguda o crónica.	<input type="checkbox"/> Dependiendo de la respuesta inmunitaria del paciente, puede haber más títulos de anticuerpos inespecíficos.
<input type="checkbox"/> Detección de IgG e IgM mediante ELISA o IFI.	

Por otra parte, métodos de inmunohistopatología y pruebas de última generación como *Western blot* y PCR a nivel de tejido infectado recuperado por biopsia, son pruebas que comienzan a salir al mercado como apoyo al diagnóstico (Romero, 2007).

1.9 Tratamiento

El tratamiento se realiza principalmente con antimoniales pentavalentes conocidos en el mercado como *Glucantime*, cuyo principio activo es el antimonio N-metilgucamina, y el *Pentostam*, cuyo principio activo es el estibogluconato de sodio (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Estos fármacos son de aplicación intramuscular y en ocasiones de aplicación intralesional, administrándose en los bordes y la base de la lesión, asegurándose que haya una infiltración completa al observar una coloración blanquecina que aparece en la base de la lesión (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Tabla 10. Diferencias en el tratamiento con fármacos dependiendo de la vía de administración al paciente.

Administración parenteral	Administración intralesional
<input type="checkbox"/> Estibogluconato de sodio.	<input type="checkbox"/> Se usa 250-300 mg de Sb ⁵
<input type="checkbox"/> N-metil-gluamina.	<input type="checkbox"/> Se adiciona con:
<input type="checkbox"/> Dosis: 20 mg Sb ⁵ /kg de peso (maximo 800 mg/día).	<input type="checkbox"/> Estibogluconato de sodio (1-3 mL).
	<input type="checkbox"/> N-metil-gluamina (1-3 mL).
	<input type="checkbox"/> Hidrocloro de emetina (0.1-0.2 mL de una solución 65 mg/mL).

(Goldsmith y Heyneman, 1995)

Por otra parte, existen medidas físicas que ayudan a la mejoría del paciente:

a) Crioterapia.

Se aplica dióxido de carbono sólido o nitrógeno líquido directamente en la lesión. La forma de astilla de los cristales de dióxido de carbono se presiona con firmeza sobre las pápulas, nódulos y los bordes de las úlceras para provocar una quemadura en frío. El nitrógeno líquido se usa con un aplicador de algodón o con una varilla de metal que se sumerge en él y después se presiona contra las heridas (Eiras, 2015).

b) Tratamiento con calor.

El agua caliente, de 39°C - 42°C, se aplica directo sobre la lesión por tiempos de 20 a 30 minutos por día, siguiendo un tratamiento de 10 a 12 días. Asimismo se puede usar luz ultravioleta o infrarroja por 20 minutos al día (Valencia, 2013).

c) Otras medidas contra la leishmaniosis.

Técnicas en desarrollo y perfeccionamiento como la electro coagulación, radioterapia con rayos *Grenz*, han tenido buenos resultados en pacientes que cursan con etapas iniciales de la enfermedad y cuando presentan lesiones pequeñas. La debridación quirúrgica de las lesiones ayuda cuando la lesión no mejora con los métodos antes mencionados, esta técnica elimina el tejido dañado y busca reconstruirlo a partir de la aplicación de un injerto de piel (Eiras, 2015).

De forma alternativa a los medicamentos basados en antimonio pentavalente, se utilizan Anfotericina B (administración intravenosa 5 mg - 1 g/kg/día) y sales de Pentamidina (3 - 4 mg/kg/12hrs), que también tienen acción sistémica (Chávez et al, 2015).

1.10 Organización genómica de *Leishmania spp.*

Los protozoarios del orden *Kinetoplastida* poseen un DNA genómico localizado en tres compartimentos: en el núcleo (DNA cromosómico), en la mitocondria y en el cinetoplasto, formando una red de maxi círculos y mini círculos (DNAk) (Simpson, Simpson, Kidane, Livingston, y Spithill, 1980) que se replica independientemente y es inusual en la naturaleza, y en el citoplasma como DNA extra cromosómico. El DNAk posee mayor concentración de bases A+T (72-73%) a diferencia del DNA cromosómico, que por el contrario, posee mayor concentración en bases G+C (>60%) (Simpson, 1979).

El cinetoplasto se encuentra dentro de la membrana mitocondrial y está presente en todos los protozoarios del orden *Kinetoplastida*. Es un disco visible al microscopio óptico con un diámetro de 1-2 μm . Contiene aproximadamente 107 pares de bases y está situado en la base del flagelo, dentro de la membrana mitocondrial y aparece en todos los cinetoplástidos. El cinetoplasto representa hasta el 20% de todo el DNA del parásito y está formado por una red de moléculas circulares (maxi círculos y mini círculos) concatenados covalentemente (Simpson, 1979).

El DNAk de *Leishmania spp.* está compuesto por:

a) Maxi círculos.

Aproximadamente 50 unidades (30,000 - 40,000 pares de bases), que contienen los genes que codifican el RNA ribosomal y algunas proteínas mitocondriales (Arts y Benne, 1996).

b) Mini círculos.

De 10,000 a 20,000 unidades, de tamaño variable (entre 400 y 2500 pares de bases) dependiendo de la especie. En cada mini círculo existe una región muy conservada de 120 pares de bases y una región variable de 700 pares de bases. Poseen los RNA guías y forman parte de la estructura y la división del cinetoplasto (Arts y Benne, 1996).

Las secuencias de los mini círculos pueden variar por mutación o recombinación con otras cadenas de mini círculos ya existentes, lo que se traduce en una variabilidad relativamente alta de la región variable (Simpson, Simpson, Kidane, Livingston, y Spithill, 1980).

En el caso exclusivo de *Leishmania spp.* se ha comprobado la homogeneidad y estabilidad de la secuencia conservada de los mini círculos con las especies de este parásito, siendo estas regiones exclusivas del género (Arts y Benne, 1996).

1.11 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica inventada por K. Mullis y sus colaboradores en 1985. Esta técnica se lleva a cabo *in vitro* y permite amplificar enzimáticamente una región determinada del DNA a partir de dos regiones cortas cuya secuencia es conocida (Somma y Querci, 2013).

Gracias a la cantidad exponencial de copias sintéticas de un determinado gen o fragmento de DNA, fue posible revolucionar el campo de la medicina y biología molecular. Asimismo generó el campo del diagnóstico a nivel molecular de los patógenos, aumentando la sensibilidad y rapidez de cualquier técnica existente hasta entonces (Somma y Querci, 2013).

1.11.1 Principios de la PCR

La PCR se basa en el mecanismo *in vivo* de replicación del DNA, y que mediante una serie de procesos, busca la replicación seriada y exponencial de un fragmento determinado (Tamay, 2013) véase la figura13. Para cumplir este objetivo, la PCR se compone de ciclos repetitivos de:

a) Desnaturalización de la doble cadena de DNA:

La temperatura se eleva para que la doble cadena del DNA se separe por fusión en dos moléculas de DNA mono catenario (Tamay, 2013).

b) Alineamiento de los dos oligonucleótidos (*primers*):

La temperatura se reduce para permitir la alineación de los *primers* a las cadenas de DNA, éstos le indicarán a la enzima Polimerasa, a partir de dónde iniciar la replicación (Somma y Querci, 2013).

c) Extensión:

En presencia de Mg^{2+} , la polimerasa comienza a complementar a la cadena molde usando nucleótidos para generar la copia del fragmento inicial de DNA (Tamay, 2013), véase la figura 12.

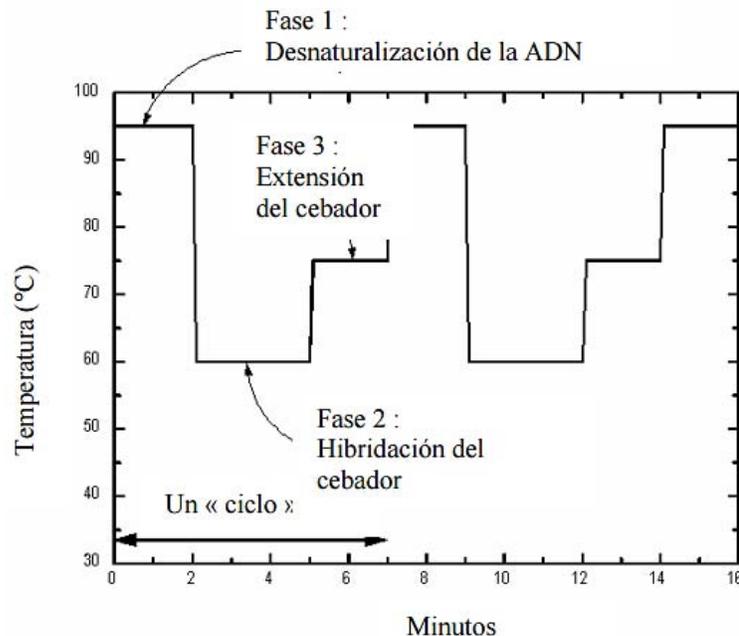


Figura 12. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa expresada gráficamente (Somma y Querci, 2013).

Después de cada ciclo, las moléculas de DNA recién sintetizadas pueden servir de molde para el ciclo siguiente (Tamay, 2013).

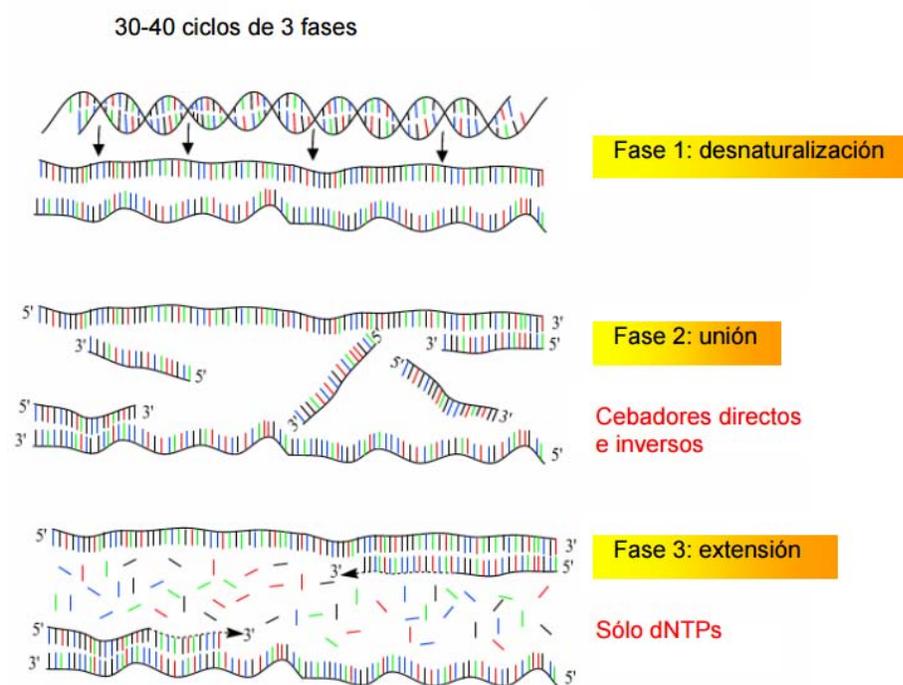


Figura 13. Vista de las fases de la PCR a nivel molecular (Somma y Querci, 2013).

La visualización del fragmento de DNA determinado, también llamado amplicón, en el sistema se puede evidenciar de dos maneras principalmente:

- Se puede visualizar la presencia o ausencia del fragmento al final del proceso de amplificación, colocando una pequeña muestra del amplicón en una matriz que permita la separación del fragmento a partir de un principio de migración de la molécula por peso o tamaño (PCR punto final) (Somma y Querci, 2013).
- Se puede seguir en tiempo real el crecimiento exponencial de la concentración del fragmento determinado mientras se llevan a cabo los procesos del ciclado. La concentración se visualiza mediante la medición de fluorescencia que genera indirectamente la doble cadena de DNA formada, tras utilizar fluorocromos en la mezcla de reacción (PCR tiempo real) (Tamay, 2013).

1.11.2 PCR punto final

Cuando la reacción se llevó a cabo, la forma para evidenciar los fragmentos, es mediante una electroforesis en geles de agarosa (Somma y Querci, 2013).

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un solución amortiguadora o solución tampón que puede ser TAE o TBA (Somma y Querci, 2013).

En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona una carga negativa, por lo que al someterse a un campo eléctrico, estas partículas tienden a migrar al ánodo (polo positivo) (Somma y Querci, 2013).

