



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Determinación de la presencia de *Leishmania* sp. en mapaches y coatíes
del parque ecológico La Venta, Tabasco.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
CITLALLI HERNÁNDEZ MIRÓN

ASESOR
M. en C. Raquel María Del Refugio Tapia Romero

CO-ASESOR
Dra. Norma Del Carmen Galindo Sevilla

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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.**

Determinación de la presencia de *Leishmania sp.* en mapaches y coatíes del parque ecológico La Venta, Tabasco.

Que presenta la pasante Citlalli Hernández Mirón

Con número de cuenta: 310107882 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 03 de Septiembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

NOMBRE

FIRMA

PRESIDENTE

Dr. Salvador Fonseca Coronado

VOCAL

Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo

SECRETARIO

M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero

1er. SUPLENTE

M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles

2do. SUPLENTE

Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana

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

“Es cierto que el mundo está colmado de peligros, y que hay en él muchos sitios lóbregos,
pero hay también muchas cosas hermosas, y aunque en todas partes el amor está unido
hoy a la aflicción, no por eso es menos poderoso”

J. R. R Tolkien

Agradecimientos

A la UNAM, la máxima casa de estudios.

Al Hospital Infantil de México y al Instituto Nacional de Perinatología.

Dedicatorias

A usted: infinito, interminable. Por absolutamente todo.

A Teresa: la raíz, la flor, el lazo que une, el origen de todo lo que hay y lo que existe.

A Pedro por lo que me has dado, por haber estado ahí a tu manera y todo lo que he aprendido por ti.

A Isaura: la más mágica presencia de todas, por ser un fuerte pilar en mi vida y compartir tanto conmigo aun en las malas. A Gabriel y Ailin: dos lindos ángeles que me hacen ver de nuevo lo que realmente importa en esta vida.

A Noé, por mostrarme tantas cosas de la vida y las pláticas profundas que hemos tenido.

A Karen, mi compañera de locuras y risas, con quien puedo ser quien realmente soy.

A la Maestra Raquel, la Doctora Galindo y la Doctora Miroslava, por haber tenido tanta paciencia, mostrar comprensión, haberme enseñado tanto y por las oportunidades que me ofrecieron.

A Diana y Marissa, las más hermosas luces con las que Dios me bendijo en la oscuridad del camino.

A Ramiro: la más afortunada casualidad, por tu interminable paciencia y por ser mi compañero a través de una larga distancia.

A Daniel, por lo que hemos pasado juntos, permitirme seguir en tu vida y admirarte cada vez más con todo lo que has pasado y has hecho.

A Jorge por compartir tantas cosas conmigo en tan poco tiempo, ser una ventana al mundo y a la vez un espejo.

A todos *ellos*.

A ti.

Índice

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
3. Marco teórico.....	11
3.1. Agente etiológico.....	11
3.1.1. Taxonomía.....	11
3.1.2. Estados.....	12
3.1.2.1. Amastigote.....	12
3.1.2.2. Promastigote.....	12
3.2. Ciclo de vida del agente etiológico.....	13
3.2.1. El vector.....	13
3.2.2. Ciclo biológico.....	15
3.2.3. Reservorios.....	17
3.2.3.1. Coatí.....	20
3.2.3.1.1. Clasificación.....	20
3.2.3.1.2. Caracteres externos.....	20
3.2.3.1.3. Comportamiento.....	21
3.2.3.1.4. Hábitat.....	21
3.2.3.1.5. Distribución.....	21
3.2.3.2. Mapache.....	22
3.2.3.3. Clasificación.....	22
3.2.3.4. Caracteres externos.....	22
3.2.3.5. Comportamiento.....	22
3.2.3.6. Hábitat.....	23
3.3. Leishmaniosis.....	23
3.3.1. Leishmaniosis cutánea.....	23
3.3.1.1. Leishmaniosis cutánea localizada.....	23
3.3.1.2. Leishmaniosis cutánea difusa.....	24
3.3.2. Leishmaniosis mucocutánea.....	25
3.3.3. Leishmaniosis visceral.....	26
3.4. Diagnóstico.....	27
3.4.1. Frotis de la lesión.....	27
3.4.2. Biopsia.....	28
3.4.3. Cultivos e inoculaciones.....	28
3.4.4. Pruebas serológicas.....	28
3.4.5. PCR.....	29
3.4.6. Diagnóstico de infección por <i>Leishmania</i> en pelo.....	29
3.5. Tratamiento.....	31
3.6. Profilaxis.....	31
3.7. Epidemiología.....	31
3.7.1. Leishmaniosis en México.....	32
3.7.1.1. Parque La Venta, Tabasco.....	33
3.8. Factores de riesgo.....	34
3.8.1. Urbanización.....	34
3.8.2. Condiciones socioeconómicas.....	34
3.8.3. Movilidad de poblaciones.....	34
3.8.4. Cambio climático.....	34
3.9. Organización genómica de <i>Leishmania</i>	35
3.10. PCR.....	35
4. Justificación.....	38
5. Objetivos.....	39