La matriz utilizada es un gel de agarosa, el cual se prepara diluyendo una cantidad de agarosa en el solución amortiguadora, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía en un recipiente molde para que se solidifique (Somma y Querci, 2013).

El tamaño del poro depende de la concentración que tenga la agarosa en el gel, usualmente se usan concentraciones del 1 al 3% (Somma y Querci, 2013).

Otro ingrediente que pertenece a esta técnica es una molécula que sirva como revelador. Este compuesto tiene que evidenciar a la molécula de DNA y existen distintos tipos en el mercado. Dos compuestos muy utilizados son el bromuro de etidio y el *GelRed*TM (Crisafuli, 2014).

El bromuro de etidio es un compuesto capaz de unirse al DNA de doble cadena de manera covalente. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Debido a su característica especial de unirse covalentemente al DNA, este compuesto es mutagénico y teratogénico (Biotium, 2013).

El *GelRed*TM es un compuesto que también permite la visualización de los amplicones en forma de bandas en el gel (Biotium, 2013). Al igual que el bromuro de etidio, el *GelRed*TM emite una señal cuando es excitado con luz UV (Crisafuli, 2014).

Este compuesto, a diferencia del bromuro de etidio, no fundamenta su interacción con la molécula de DNA en la unión covalente con las bases nitrogenadas, por el contrario,

fundamenta su unión en la fuerte atracción iónica por el esqueleto de fosfatos (Crisafuli, 2014), lo que le brinda mayor seguridad de manipulación debido a que no es mutagénico ni teratogénico (Biotium, 2013).

Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador de peso molecular que contenga un número determinado de segmentos de DNA conocidos (pares base), lo que facilita la identificación del peso de los amplicones (Somma y Querci, 2013).

Finalmente la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV; adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas (Somma y Querci, 2013).

1.11.3 PCR tiempo real

Las bases para el desarrollo de la PCR en tiempo real fueron sentadas por Higuchi y colaboradores en 1992, cuando video grabaron en tiempo real la incorporación del bromuro de etidio al DNA durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV (Somma y Querci, 2013).

Esta técnica es usada para detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción (Tamay, 2013).

La PCR tiempo real ofrece ventajas sobre la PCR punto final, ofrece la posibilidad de cuantificar la cantidad de DNA sintético generado, así como tener la capacidad de monitorear al producto de amplificación conforme transcurren los ciclos sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa (Tamay, 2013).

Actualmente la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. El sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Somma y Querci, 2013).

Los ingredientes químicos para realizar PCR tiempo real, son los mismos que los utilizados en la PCR punto final (Tamay, 2013).

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción se realiza mediante reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos:

a) Métodos específicos (figura 14). Siguen el principio conocido como transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o “*quencher*”. Para ello existen dos métodos específicos:

a. Sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un “*quencher*”, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando la sonda hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y en el *quencher*, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Las sondas más usadas son las conocidas como *TaqMan* (Tamay, 2013).

b. Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su secuencia blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida a su aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia. Las sondas más usadas son las conocidas comercialmente como *Molecular Beacons* (Tamay, 2013).

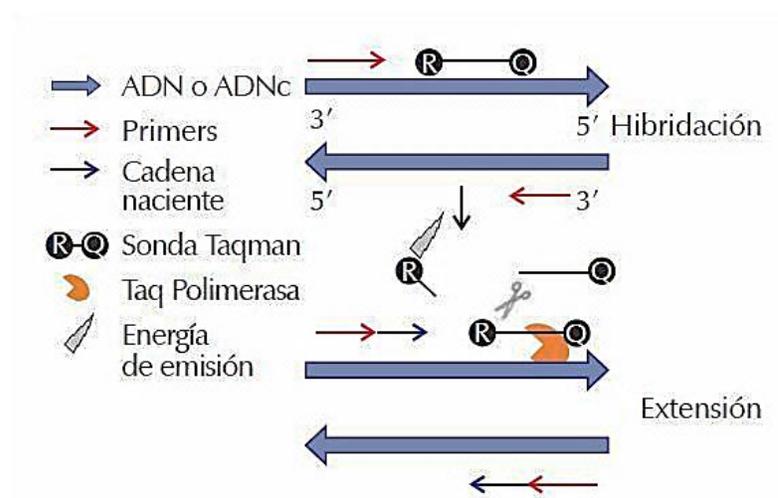


Figura 14. Mecanismo molecular de los métodos específicos de la PCR en tiempo real (Tamay, 2013).

b) Métodos no específicos (figura 15). Se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el DNA de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines es el *SYBR® Green* (Tamay, 2013).

Esta es una molécula cargada positivamente que no emite fluorescencia mientras esté en solución sin unirse al DNA de doble cadena, sin embargo, al unirse al surco menor del DNA, incrementa hasta 1000 veces su fluorescencia. Esta característica le confiere una gran desventaja a este reportero, la facilidad de unirse a cualquier molécula de DNA de doble cadena incluyendo dímeros de *primers*. Para identificar los productos de amplificación a los que se unió el reportero, se utiliza una curva de disociación, llamada Curva Melting (Tamay, 2013).

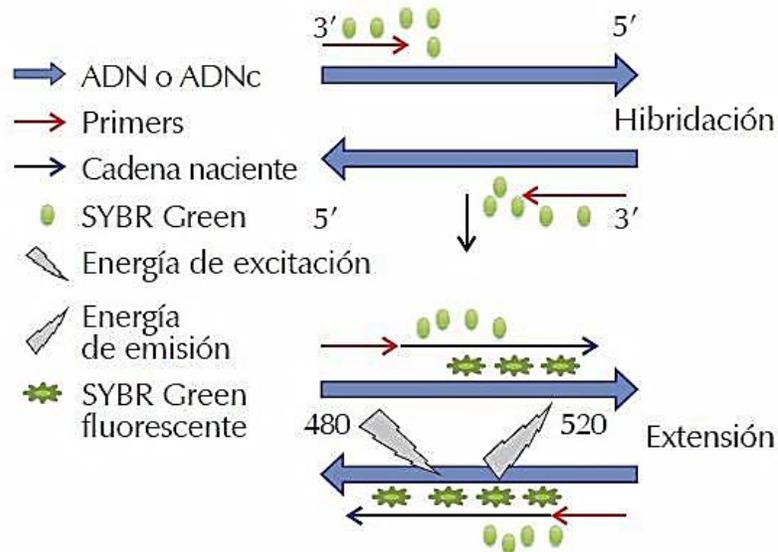


Figura 15. Mecanismo molecular de los métodos no específicos de la PCR en tiempo real (Tamay, 2013).

Los datos obtenidos de fluorescencia pasan a un software que genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa (Tamay, 2013).

Una de estas gráficas es la curva de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción; otra gráfica es la curva de disociación (melting) que muestra la información sobre la especificidad de la reacción (Tamay, 2013).

Finalmente se puede hacer uso del análisis cuantitativo que determina la amplificación precisa de la secuencia blanco (Tamay, 2013). Este procedimiento tiene dos variantes:

1. La cuantificación absoluta. Generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas de la secuencia blanco o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra. Usada clínicamente para medir la carga viral o bacteriana de algún patógeno en diferentes tejidos (Tamay, 2013).
2. La cuantificación relativa. Se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios están basados en los niveles del RNAm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen *housekeeping*) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas (Tamay, 2013).

1.12 Justificación

Debido a que la leishmaniosis es una enfermedad catalogada como una parasitosis persistente y reemergente a nivel mundial debido a su prevalencia y gran incidencia, es necesario proponer nuevas formas de diagnóstico utilizando muestras provenientes de lugares anatómicos no usados previamente que aumenten la sensibilidad y especificidad para la detección el patógeno y desplazar los productos biológicos usados actualmente para eliminar el peligro que la obtención de éstos implique para el paciente, al ser una técnica totalmente invasiva. Asimismo brindar un método de detección en etapas pre-patentes y patentes de esta enfermedad que ofrezca apoyo al diagnóstico diferencial a individuos que presenten signos y síntomas relacionados con la leishmaniosis.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- ✓ Explorar el uso diagnóstico potencial de tres productos biológicos a partir del modelo murino de infección con *Leishmania mexicana*.

2.2 Objetivos Particulares

- ✓ Reproducir el modelo murino de infección con *Leishmania mexicana* en ratones BALB/c.
- ✓ Estandarizar condiciones para la extracción y amplificación de DNA.
- ✓ Demostrar la presencia de la infección de *Leishmania* en biopsia de lesión por aspirado en ratones BALB/c infectados.
- ✓ Realizar la amplificación de fragmentos de DNA de *L. mexicana* a partir de muestras de orina, pelo y mucosa oral de ratones BALB/c a los 2 meses post-infección.

2.3 Hipótesis

Es posible revelar la presencia de *Leishmania mexicana* en muestras de orina, pelo y mucosa oral procedentes del modelo murino.

3 Metodología

Estudio experimental descriptivo prospectivo transversal en el que se seleccionó una muestra de ratones BALB/c machos debido a la baja variabilidad genética, usados para desarrollar la infección.

3.1 Material biológico

3.1.1 Cultivo del parásito y preparación del inóculo.

Se utilizó *Leishmania mexicana* de la cepa MHOM/BZ/61/M379 cultivada a 32°C en medio Eagle modificado de Duplecco adicionado con suero fetal bovino al 10%.

Los parásitos se mantuvieron en crecimiento *in vitro* para facilitar su proliferación durante 21 días. El medio fue cambiado cada semana para evitar su contaminación y el agotamiento de los nutrientes. Mediante la observación microscópica del cultivo, se aseguró mantener a los parásitos en el estadio de promastigotes necesarios para realzar la infección.

Se evaluó la viabilidad de los parásitos bajo microscopio utilizando azul tripano y el hemocitómetro.

3.1.1.1 Preparación del inóculo.

Se realizaron 3 lavados de los parásitos con PBS 1x + Glucosa al 0.1%, realizando ciclos de centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos para eliminar el medio en el que estaban suspendidos.

Los parásitos fueron resuspendidos en 2mL de PBS 1x + Glucosa al 0.1% y se realizó el conteo de éstos utilizando el hemocitómetro. Finalmente mediante diluciones se llegó a la concentración de 10^8 parásitos/mL.

3.1.2 Modelo animal.

Se usaron ratones BALB/c machos de cuatro semanas de edad provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Perinatología, los cuales se mantuvieron en condiciones recomendadas en la NOM-062-ZOO-1999 y en las normas internacionales. Su alimentación e hidratación fue *at libidum*.

Se hicieron dos grupos para este estudio: ratones blanco (n=2) y ratones infectados (n=7).

La infección se llevó a cabo inoculando 10µL en el cojinete plantar derecho de una solución de *Leishmania mexicana* cepa MHOM/BZ/61/M379 a concentración de 10⁸ parásitos/mL y se dejaron a libre evolución durante la duración del estudio.

La selección del modelo biológico de experimentación se hizo con base en la susceptibilidad demostrada hacia la infección con *Leishmania spp.* debido a la respuesta inmunológica de tipo Th2, que facilita que la enfermedad disemine y se mantenga latente.

El número de la muestra fue seleccionada mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia debido a la baja variabilidad genética que mantiene la cepa de ratones BALB/c del bioterio del Instituto Nacional de Perinatología, además de la conocida susceptibilidad del modelo.

3.1.3 *Primers* utilizados.

Se utilizaron dos *primers* para delimitar la región blanco para la amplificación.

Primer sentido (JW11):

✓ 5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3'

Primer antisentido (JW12):

✓ 5'-GGGTAGGGGCGTTC·TGCGAAA-3'

3.2 Muestreo.

El muestreo se realizó a los dos meses post infección en los ratones, obteniendo material biológico del sitio de inoculación mediante biopsia por aspiración, pelos del área periférica al cojinete plantar, cavidad oral y orina de cada ratón.

3.2.1 Muestras de mucosa oral del ratón.

Se utilizaron cepillos para citología cervical *Cytobrush*[™], los cuales fueron previamente humedecidos con PBS 1x pH 7.1 y se introdujeron a la cavidad oral de los ratones, y se rotaron de derecha a izquierda. Al final de la recolección, se colocaron dentro de tubos *ependorf*[®] de 1.5 mL que contenían 100 µL de PBS 1x pH 7.1 y se cortó el mango de los *Cytobrush*[™] para que el tubo cerrara a la perfección.

3.2.2 Muestras de pelo periférico al cojinete plantar del ratón.

Se arrancaron de 15 a 20 pelos del área periférica al cojinete plantar de la pata del ratón utilizando pinzas para depilar. Los pelos recolectados fueron depositados en un tubo *eppendorf*® de 1.5 mL que contenía 100 µL de PBS 1x pH 7.1.

3.2.3 Muestras de orina.

La orina se recolectó directamente de la papila urogenital del ratón, en un tubo *eppendorf*® de 1.5 mL.

3.2.4 Muestras de biopsia por aspiración del cojinete plantar.

La biopsia se realizó en el cojinete plantar derecho del ratón, para ello se utilizó una jeringa de 1 mL que contenía 10 µL de solución salina fisiológica.

Se puncionó el cojinete plantar del ratón con la jeringa, y se depositaron pequeños volúmenes de SSF. Posteriormente se succionó el líquido que había sido depositado en el cojinete plantar.

El material recolectado fue depositado en un tubo *eppendorf*® de 1.5 mL que contenía 100 µL de PBS 1x pH 7.1.

3.3 Procesamiento de las muestras.

3.3.1 Extracción y purificación de DNA.

Se realizó la purificación y extracción del DNA de las muestras obtenidas usando el kit comercial *Purelink*® *Genomic DNA Mini Kit* de la marca *Invitrogen*™, cuyo inserto puede encontrarse en línea.

Para las muestras de pelo se realizó una modificación a las instrucciones del inserto. Se realizó un tratamiento adicional con 20 µL de DTT 1M al momento de la digestión de la muestra con la finalidad de lograr la disgregación del contenido proteínico del pelo.

3.3.2 Cuantificación del DNA.

Para obtener los parámetros de pureza, calidad y cantidad del material genético extraído de las muestras de mucosa oral, pelo, orina y biopsia por aspiración del cojinete plantar, las muestras fueron analizadas por duplicado espectrofotométricamente en el lector multimodal *Synergy 2* de la marca *BioTek*®.

3.3.3 Integridad del DNA.

El DNA extraído de las muestras se analizó mediante un corrimiento electroforético con geles de agarosa al 1% + *GelRed*™. Se cargaron con solución amortiguadora *Blue/Orange loading Dye 6x* a relación 5:1 de la marca *Promega*®. El gel se sometió a 55V por un tiempo total de 30 minutos sumergido en solución amortiguadora TAE 1x.

Para la visualización de los productos se utilizó luz UV del fotodocumentador *Alphamager*® *HP* de la marca *Cell Biosciences*®.

3.3.4 Estandarización de la PCR punto final.

Para la estandarización de la técnica se realizó un gradiente de temperatura de alineación para los *primers* JW11 y JW12.

Partiendo de la temperatura de alineación teórica de los *primers* obtenida de 68°C y restando 10°C, se seleccionó una temperatura media de 58°C.

A partir de esta temperatura se corrió un gradiente de temperatura de 58°C±10°C, seleccionando un rango que fue de los 48°C-68°C.

Se prepararon reacciones para la amplificación de los mini círculos de *Leishmania spp.* y se usó el mismo volumen de DNA extraído de cultivo de *L. mexicana* de la cepa MHOM/BZ/61/M379 para la preparación de cada sistema.

Los intervalos fueron seleccionados previamente por el equipo *Mastercycler gradient*® de la marca *ependorf*®.

Finalmente se prepararon geles de agarosa al 3% y se sometieron a corrimiento electroforético a 55 V durante 2 horas y 15 minutos en solución amortiguadora TAE 1x.

Para la visualización de los productos se utilizó luz UV del fotodocumentador *AlphaImager*® *HP* de la marca *Cell Biosciences*®.

Se seleccionó a 52°C como temperatura de alineación óptima para los *primers* JW11 y JW12.

3.3.5 Amplificación por PCR punto final.

La amplificación del fragmento de DNA que codifica para la expresión de los mini círculos se realizó utilizando los *primers* JW11 y JW12, obteniendo un fragmento cuyo tamaño es de 120 pb.

La amplificación se llevó a cabo en el equipo *Mastercycler gradient*® de la marca *ependorf*®, el cual se programó con las condiciones de estandarización experimentales anteriormente descritas, conservando las condiciones de temperatura de las etapas de desnaturalización y de elongación.

Los productos de la amplificación se mezclaron con solución amortiguadora de carga *Blue/Orange loading Dye 6x* a relación 5:1 de la marca *Promega*® y se colocaron en un gel de agarosa al 3% + *GelRed*™, el corrimiento electroforético se sometió a 55V por un tiempo total de 2 horas y 15 minutos en solución amortiguadora TAE 1x. Como marcador de peso molecular se usó 1 µL de una alícuota diluida 1:10 del marcador *50 bp DNA ladder*, de la marca *Invitrogen*™.

Para la visualización de los productos se utilizó luz UV del fotodocumentador *AlphaImager*® *HP* de la marca *Cell Biosciences*®.

3.3.6 Estandarización de la PCR tiempo real.

Se realizaron dos amplificaciones de muestras positivas tomadas de los ratones, una de ellas, utilizando la temperatura de alineación recomendada por el inserto del equipo *Rotor Gene Q*® de la marca *Qiagen*®, de 60°C; la segunda amplificación se realizó utilizando la temperatura de alineación óptima para PCR punto final, de 52°C y, con base en la curva de disociación, se compararon y se seleccionó cual temperatura era la mejor.

Se seleccionó 52°C como temperatura de alineación óptima para los *primers* JW11 y JW12, utilizando la técnica de PCR tiempo real con *SYBR® Green*.

3.3.7 Amplificación por PCR tiempo real.

La amplificación del fragmento de DNA que codifica para la expresión de los mini círculos se realizó utilizando los *primers* JW11 y JW12 en conjunto con *SYBR® Green* como molécula intercalante.

La amplificación se llevó a cabo en el equipo *Rotor-Gene® Q* de la marca *Qiagen®*, el cual se programó con las condiciones de estandarización experimentales anteriormente descritas, conservando las condiciones de temperatura de las etapas de desnaturalización y de elongación.

Una vez concluida la etapa de la amplificación, se realizó la curva de disociación de las moléculas de doble cadena formadas, para observar los productos de amplificación.

4 Resultados.

4.1 Cuantificación del DNA de las muestras.

De acuerdo a la metodología planteada en este trabajo, los resultados obtenidos en la cuantificación de DNA en biopsias en ratón sano, e infectado se muestran en las siguientes tablas 11, 12, 13 y 14: se puede apreciar la concentración de material genético expresado en ng/ μ L de las muestras de biopsia por aspiración de cojinete plantar, mucosa oral, orina y pelo. En la tabla 13 se observa que las muestras correspondientes a los ratones infectados 1 y 2, no tienen valor numérico, esto se debe a que no se logró recolectar cantidad alguna de orina de estos ratones.

Tabla 11. Cuantificación del DNA de muestras de biopsia por aspiración.

Muestra	ng/ μ L
Biopsia de ratón sano	22.05
Biopsia de ratón infectado 1	2.3
Biopsia de ratón infectado 2	14.85
Biopsia de ratón infectado 3	2.6

Muestra	ng/ μ L
Biopsia de ratón infectado 4	2.3
Biopsia de ratón infectado 5	2.25
Biopsia de ratón infectado 6	1.65

Tabla 12. Cuantificación del DNA de muestras de mucosa oral.

Muestra	ng/ μ L
Mucosa oral de ratón sano	12.4
Mucosa oral de ratón infectado 1	4.05
Mucosa oral de ratón infectado 2	2.05
Mucosa oral de ratón infectado 3	1.3

Muestra	ng/ μ L
Mucosa oral de ratón infectado 4	2.1
Mucosa oral de ratón infectado 5	1.35
Mucosa oral de ratón infectado 6	1.75

Tabla 13. Cuantificación del DNA de muestras de orina.

Muestra	ng/ μ L
Orina de ratón sano	4.1
Orina de ratón infectado 1	0
Orina de ratón infectado 2	0
Orina de ratón infectado 3	0.4

Muestra	ng/ μ L
Orina de ratón infectado 4	0.3
Orina de ratón infectado 5	2.4
Orina de ratón infectado 6	1.7

Tabla 14. Cuantificación del DNA de muestras de pelo.

Muestra	ng/ μ L
Pelo de ratón sano	2.4
Pelo de ratón infectado 1	2.3
Pelo de ratón infectado 2	6.75
Pelo de ratón infectado 3	4.9

Muestra	ng/ μ L
Pelo de ratón infectado 4	3.05
Pelo de ratón infectado 5	3.55
Pelo de ratón infectado 6	3.6

4.2 Integridad del DNA de las muestras.

En las siguientes imágenes se muestran los geles correspondientes a la integridad del DNA aislado y purificado de cada grupo de muestras que se recolectó durante este estudio. Se pueden observar líneas definidas de color blanco que corresponden al DNA extraído de cada uno de los ratones utilizados en la experimentación (sanos e infectados), en donde se puede apreciar la uniformidad de las líneas dentro de cada carril. Esta prueba indica que el DNA se encuentra en buen estado y sin degradación.

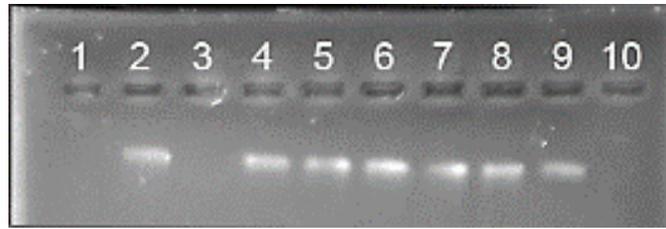


Figura 16. Integridad del DNA de muestras de biopsia por aspiración.

Los carriles 1, 3 y 10 están vacíos. El carril 2 corresponde al DNA de ratón sano. Los carriles del 4 al 9 corresponden a muestras de ratones infectados.

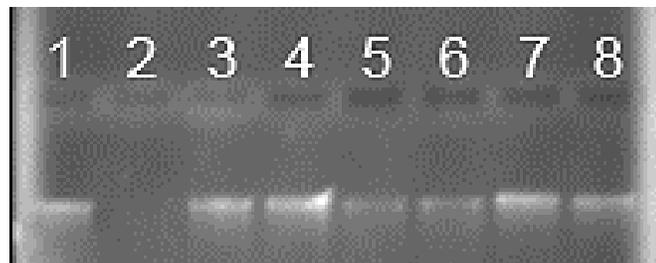


Figura 17. Integridad del DNA de muestras de mucosa oral.

En el carril 1 se encuentra el DNA del ratón sano. Los carriles del 3 al 8 contienen muestras de ratones infectados. El carril 2 se encuentra vacío.

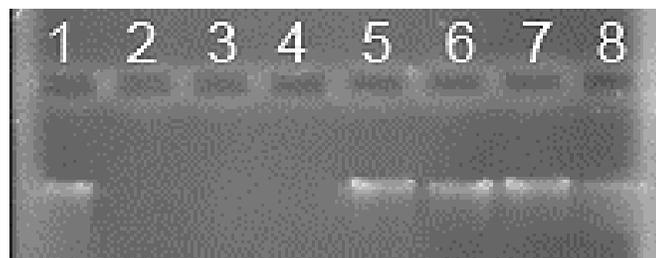


Figura 18. Integridad del DNA de muestras de orina.

En el carril 1 se encuentra el DNA del ratón sano. Los carriles del 5 al 8 contienen muestras de ratones infectados. Los carriles 2, 3 y 4 se encuentran vacíos.

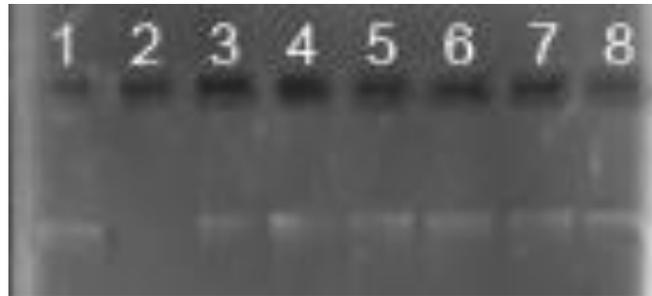


Figura 19. Integridad del DNA de muestras de pelo.

En el carril 1 se encuentra el DNA del ratón sano. Los carriles del 3 al 8 contienen muestras de ratones infectados. El carril 2 se encuentra vacío.