5.1. General.....	39
5.2. Específicos.....	39
6. Metodología.....	40
6.1. Material biológico.....	40
6.2. Procesamiento de las muestras problema.....	41
6.2.1. Extracción y purificación de DNA de muestras de sangre.....	41
6.2.2. Extracción de ADN de pelo mediante uso de QIAamp DNA Blood mini kit 250.....	42
6.3. Amplificación por PCR punto final del fragmento ADNk de <i>Leishmania sp.</i>	42
6.4. Amplificación por PCR punto final del fragmento β -globina humana.....	43
6.5. Análisis del producto de amplificación por PCR.....	44
6.6. Datos de la determinación de anticuerpos anti-Leishmania.....	45
6.7. Análisis estadístico.....	45
7. Resultados obtenidos.....	46
7.1. Estandarización de la extracción de ADN de muestras de pelo.....	46
7.1.1. Comparación de la técnica de fenol cloroformo y el QIAamp DNA Blood mini kit 250 de QIAGEN para la extracción de ADN de muestras de pelo.....	46
7.1.1.1. Fase de lisis para el QIAamp DNA Blood mini kit 250 de QIAGEN.....	46
7.1.1.2. Fase de lisis para la técnica de extracción de fenol-cloroformo.....	47
7.1.1.3. Incremento de controles a la fase de lisis del QIAamp DNA Blood mini kit 250.....	49
7.2. Amplificación de un fragmento de la beta-globina.....	51
7.3. Detección de la presencia de <i>Leishmania sp.</i> en muestras biológicas de mapaches y coatíes del parque ecológico La Venta, Tabasco.....	53
8. Análisis de resultados.....	63
9. Conclusiones.....	68
10. Bibliografía.....	69
11. Anexo 1.....	76

1. Resumen

La leishmaniosis es una parasitosis de impacto a nivel mundial, ya que según estimaciones recientes, las leishmaniosis afectan a aproximadamente 12 millones de personas en todo el mundo, con un incremento anual de 2 millones de personas (OMS, 2018). En la transmisión de ésta enfermedad participan numerosas especies animales domésticas y silvestres, el hecho de que diversas especies animales puedan estar implicadas en la transmisión de la enfermedad, hace necesario estudiar la presencia del parásito en los posibles hospedadores para poder efectuar estrategias de control efectivas.

El estado de la República Mexicana que ha presentado el mayor número de reportes de leishmaniasis es Tabasco (Carrada *et al.*, 2014), en donde existen diversos espacios turísticos en donde los visitantes locales y foráneos pueden tener interacciones cercanas con el vector así como con posibles hospedadores de *Leishmania sp.*

La existencia de una parasitosis por *Leishmania sp.* fue estudiada en una población de 30 coatíes (*Nasua narica*) y 9 mapaches (*Procyon lotor*) que se encuentran en semi-cautiverio en el parque-museo La Venta, Tabasco, donde la leishmaniasis cutánea es una enfermedad endémica. De las muestras recolectadas de pelo y sangre de los prociénidos, fue extraído el ADN para amplificar una región de 120 pb, mediante PCR punto final: El 46.66% de los coatíes y el 22.22% de los mapaches presentaron resultados positivos a la amplificación del fragmento del ADN de interés.