4.3 Estandarización PCR punto final.

La estandarización del método de PCR punto final se realizó bajo las condiciones atmosféricas de la ciudad de México para seleccionar la temperatura óptima de alineación de fragmentos de DNA de *Leishmania mexicana* utilizando los *primers* JW11 y JW12 partiendo de la temperatura de alineación teórica obtenida de 58°C (carril 10).

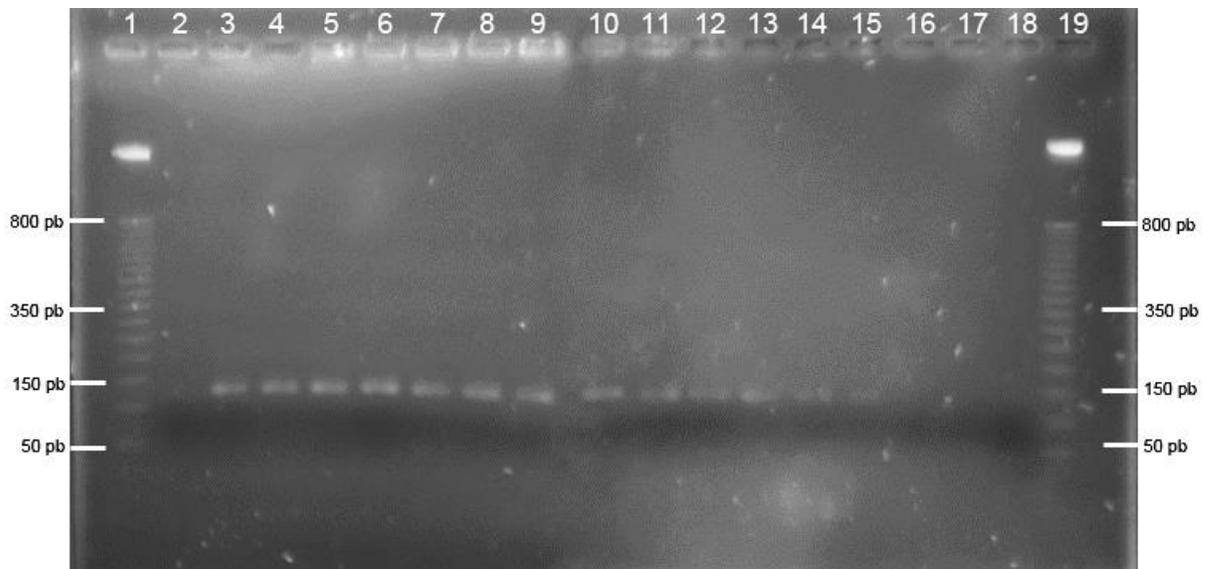


Figura 20. Gel del gradiente de temperaturas de alineación.

En los carriles 1 y 19 se encuentra el marcador de pares base 50 *bp DNA ladder*. Carriles 2 y 18 están vacíos. Del carril 3 al carril 17 está el gradiente de temperaturas: 48°C, 48.7°C, 50.7°C, 52°C, 54.8°C, 56.1°C, 57.1°C, 58°C, 58.7°C, 59.6°C, 60.8°C, 63.5°C, 64.9°C, 66.1°C y 68°C respectivamente.

Se puede apreciar en la figura anterior que a medida de que la temperatura va aumentando, se va perdiendo la intensidad de la banda en el gel, siendo la más intensa la que se encuentra en el carril 6, que corresponde a la alineación de los *primers* a 52°C. Lo anterior es causado por la inestabilidad de la interacción que existe por los puentes de hidrógeno de entre los nucleótidos de los *primers* con la secuencia blanco.

4.4 PCR punto final.

Los siguientes resultados muestran la amplificación del fragmento perteneciente a los micináculos de *Leishmania mexicana* de las diferentes muestras obtenidas del modelo murino.

La positividad se muestra como una línea horizontal de color blanco en cada carril cercana a la región de 150 pares base que indica el marcador de pares base colocado en el carril 1 en cada gel. Por otra parte la línea que se encuentra cercana a la región de 50 pares base, corresponde a la formación de dímeros debido a la oligomerización por la amplificación inespecífica de los *primers* después de 25 ciclos.

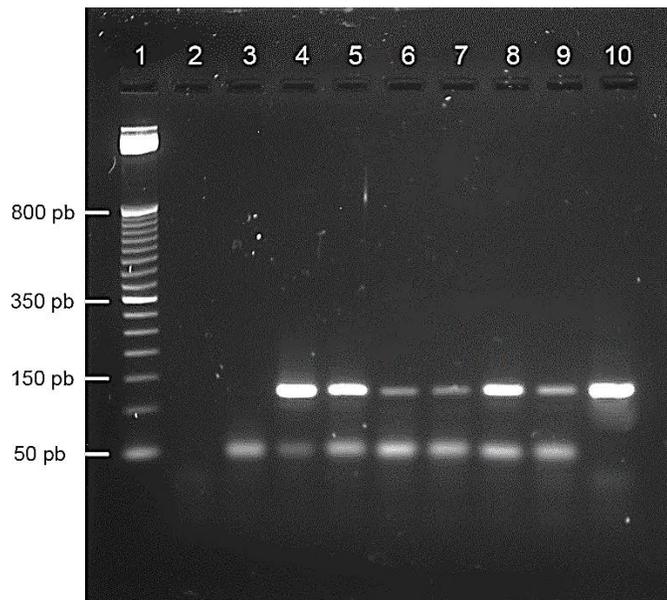


Figura 21. Electroforesis de amplificación de muestras de biopsia por aspiración.

En el carril 1 se encuentra el marcador pares base 50 *bp DNA ladder*, en el carril 2 se encuentra el blanco de reacción, en el carril 3 se encuentra DNA de ratón sano; del carril 4 al carril 9 ratones infectados. Finalmente en el carril 10 se encuentra el control positivo M379.

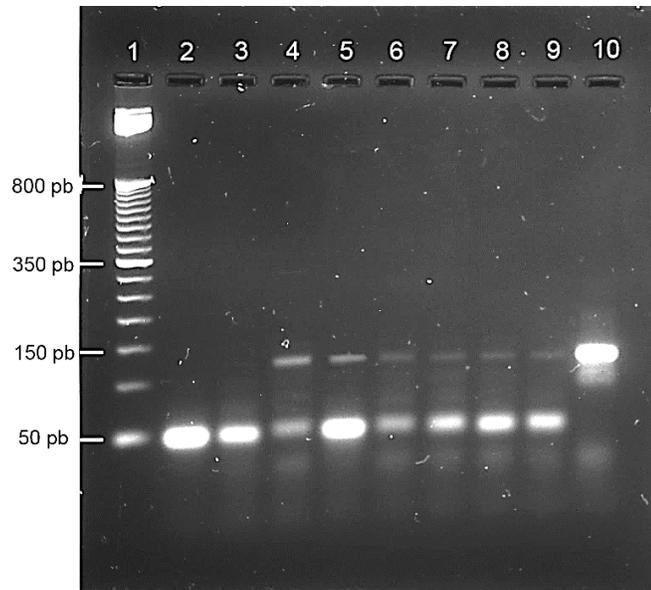


Figura 22. Electroforesis de amplificación de muestras de mucosa oral.

En el carril 1 se encuentra el marcador pares base *50 bp DNA ladder*, en el carril 2 se encuentra el blanco de reacción, en el carril 3 se encuentra DNA de ratón sano; del carril 4 al carril 9 ratones infectados. Finalmente en el carril 10 se encuentra el control positivo M379.

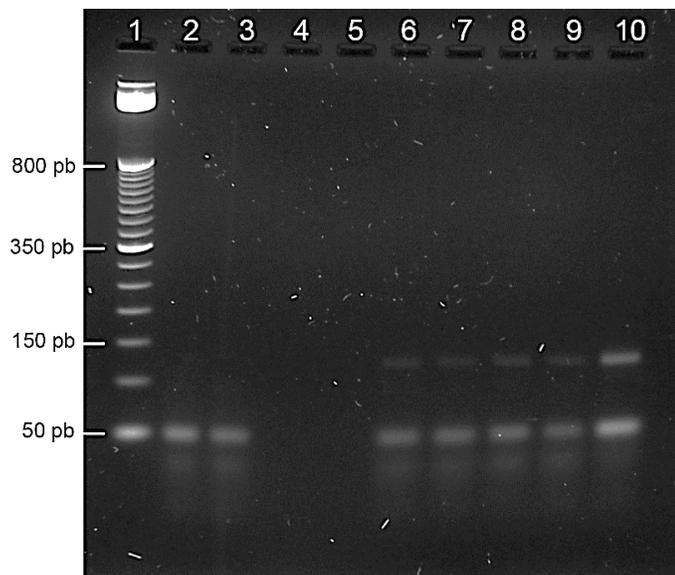


Figura 23. Electroforesis de amplificación de muestras de orina.

En el carril 1 se encuentra el marcador pares base *50 bp DNA ladder*, en el carril 2 se encuentra el blanco de reacción, en el carril 3 se encuentra DNA de ratón sano; del carril 6 al carril 9 ratones infectados. Finalmente en el carril 10 se encuentra el control positivo M379. Los carriles 4 y 5 carecen de muestra.

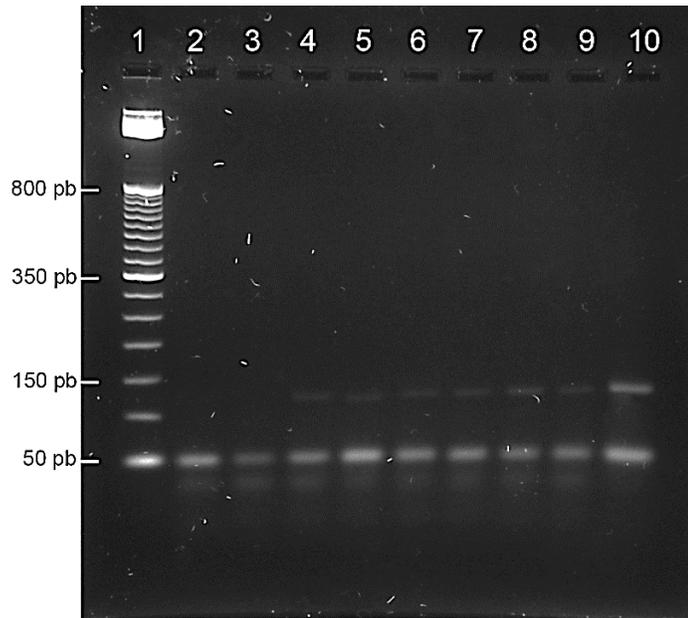


Figura 24. Electroforesis de amplificación de muestras de pelo.

En el carril 1 se encuentra el marcador pares base 50 bp DNA ladder, en el carril 2 se encuentra el blanco de reacción, en el carril 3 se encuentra DNA de ratón sano; del carril 4 al carril 9 ratones infectados. Finalmente en el carril 10 se encuentra el control positivo M379.

4.5 Estandarización PCR tiempo real.

Con la estandarización de esta técnica se seleccionó la concentración de DNA de cultivo de *Leishmania mexicana* que se usó como control positivo para validar los experimentos siguientes que incluían las muestras de DNA obtenidas de biopsia por aspiración del cojinete plantar, mucosa oral, pelo y orina de ratón sano y ratones infectados.

En el gráfico 1 se observa la amplificación de la región específica de los minicírculos de *Leishmania mexicana* en función al número de ciclos realizados por el equipo, determinado por la intensidad de fluorescencia que libera el reportero SYBR® Green.

Se seleccionó el control número 5 que estaba diluido 10,000 veces con la finalidad de que su curva de amplificación fuera lo más cercana a las curvas de amplificación de las muestras que se utilizaron.

El gráfico 2 muestra las curvas de disociación de los fragmentos amplificados durante la PCR tiempo real, estas curvas indican que todos los amplicones provenientes del DNA

parasitario, son los mismos fragmentos al tener una temperatura de disociación de entre 84°C a 85°C.

Tabla 15. Correspondencia por color de diluciones del control positivo en las reacciones de PCR en tiempo real.

No.	Colour	Name
1	Red	1:1
2	Yellow	1:10
3	Blue	1:100
4	Purple	1:1000
5	Pink	1:10000
6	Light Blue	1:100000
7	Teal	1:1000000

Gráfico 1. Amplificación del control positivo a las diluciones.

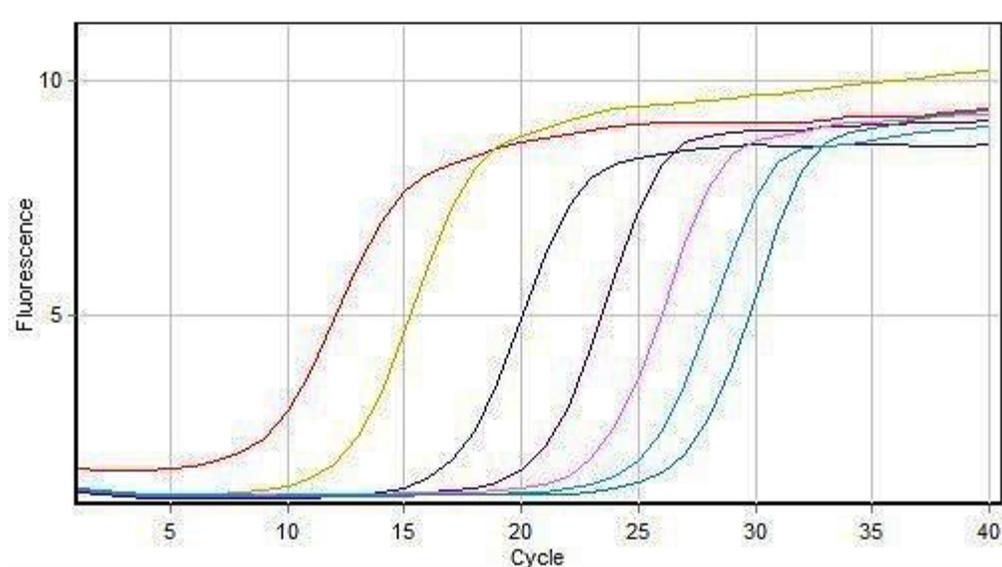
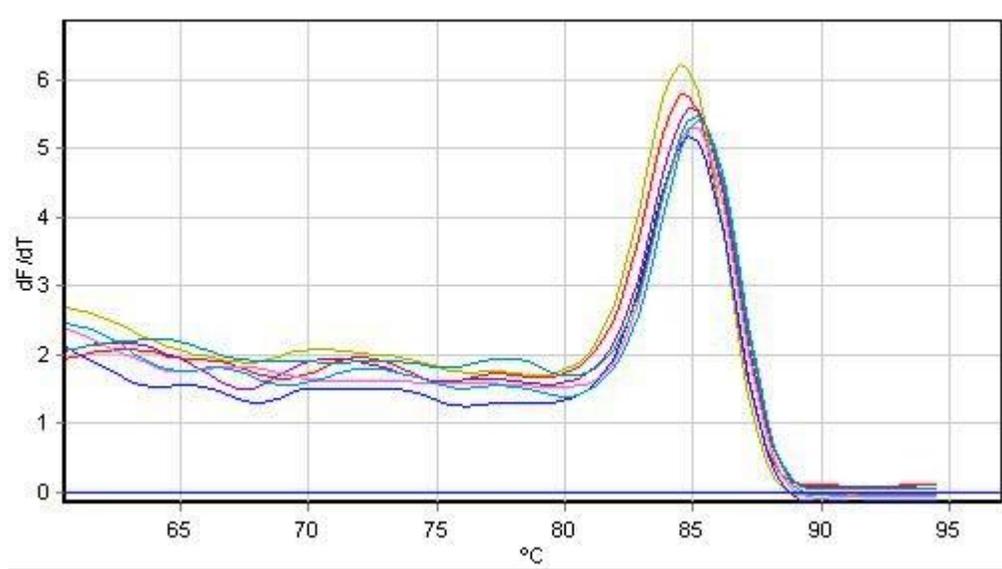


Gráfico 2. Disociación del control positivo a las diluciones.



4.6 PCR tiempo real.

Las siguientes gráficas corresponden a las amplificaciones de los fragmentos de los minicírculos mediante la técnica de PCR tiempo real usando los *primers* JW11 y JW12 de las muestras obtenidas de los ratones infectados, usando un ratón sano como blanco y agua como control negativo.

Tabla 16. Correspondencia por color de diluciones del control positivo en las reacciones de PCR en tiempo real.

No.	Colour	Name	Type
1	Red	Control negativo	NTC
2	Yellow	Ratón sano	Unknown
3	Blue	Ratón infectado 1	Unknown
4	Purple	Ratón infectado 2	Unknown
5	Pink	Ratón infectado 3	Unknown
6	Light Blue	Ratón infectado 4	Unknown
7	Teal	Ratón infectado 5	Unknown
8	Light Red	Ratón infectado 6	Unknown
9	Green	Control M379 1:10000	Positive Control

Gráfico 3. Amplificación de muestras de biopsia por aspiración.

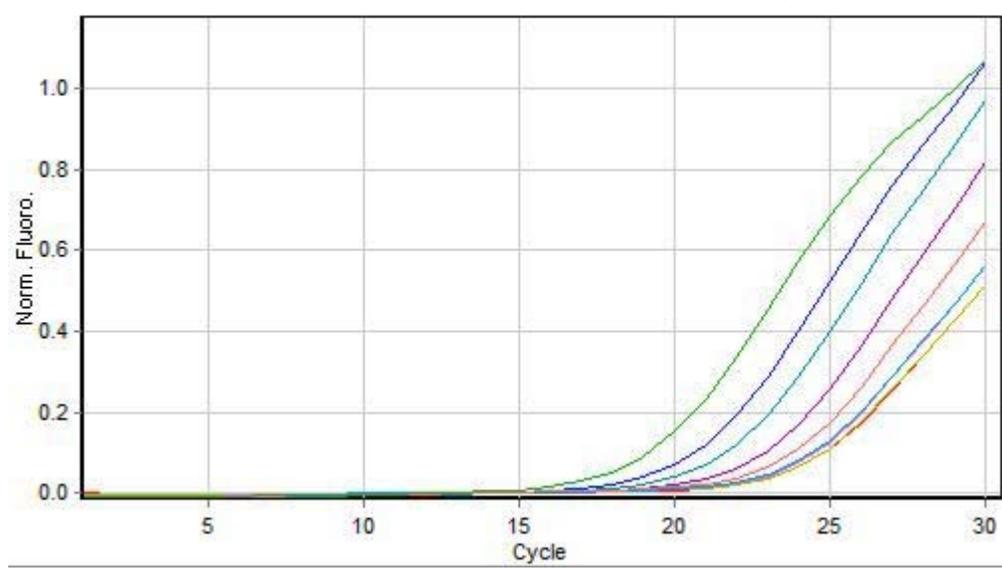


Gráfico 4. Disociación de muestras de biopsia por aspiración.

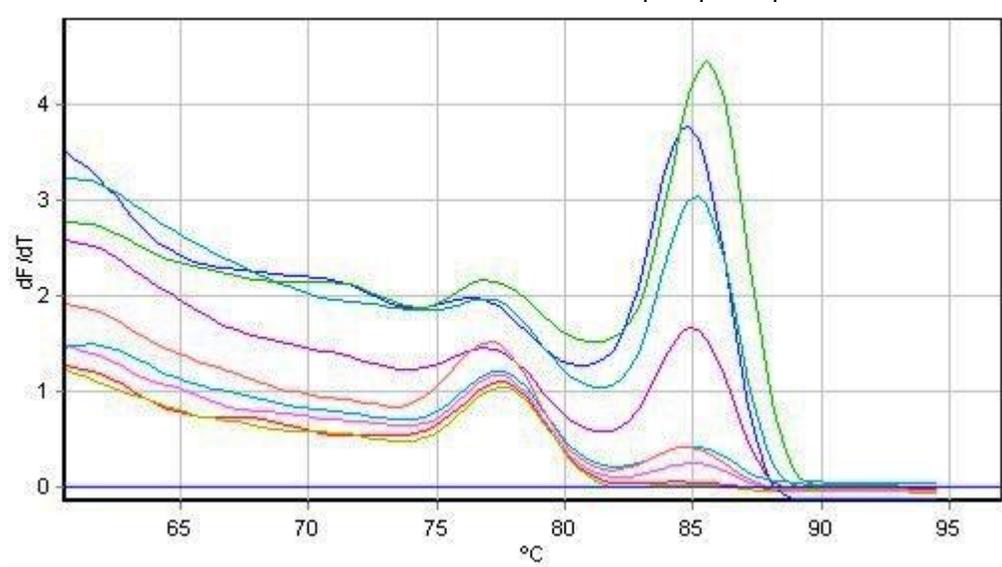


Gráfico 5. Amplificación de muestras de mucosa oral.

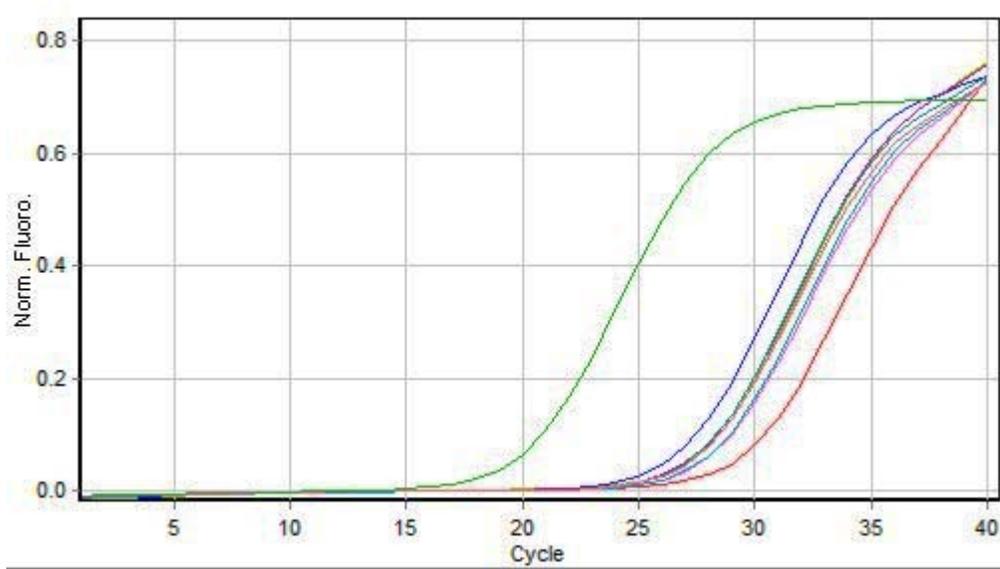


Gráfico 6. Disociación de muestras de mucosa oral.

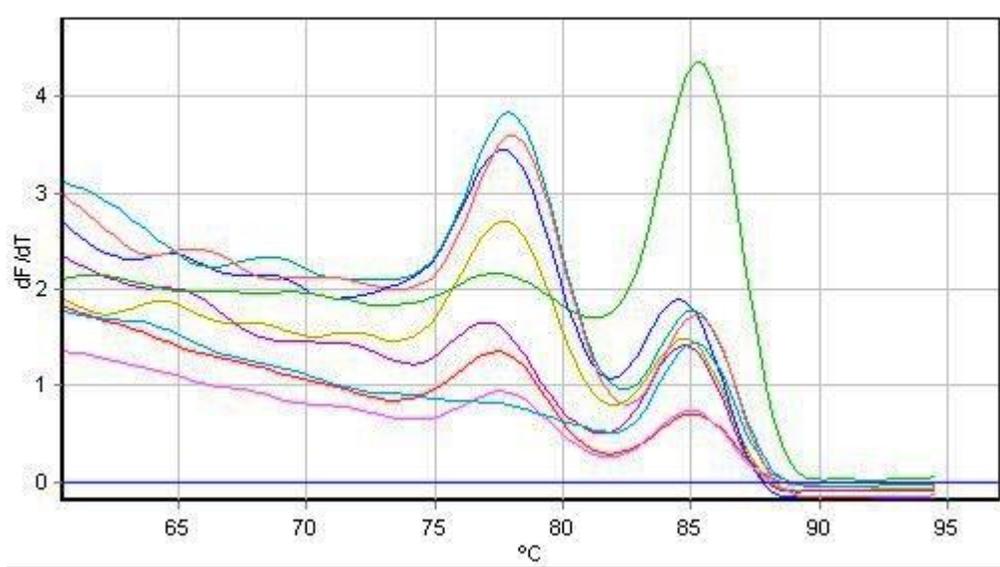


Tabla 17. Correspondencia por color de muestras de orina en las reacciones de PCR en tiempo real.