Los resultados del presente trabajo fueron contrastados con los hallazgos de un estudio previo en donde se realizó la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania*: todos los mapaches con resultados positivos en PCR fueron seropositivos, mientras que ninguno de los coatíes con resultado positivo en PCR tuvieron resultados positivos en serología.

2. Introducción

El ecoturismo, la exploración y un sinnúmero de actividades variadas han aumentado el contacto entre las poblaciones humanas, el ambiente y la fauna silvestre, lo cual representa un riesgo potencial para la adquisición de enfermedades zoonóticas, incluidas las de tipo parasitario como la leishmaniosis, enfermedad causada por protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*; "transmitida por insectos flebótomos y, cuyo amplio rango de manifestaciones clínicas dependen de la especie de *Leishmania*, el grado de virulencia y el estado inmunológico del hospedador" (Gupta *et. al*, 2013, p. 156).

La leishmaniosis se contempla dentro de las enfermedades parasitarias más importantes ya que, según estimaciones recientes, afecta aproximadamente a 12 millones de personas en todo el mundo (OMS, 2018). En México, la leishmaniosis es considerada como una enfermedad desatendida o rezagada que afecta a los sectores más vulnerables y marginales de la sociedad.

En nuestro país existen diversos sitios enfocados al turismo ecológico, entre ellos el parque ecológico La Venta, ubicado en el estado de Tabasco, mismo que se incluye en las 13 entidades federativas entre las que se distribuye la población en riesgo de adquisición de leishmaniosis (CENAPRECE, 2015, p. 7). Este parque abrió sus puertas al público el 4 de marzo de 1958 con el objetivo de proteger, investigar y exhibir las piezas arqueológicas de la cultura olmeca así como los animales silvestres que ahí hallan resguardo. En el parque La Venta se encuentran numerosas especies que en otros países se han confirmado como hospedadores de *Leishmania*: entre ellos, jaguar (*Panthera onca*) confirmado como hospedador de *L. infantum* en Brasil (Dahrough *et al.*, 2010), mono araña (*Ateles paniscus*) confirmado como hospedador de *L. amazonensis* en Brasil (Lima *et al.*, 2012), mapache (*Procyon lotor*) (Roque y Jansen, 2014) y coatí (*Nasua nasua*) confirmado como hospedador de *L. Shawi* en Brasil (Lainson *et al.*, 1989). Es importante mencionar que la especie de coatí presente en este sitio es *Nasua narica*. Tanto mapaches como coatíes se encuentran con acceso libre a cualquier área, teniendo un contacto más cercano con los turistas que frecuentan el parque.

El parque ecológico La Venta, a diferencia de muchos sitios naturales turísticos, se encuentra en el corazón urbano de la capital del Estado de Tabasco. Es un sitio en el que piezas arqueológicas monumentales, originales, de gran importancia para la cultura Olmeca, se exhiben en su nicho ecológico original, rodeadas de árboles ancestrales y

flora selvática que se han preservado con toda la intención de ofrecer al visitante el mayor acercamiento posible a las condiciones de flora y fauna en que estas culturas se desarrollaron. Las condiciones de humedad y temperatura del parque ecológico son propicias para el desarrollo de vectores transmisores de leishmaniosis, y aun cuando cuentan con programas de fumigación para el control de vectores, en la leishmaniosis, se han descrito también otras formas de transmisión de esta parasitosis como transmisión vertical, particularmente transmisión transplacentaria y, a través del contacto con sangre de un organismo infectado, como puede ser a través de las heridas ocasionadas durante peleas o cacerías intra- o entre- las especies que conviven en el parque.

Cabe mencionar que existen escasos estudios en lo relativo al tema de la fauna del parque La Venta, Tabasco (Isaak-Delgado *et al.*, 2013; Rovirosa *et al.*, 2012). Por tal motivo resulta de suma importancia determinar la prevalencia del protozooario *Leishmania* en las especies silvestres que habitan el parque. Tal evaluación permitiría identificar no sólo la presencia del parásito en la fauna silvestre del parque, sino también la existencia de un riesgo de adquisición de la parasitosis al que se expone la población local y foránea al visitarlo y llamaría la atención a intensificar los programas de fumigación para el control de vectores en el parque museo.