No.	Colour	Name	Type
1	■	Blanco	NTC
2	■	Orina ratón sano	Unknown
3	■	Orina ratón inf 1	Unknown
4	■	Orina ratón inf 2	Unknown
5	■	Orina ratón inf 5	Unknown
6	■	Orina ratón inf 6	Unknown
7	■	Control positivo M379 1:10000	Positive Control

Gráfico 7. Amplificación de muestras de orina.

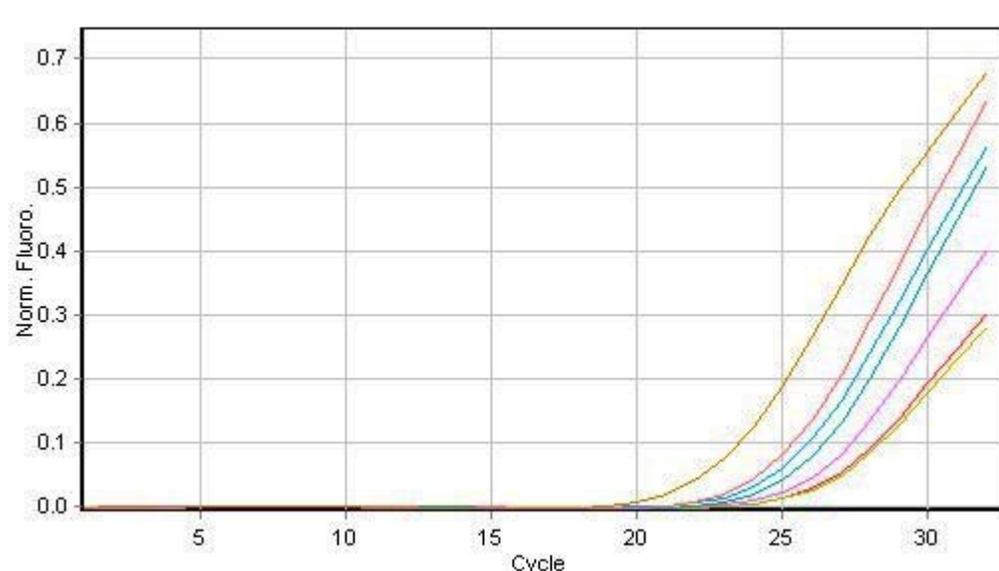


Gráfico 8. Disociación de muestras de orina.

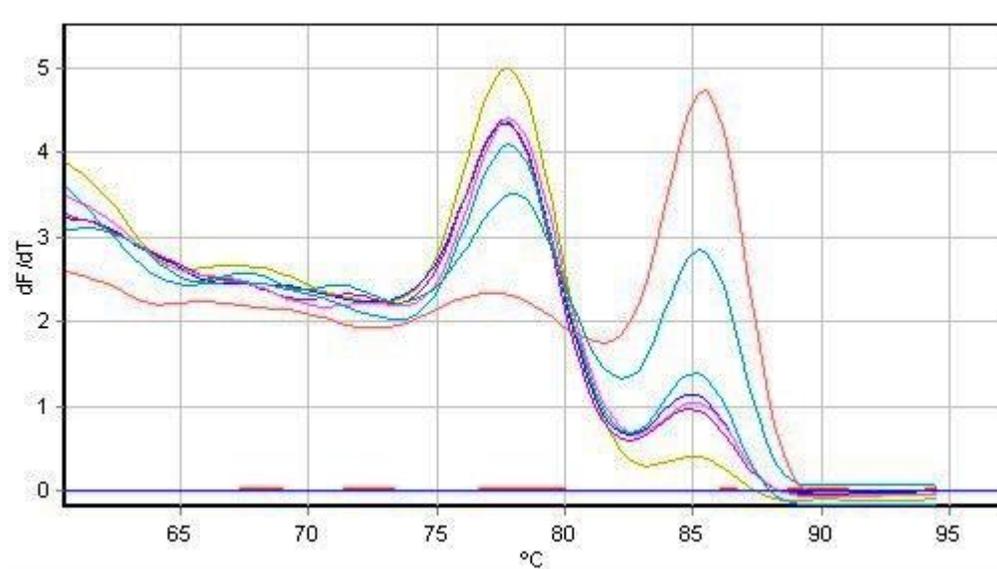


Tabla 18. Correspondencia por color de muestras de pelo en las reacciones de PCR en tiempo real.

No.	Colour	Name	Type
1	■	Blanco	NTC
2	■	Pelo ratón sano	Unknown
3	■	Pelo ratón inf 1	Unknown
4	■	Pelo ratón inf 2	Unknown
5	■	Pelo ratón inf 3	Unknown
6	■	Pelo ratón inf 4	Unknown
7	■	Pelo ratón inf 5	Unknown
8	■	Pelo ratón inf 6	Unknown
9	■	Control positivo M379 1:10000	Positive Control

Gráfico 9. Amplificación de muestras de pelo.

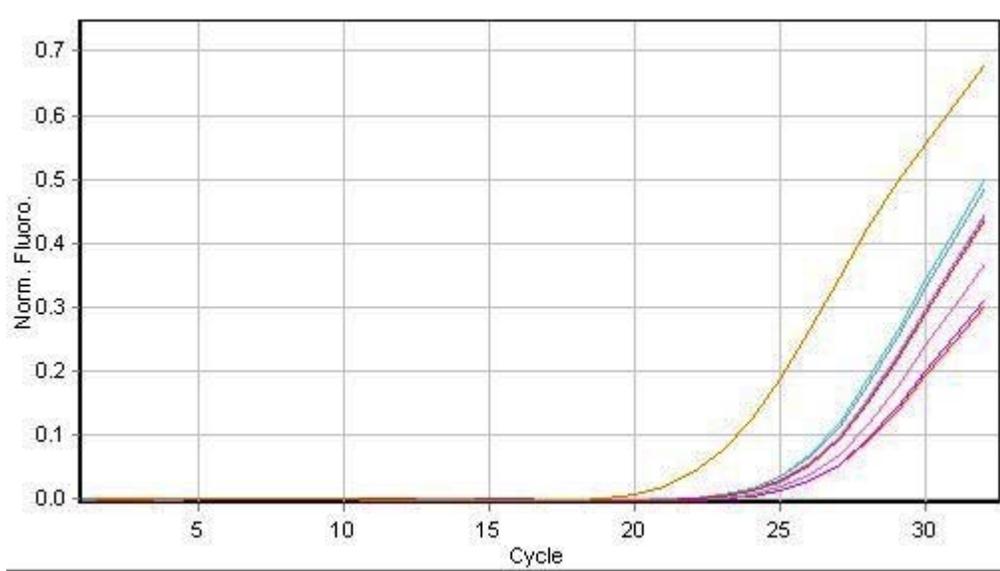
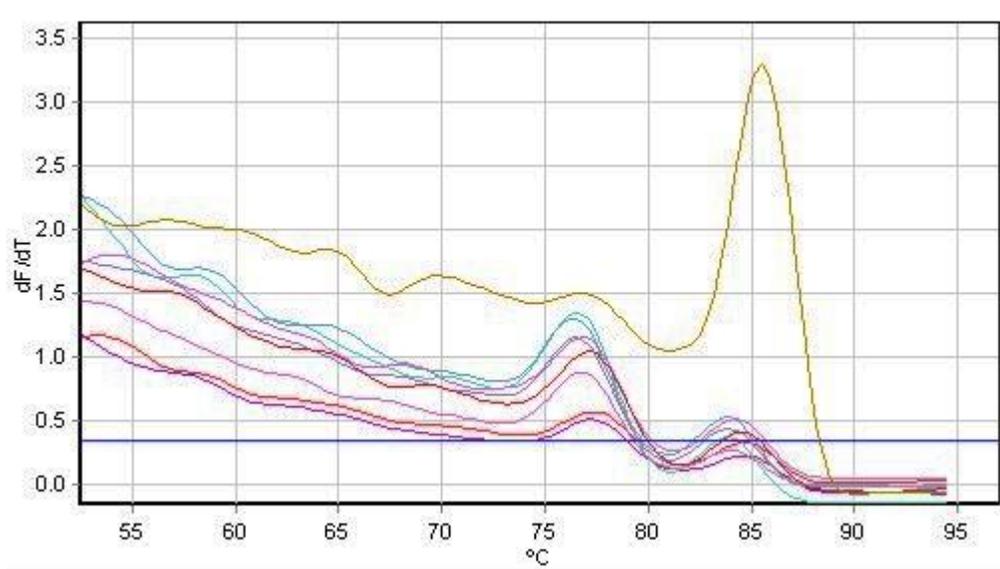


Gráfico 10. Disociación de muestras de pelo.



5 Discusión.

La leishmaniosis pertenece al grupo de las NTD, un grupo creado por la OMS en donde agrupa a las enfermedades que afectan a una gran población y son endémicas en diversos países, teniendo una extensión territorial que afecta zonas tropicales en los continentes. Otra característica de este grupo de enfermedades es que desde hace 50 años no se han tenido avances tecnológicos en la forma en que se realiza el diagnóstico de estas enfermedades ni avances en el desarrollo de nuevos cuadros de tratamiento que se le pueda ofrecer a la población.

Las formas de diagnóstico de esta enfermedad en la actualidad son técnicas en donde se evidencia la presencia del patógeno mediante moléculas inherentes a éste, por ejemplo los anticuerpos, en el caso de los ELISA; la intradermorreacción de Montenegro en donde se evalúa la formación de una induración compuesta por macrófagos del epitelio en donde se expone la leishmanina, o bien, técnicas en donde se hace de manera intencionada, la búsqueda del parásito mediante la recolección del material infeccioso y se realiza un tratamiento tintorial para hacer más fácil su identificación. Un ejemplo de éstos son las técnicas de observación a partir de gotas de sangre, improntas, y material extraído mediante biopsias de órganos blanco para el parásito, como son la médula ósea, bazo y ganglios linfáticos.

Debido a la necesidad de realizar un diagnóstico asertivo y diferencial para los pacientes que acuden a los centros de salud de 3er nivel (hospitales de alta especialización) y de concentración regional, que cursan con signos y síntomas que son sugerentes de la patología, se planteó el desarrollo de dos técnicas de diagnóstico molecular para la detección de *L. mexicana* en modelo murino, que ofrezcan alta sensibilidad y especificidad ante la infección en etapas agudas (2 meses post infección) utilizando muestras biológicas innovadoras que no se habían usado antes para el diagnóstico del parásito.

Si bien las técnicas moleculares recientemente se han implementado para la detección de distintas especies de *Leishmania spp*, su alcance es limitado y sólo están disponibles para el área de investigación

Con la implementación de técnicas moleculares al momento del diagnóstico, se elimina la labor de capacitación para el operador del microscopio que realiza la búsqueda

intencionada del parásito en muestras con gran cantidad de artefactos propios de las secreciones del paciente y al momento de teñir las muestras. Además de que ciertas especies, no se mantienen en el lugar en que fueron inoculados por el vector, sino que se diseminan y si la respuesta inmunológica del hospedero lo permite, pueden visceralizar y afectar tejidos y órganos de importancia vital para el organismo.

Para hacer evidente la infección, se realizó una biopsia por aspiración del lado en el que fueron inoculados los parásitos en los ratones infectados, se cuantificó el DNA obtenido de cada muestra (tabla 11), se preparó un gel para verificar la integridad del DNA extraído (figura 16) y se preparó una PCR punto final (figura 21).

En la tabla 11 se aprecia que la cantidad de DNA extraída de las muestras de biopsia por aspiración del cojinete plantar es mayor a 1.5 ng/μL, lo cual indica que la cantidad es aceptable para la búsqueda del fragmento correspondiente a los minicírculos de *Leishmania mexicana* mediante amplificación específica con los *primers* JW11 y JW12.

En el gel de integridad observado en la figura 16, se observan líneas horizontales de color blanco bien definidas, las cuales corresponden al material genético extraído de las muestras de biopsia por aspiración del cojinete plantar, esto indica que hay una cantidad aceptable de DNA que puede ser evidenciada por la interacción iónica entre el *GelRed*[™] y la doble cadena de DNA, y se aprecia con facilidad del ojo humano después de ser expuesta a radiación UV. Además, la definición de las líneas horizontales indican que no existe degradación al momento de la lisis celular y purificación del DNA mediante el método comercial *Purelink*[®] *Genomic DNA Mini Kit* y que las muestras pueden ser utilizadas para la búsqueda de *Leishmania mexicana*, mediante amplificación.

Como se puede apreciar en la figura 21, en los carriles de todos los ratones infectados, se observa la presencia de una banda que se encuentra a la misma distancia que la del control positivo (amplicón del DNA de *L. mexicana* cepa M379), que corresponde a 120 pb (Arts y Benne, 1996), lo que indica que la enfermedad progresó en los ratones infectados y que el fragmento que se ha amplificado es la región de los mini círculos de *Leishmania mexicana*.

Una vez teniendo la certeza de que los ratones están infectados, se procesaron de igual manera las muestras de mucosa oral, pelo y orina a los dos meses post infección.

La cuantificación de estas muestras se puede observar en las tablas 12, 13, y 14, respectivamente, en donde se observa que la concentración de DNA es mayor a 1.5 ng/μL,

salvo en algunas muestras de orina (muestras de ratón infectado 3 y 4) en donde a pesar de que se recolectó un volumen considerable de orina, hubo muy baja cantidad de células epiteliales escamosas presentes en ésta, las cuales son inherentes al método de recolección y son dependientes de la descamación del epitelio de la uretra. Asimismo en las muestras de orina de los ratones infectados 1 y 2, no muestran cifras positivas de concentración debido a que en este particular caso, no se logró recolectar la muestra en estos ratones por la dificultad del método y por cuestiones inherentes a éste.

La integridad mostrada en los geles de agarosa correspondientes a las muestras de mucosa oral (figura 17), orina (figura 18), y pelo (figura 19), indican que no existe degradación de la doble cadena de DNA y que se encuentra viable para la amplificación de los fragmentos pertenecientes a *Leishmania mexicana* mediante técnicas moleculares.

En cuanto a los resultados de los la PCR punto final, los geles obtenidos en las figuras 22, 23 y 24, muestran la amplificación del mismo fragmento perteneciente a los mini círculos de *L. mexicana* de peso igual a 120 pb.

Además de este fragmento, en estos geles se aprecian líneas de bajo peso molecular, las cuales se encuentran cercanas a 50 pb. Estos fragmentos corresponden a la formación de oligómeros pertenecientes a los *primers* debido a la inespecificidad que surge cuando los ciclos de la PCR son mayores a 27.

De la misma forma, con las muestras obtenidas se preparó una PCR en tiempo real para observar si se puede aumentar la sensibilidad para la detección de copias del material genético correspondiente a los mini círculos de *L. mexicana*.

En los resultados obtenidos, se pueden observar en las curvas de amplificación (gráficas 5, 7, y 9) que hubo amplificación en las muestras con distinta intensidad de fluorescencia, y que al comparar estas curvas de amplificación con las curvas de disociación (gráficas 6, 8 y 10) indican amplificación de un fragmento grande que se evidencia por el segundo pico en todas las curvas, que se genera a 85°C y que se encuentran por arriba de los picos formados por las muestras blanco y de ratón sano que se encuentran por debajo de estos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en los geles de PCR punto final.

Sin embargo, en la mayoría de las muestras, el equipo identifica picos de alta fluorescencia generados a una temperatura de 77°C que corresponden a los oligómeros formados por la unión entre *primers* (los cuales se pueden observar en las gráficas 6, 8 y 10) debido a la

inespecificidad que el método genera a un número de ciclos mayor a 27, y que las copias correspondientes al fragmento de DNA blanco generan menor cantidad de fluorescencia, comparadas con las gráficas de los oligómeros, pero de mayor tamaño que las obtenidas con el blanco de reacción (NTC) y ratón sano, lo cual puede ser interpretado como un resultado positivo.

Debido al crecimiento en los picos de inespecificidad, se realizaron diversas variaciones de condiciones para disminuir la interferencia ocasionada por estos oligómeros, sin resultado satisfactorio.

A consecuencia de los resultados obtenidos, se realizó la comparación de estas dos técnicas moleculares y se observó que los fragmentos son visibles en la PCR punto final con menor cantidad de DNA de las muestras, a pesar de que esta técnica está catalogada como menos sensible que la PCR en tiempo real, que para fines de este experimento, y usando las muestras descritas anteriormente, se requiere de mayor cantidad de material genético para la detección del fragmento de DNA blanco.

Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de muestras de mucosa oral, pelo y orina de ratones infectados, muestran que sí es viable la detección del material genético del parásito en sitios alejados de la lesión. Asimismo los resultados obtenidos muestran que se puede evidenciar la presencia del parásito en muestras que no implican un reto técnico ni generan invasividad para su obtención, y que gracias a ello, el paciente que se encuentra en una etapa patente de la enfermedad no sufriría de sangrados característicos de la obtención de biopsias.

Finalmente como prospectivas a mediano o largo plazo, una vez que esto pueda ajustarse a la detección del parásito para el diagnóstico clínico en humanos y a razón de su costo, formaría parte de las pruebas de gabinete de acuerdo al grado de baja sensibilidad pero muy alta especificidad que brindan las técnicas moleculares, con la finalidad de que apoye al diagnóstico diferencial dirigido hacia otras patologías que compartan el mismo cuadro clínico que la leishmaniosis y que en el mejor de los casos, sea usada como confirmatoria para esta enfermedad.

6 Conclusiones

- ✓ En muestras de raspado de mucosa oral, orina y pelo cercano al sitio de inoculación, se puede detectar DNA de *Leishmania mexicana*.
- ✓ Es posible detectar DNA de *L. mexicana* en etapas agudas de la enfermedad en modelo murino.
- ✓ La infección por *L. mexicana* relacionada a la leishmaniosis cutánea, no es exclusiva del sitio de infección.
- ✓ La técnica de PCR punto final es más sensible que la técnica de PCR tiempo real para la amplificación de fragmentos correspondientes a los minicírculos de *L. mexicana*.
- ✓ La PCR tiempo real requiere mayor cantidad de DNA de la muestra para demostrar la formación de copias del fragmento de los minicírculos de *L. mexicana* utilizando los *primers* JW11 y JW12, en comparación con la PCR punto final.

7 Referencias

- Arts, G. J., y Benne, R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. *Biochim Biophys Acta*, 1307(1), 39-54.
- Belkis, A. (2012). Microbiología y parasitología médicas (2a ed., Vol. 3). La Habana, Cuba. Retrieved from <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0preclini--00-0---0-10-0---0---0direct-10---4-----0-1l--11-1l-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-00-00ya=dycl=CL3.1yd=HASH421a29fb58eb8d61c867bb.7.4.fc>.
- Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., y Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, 37(10), 1063-1075. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.008
- Biotium (2013) Safety report of gelred and gelgreen. Nucleic acid detection technologies. Recuperado el 23 de mayo, 2015, de <http://www.biotium.com>
- Chávez-Fumagalli, M., Ribeiro, T., Gomes, C., Oliveira, R., Fernandes, S., *et al.* (2015). New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(3), 235-242.
- Crisafuli, F., Ramos, E., Rocha, M. (2014). Characterizing the interaction between DNA and RedGel fluorescent stain. *Eur Biophys J*, 44(10), 1-7.. doi: 10.1007/s00249-014-0995-4
- EcuRed. (2013, 21 de Mayo 2015). Vectores biológicos. Retrieved 21 de mayo, 2015, from http://www.ecured.cu/index.php/Vectores_Bi%C3%B3logicos
- Eiras, D. P., Kirkman, L. A., y Murray, H. W. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 7(1), 52–62. doi:10.1007/s40506-015-0038-4.
- Goldsmith, R., y Heyneman, D. (1995). *Parasitología y medicina tropical* (M. moderno Ed.). México.
- Hernandez-Ruiz, J., y Becker, I. (2006). [CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis]. *Salud Publica Mex*, 48(5), 430-439.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., . . . Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*, 27(1), 37-58.
- Martinez, Y., y Marzullo, L. (2003) Eficacia del hisopo y cytobrush para obtener células anormales en los frotis endocervicales y su correlación histopatológica. *Bol Med de Post*, 14(1), 1-9.
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J., y Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*, 76(2), 532-541. doi: 10.1128/IAI.01388-07
- OMS. (2015). Leishmaniasis. Recuperado el 18 de Marzo, 2015, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Rodak, F. (2004) *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. (M. Panamericana Ed. 2a. ed.). Buenos Aires, Argentina.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (M. Panamericana Ed. 3a. ed.). Queretaro, México.
- Sacks, D., y Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2(11), 845-858. doi: 10.1038/nri933
- Salud, Organización Panamericana de la. (2013). Leishmaniasis. Informe de epidemiología de las américas. Retrieved from Organización Panamericana de la Salud website:

- http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docmanytask=doc_view&Itemid=270&gid=27081&lang=es
- Secretaría de Salud (2015) Boletín epidemiológico. Sistema nacional de vigilancia. Recuperado el 6 de mayo, 2015 de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem53.pdf>
- Secretaría de Salud (2015) Boletín epidemiológico. Sistema nacional de vigilancia. Recuperado el 2 de julio, 2015 de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem24.pdf>
- Scalibor. (2015, 17 de Enero 2015). Leishmaniosis. Biología del flebótomo. 2a. Retrieved 18 de Marzo, 2015, from <http://www.scalibor.com.ar/leishmaniosis/flebotomo.asp>
- Simpson, L. (1979). Isolation of maxicircle component of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(4), 1585-1588.
- Simpson, L., Simpson, A. M., Kidane, G., Livingston, L., y Spithill, T. W. (1980). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am J Trop Med Hyg*, 29(5 Suppl), 1053-1063.
- Somma, M., y Querci, M. (2013). Reacción en cadena de la polimerasa. 32. Retrieved from Organismos genéticamente modificados, Europa GU. website: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n6.pdf>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa y de la PCR en tiempo real. *Invest en discap*, 2(2) 70-78.
- Tay, J. (2010). *Microbiología y parasitología médicas* (M. Editores Ed. Tercera ed.). México.
- Uribarren, T. (2015) Leishmaniosis. Recuperado el 19 de octubre, 2015, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- Valencia, B. M., Miller, D., Witzig, R. S., Boggild, A. K., y Llanos-Cuentas, A. (2013). Novel Low-Cost ThermoTherapy for Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2196. doi:10.1371/journal.pntd.0002196.

Anexos

Material biológico.

- Cultivo de *Leishmania mexicana* proporcionado por la Dra. Norma del Carmen Galindo Sevilla del Instituto Nacional de Perinatología.
- 10 Ratones *Mus musculus* de la cepa BALB/c, de 4 semanas de edad, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Perinatología.
- *Primers* usados:
 - JW11
 - 5'-CCTATTTTACACCAACCCCGAGT-3'
 - JW12
 - 5'-GGGTAGGGGCGTTC·TGCGAAA-3'

Materiales y equipo.

- Agarosa ultra pura.
- Azul de tripano.
- Balanza analítica.
- Solución amortiguadora de carga *Blue/Orange loading Dye 6x*.
- Solución amortiguadora de corrimiento TAE 1x.
- Solución amortiguadora TAE 1x.
- Cámara de electroforesis.
- Fotodocumentador *Alphalmager® HP*
- Fuente de poder.
- *GelRed™*.
- H₂O grado biología molecular.
- Hemocitómetro.
- Horno de microondas.
- Incubadora.
- Kit de extracción *Purelink® Genomic DNA Mini Kit*
- Marcador de peso molecular *50 bp DNA ladder*.
- Matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- Micro centrifuga refrigerada *ependorf® 5810R*.
- Micro pipetas de 1, 10, 200 y 1000 µL.
- PBS 1x pH=7.1.
- *Rotor-Gene® Sybr® Green PCR kit*

- Taq PCR Master Mix Kit.
- Termociclador *Mastercycler gradient*® de la marca *eppendorf*®.
- Termociclador *Rotor-Gene*® Q de la marca *Qiagen*®.
- Tubos *eppendorf*® de 200 µL, 1.5 mL y 2 mL.

Protocolo de viabilidad.

El azul tripano es un compuesto ampliamente usado para ensayos de viabilidad celular como colorante supra vital debido a que únicamente tiñe a las células cuya membrana ha sufrido alteraciones de carácter estructural como la perforación ocasionada por la muerte de la célula.

1. Colocar en un tubo para centrifuga de 1.5 mL *eppendorf*®
 - a. 990 µL de PBS 1x + 0.1% Glucosa
 - b. 10 µL de cultivo de parásitos
2. En un tubo para PCR de 200 µL
 - a. Agregar 90 µL del colorante azul tripano
 - b. Homogeneizar y agregar 10 µL del diluido de parásitos 1:100
3. Homogeneizar el contenido del tubo para PCR de 200 µL.
4. Tomar 10 µL de la mezcla 1:10 y colocarlo en la cámara del hemocitómetro.
5. Colocar el hemocitómetro en la platina y observar con el objetivo de 10x la retícula mayor.
6. Dejar que las células se asienten por 1 minuto.
7. Realizar el conteo en los cuadros primarios de la siguiente manera:
 - a. Contar en los cuatro cuadros primarios periféricos.
 - b. Contar células transparentes (vivas).
 - c. Contar células azules (muertas).
8. Determinar viabilidad celular con la siguiente ecuación.

$$Viabilidad\ celular = \frac{Células\ vivas}{(Células\ vivas + células\ muertas)} \times 100$$

Protocolo para determinar la concentración de parásitos por mL.

1. Con el valor obtenido de células vivas, se realizan los cálculos y aplicando factores de corrección se llega a la concentración de parásitos en el volumen agregado en el hemocitómetro, usado en el punto anterior.

$$Concentración\ de\ dilución\ (2) = \frac{Número\ de\ células \times 10,000}{Cuadros\ contados \times Dilución}$$

Para una dilución 1:10. Dilución = 0.1

Para una dilución 1:100. Dilución = 0.01

2. Llegar a la concentración inicial de parásitos que se encuentran en el cultivo original.

$$\text{Concentración de dilución (1)} = \frac{\text{Concentración de dilución (2)}}{\text{Dilución}}$$

$$\text{Concentración del cultivo} = \frac{\text{Concentración de dilución (1)}}{\text{Dilución}}$$

Protocolo de preparación del inóculo.

Con los datos obtenidos de la concentración de parásitos que tiene el cultivo celular, se realizan las siguientes acciones.

1. Homogeneizar el cultivo celular.
2. Tomar 2 mL de cultivo con parásitos.
3. Lavado:
 - a. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
 - b. Decantar el sobrenadante
 - c. Resuspender el pellet de parásitos en el mismo volumen de PBS 1x + 0.1% Glucosa.
4. Hacer dos lavados más.
5. Conociendo la concentración del cultivo, hacer diluciones para alcanzar una concentración similar a 10^8 parásitos/mL en tubos *ependorf*® de 1.5 mL.
6. Homogeneizar y absorber 10 μ L del diluido con una jeringa de 1mL.

Protocolo de inoculación en el ratón.

Inmovilización del ratón:

1. Introducir la mano a la jaula y tomar al ratón de la cola.
2. Colocarlo en una superficie rugosa para permitir que se estire.
3. Levantar la cola y sujetarla con la palma de la mano y con el dedo meñique.
4. Tomar la mayor cantidad de piel de la nuca con los dedos índice y pulgar.

Asepsia del área de inoculación:

1. Tomar una torunda de algodón.
2. Humedecerla con alcohol etílico.
3. Limpiar el cojinete plantar del ratón de lo distal a lo proximal.
4. Esperar a que el alcohol etílico volatilice.

Inoculación del parásito:

1. Con una jeringa de 1 mL, homogeneizar la suspensión de parásitos.
2. Tomar 10 μL de la suspensión de concentración 10^8 parásitos/mL.
3. Sujetar su pata derecha y en el cojinete plantar administrar 2 μL de la suspensión parasitaria de forma subcutánea.

Protocolo de preparación del DTT a 1M

Para preparar 1 mL de una solución acuosa de DTT a concentración 1M

$$\frac{100 \text{ gRA}}{98 \text{ gRP}} \times \frac{154.25 \text{ gRP}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = 0.15739 \text{ g de DTT.}$$

1. Agregar 1 mL a un tubo *ependorf*® de 1.5 mL
2. Pesar 0.15736 g de DTT.
3. Disolver en el tubo por agitación.
4. Conservar protegido de la luz a 4°C.

Protocolo de extracción de DNA con *Purelink*® *Genomic DNA*

Mini Kit.

1. Preparación de la digestión
 - a. Agregar 180 μL de solución amortiguadora de digestión.
 - b. Agregar 20 μL de proteinasa K
 - c. Sólo para muestras de pelo, agregar 20 μL de DTT 1M
 - d. Agitar con vortex para homogeneizar los componentes.
2. Incubar por 1 hora a 55°C, agitando para homogeneizar cada 15 minutos.
3. Agregar 20 μL de RNasa A y agitar.
4. Incubar 2 minutos.
5. Preparación de la lisis de la muestra.
 - a. Agregar 200 μL de solución amortiguadora de lisis.
 - b. Agregar 200 μL de etanol absoluto, grado biología molecular.
 - c. Agitar por 5 segundos.
6. Tomar máximo 700 μL del lisado.
7. Colocarlo en una columna de sílice.
8. Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos.
9. Cambiar el tubo colector.
10. Agregar 500 μL de solución amortiguadora de lavado 1.
11. Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos.
12. Cambiar tubo colector.

13. Agregar 500 μL de solución amortiguadora de lavado 2.
14. Centrifugar a 12000 por 6 minutos.
15. Reemplazar tubo colector por un tubo de 1.5 mL *ependorf*®.
16. Agregar 50 μL de solución amortiguadora de elusión.
17. Centrifugar a 12000 rpm durante 8 minutos.
18. Desechar columna de sílice.
19. Conservar el DNA a -20°C .

Protocolo de PCR punto final.

Preparación de la mezcla de reacción con el kit *Taq PCR Master Mix*®.

Reactivo	Volumen
Taq PCR Master Mix kit®.	12.5 μL
Primer sentido.	1 μL
Primer anti sentido.	1 μL
Agua libre de DNAsas.	8.5 μL
Muestra de DNA.	2 μL
Volumen final: 25 μL	

1. Sacar los reactivos del congelador y esperar a que se atemperen.
2. Tomar y rotular tubos necesarios *ependorf*® para PCR de 200 μL .
3. Agitar con vortex el reactivo *Taq PCR Master Mix kit*®.
4. Preparación de la mezcla de reacción.
 - a. Tomar *Taq PCR Master Mix Kit*® en cantidades equivalentes a los sistemas que se van a preparar, dentro de un tubo de 1.5 mL *ependorf*®, rotulado como Mezcla de reacción.
 - b. Agitar con vortex rápidamente los *primers*.
 - c. Agregar las cantidades proporcionales de Primer sentido y antisentido.
 - d. Agregar cantidad proporcional de agua libre de DNAsas.
 - e. Mezclar perfectamente con vortex.
5. Colocar 23 μL de la mezcla de reacción en cada tubo para PCR.
6. Sacar del congelador las muestras de DNA.
7. Esperar a que se atemperen las muestras.
8. Agregar 2 μL del DNA.

Para el control negativo, en lugar de DNA, se usan 2 μL de agua libre de DNAsas.

Para el control positivo se usan 2 μL de DNA de *L. mexicana* cepa MHOM/BZ/61/M379 proveniente del cultivo celular.

Protocolo de amplificación en PCR punto final.

Condiciones de amplificación a 30 ciclos utilizando el equipo *Mastercycler gradient*® de la marca *ependorf*®.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación de la Taq Polimerasa	95°C	5 minutos
Desnaturalización	92°C	10 segundos
Alineación	52°C	20 segundos
Elongación	72°C	40 segundos

Protocolo de electroforesis.

Procedimiento para la preparación de los geles de agarosa al 1% para integridad del DNA.

1. Pesar 0.4 g de agarosa libre de impurezas.
2. Colocarla dentro de un matraz de Erlenmeyer de 125 mL.
3. En una probeta de 100 mL, medir 40 mL de TAE 1x.
4. Agregarlo al matraz Erlenmeyer que contiene la agarosa.
5. Dejar que la agarosa se hidrate por 1 minuto agitándola suavemente.
6. Colocar el molde y el peine para marcar los pozos del gel.
7. Llevar la mezcla a ebullición hasta que la mezcla sea transparente y no existan grumos en ella.
8. Agregar 4 µL de *GelRed*™ y homogeneizar en la agarosa agitándola suavemente.
9. Mientras aún sigue caliente, verter la mezcla en el molde y esperar a que se gelifique.
10. Una vez gelatinizada, retirar peine y bordes del molde.
11. Colocar el gel y el molde dentro de la cámara con TAE 1x.
12. Realizar pre corrimiento a 50 V durante 10 minutos.
13. Hacer una mezcla de 1 µL de solución amortiguadora de carga *Blue/Orange loading Dye* 6x con 5 µL de DNA.
14. Apagar la fuente de poder.
15. Cargar la mezcla de cada muestra: 1 ratón sano; 6 ratones infectados.
16. Someter el gel a un campo eléctrico de 55 V por 30 minutos.
17. Sacar el gel y colocarlo dentro del fotodocumentador.
18. Encender la lámpara UV y tomar la foto.

Procedimiento para la preparación de los geles de agarosa al 3% para amplicones.

1. Pesar 1.2 g de agarosa libre de impurezas.
2. Colocarla dentro de un matraz de Erlenmeyer de 125 mL.
3. En una probeta de 100 mL, medir 40 mL de TAE 1x.

4. Agregarlo al matraz Erlenmeyer que contiene la agarosa.
5. Dejar que la agarosa se hidrate por 1 minuto agitándola suavemente.
6. Colocar el molde y el peine para marcar los pozos del gel.
7. Llevar la mezcla a ebullición hasta que la mezcla sea transparente y no existan grumos en ella.
8. Agregar 4 μL de *GelRed*TM y homogeneizar en la agarosa agitándola suavemente.
9. Mientras aún sigue caliente, verter la mezcla en el molde y esperar a que se gelifique.
10. Una vez gelatinizada, retirar peine y bordes del molde.
11. Colocar el gel y el molde dentro de la cámara con TAE 1x.
12. Realizar pre corrimiento a 50 V durante 30 minutos.
13. Hacer una mezcla de 1 μL de solución amortiguadora de carga *Blue/Orange loading Dye 6x* con 5 μL de amplicón.
14. Apagar la fuente de poder.
15. Cargar la mezcla del control negativo.
16. Cargar la mezcla de cada muestra: 1 ratón sano; 6 ratones infectados.
17. Cargar la mezcla del control positivo.
18. Cargar 1 μL de marcador de pares base *50 bp DNA ladder* diluido 1:10.
19. Someter el gel a un campo eléctrico de 55 V por 2 horas 15 minutos.
20. Sacar el gel y colocarlo dentro del fotodocumentador.
21. Encender la lámpara UV y tomar la foto.

Protocolo de PCR tiempo real.

Preparación de la mezcla de reacción con el kit *Rotor-Gene SYBR Green PCR kit*.

Reactivo	Volumen
<i>Rotor-Gene</i> [®] <i>Sybr</i> [®] <i>Green PCR kit</i>	12.5 μL
Primer sentido.	1 μL
Primer antisentido.	1 μL
Agua libre de DNAsas.	5.5 μL
Muestra de DNA.	5 μL
Volumen final: 25 μL	

1. Sacar los reactivos del congelador y esperar a que se atemperen.
2. Tomar y rotular tubos necesarios *eppendorf*[®] para PCR de 200 μL .
3. Agitar con vortex el reactivo *Rotor-Gene*[®] *SYBR*[®] *Green PCR kit*.
4. Preparación de la mezcla de reacción.
 - a. Tomar *Rotor-Gene*[®] *SYBR*[®] *Green PCR kit* en cantidades equivalentes a los sistemas que se van a preparar, dentro de un tubo de 1.5 mL *eppendorf*[®], rotulado como Mezcla de reacción.
 - b. Agitar con vortex rápidamente los *primers*.

- c. Agregar las cantidades proporcionales de primer sentido y antisentido.
 - d. Agregar cantidad proporcional de agua libre de DNAsas.
 - e. Mezclar perfectamente con vortex.
5. Colocar 23 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo para PCR.
 6. Sacar del congelador las muestras de DNA.
 7. Esperar a que se atemperen las muestras.
 8. Agregar 2 μ L del DNA.

Para el control negativo, en lugar de DNA, se usan 2 μ L de agua libre de DNAsas.

Para el control positivo se usan 2 μ L de DNA de *L. mexicana* cepa MHOM/BZ/61/M379 proveniente del cultivo celular.

Protocolo de amplificación en PCR tiempo real.

Condiciones de amplificación utilizando el equipo *Rotor-Gene*® Q de la marca *Qiagen*®.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación de la enzima	95°C	5 minutos
Desnaturalización	95°C	5 segundos
Alineación	52°C	10 segundos
Elongación	72°C	20 segundos