En un estudio previo (aún en proceso), se efectuó la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante la técnica de ELISA en muestras de sangre de mapaches y de coatíes habitantes del parque La Venta, Tabasco. Sin embargo hay que recordar que la presencia de dichos anticuerpos no confirma la existencia de una parasitosis activa en el momento de la captura de los mamíferos estudiados. Por esta situación, se decide buscar la presencia del parásito en muestras biológicas de dichos mamíferos, a través de la identificación de ADN de *Leishmania sp.* por medio de la técnica de PCR punto final.

Se ha seleccionado como una de las muestras biológicas el pelo ya que algunos estudios han demostrado que a través de su análisis se ha podido confirmar la infección por *Leishmania sp.* en animales infectados natural (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013) y experimentalmente (Iniesta *et al.*, 2013). Este enfoque, reciente y novedoso conlleva un gran valor diagnóstico ya que ha permitido la detección del parásito inclusive cuando la muestra han sido expuesta a altas concentraciones de sales, altas temperaturas e incluso a radiación (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013, p. 707), condiciones que usualmente generan interferencias.

3. Marco teórico

3.1. Agente etiológico

3.1.1 Taxonomía

La taxonomía de *Leishmania* sp. se basa en el uso de múltiples características, las más aceptadas son: la evaluación por isoenzimas (zimodemas), por anticuerpos monoclonales específicos (serodermas), la hibridación del ADN del cinetoplasto (esquizodemas) y “el comportamiento biológico de *Leishmania* sp. principalmente en el intestino del vector” (Apt, 2013, p. 298). La clasificación taxonómica según lo establecido por Levine *et al.* (1980) es:

Reino: PROTISTA (Haeckel, 1866)

Subreino: PROTOZOA (Goldfuss, 1817)

Filo: SARCOMASTIGOPHORA (Honigberg-Balamuth, 1963)

Subfilo: MASTIGOPHORA (Deising, 1866)

Clase: ZOOMASTIGOPHOREA (Calkins, 1909)

Orden: KINETOPLASTIDA (Honigberg, 1963; modificado por Vickerman, 1976)

Suborden: TRYPANOSOMATINA (Kent, 1880)

Familia: TRYPANOSOMATIDAE (Doeflein, 1901)

Género: *Leishmania* (Ross, 1903)

3.1.2 Estados de desarrollo

El parásito *Leishmania* presenta dos estados de desarrollo durante su ciclo de vida, el cual “transcurre en el intestino de los insectos vectores y en los tejidos de un hospedador vertebrado” (Apt, 2013, p. 298).

3.1.2.1 Amastigote

Es la forma intracelular en las células del sistema fagocítico mononuclear en el hospedador mamífero (figura 1); “tiene forma ovoidea o esférica, mide de 2 a 5 μm de diámetro, presenta membrana, citoplasma, núcleo esférico y compacto con cromatina granulosa, cinetoplasto de forma bacilar y rizoplasto que se convertirá en el flagelo en el siguiente estado de desarrollo” (Tay *et al.*, 2002, p. 324).

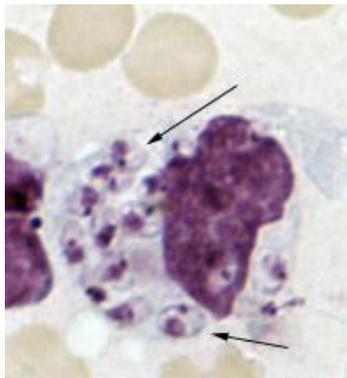


Figura 1. Amastigotes de *Leishmania tropica* en un extendido de biopsia de úlcera en piel. Se observan los amastigotes siendo liberados de un macrófago. Tomado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

2.1.2.2 Promastigote

“Es fusiforme, de 16 a 18 μm de longitud, su núcleo es central y el blefaroplasto está en posición muy anterior al núcleo, de donde emerge un flagelo que sale del parásito en la porción anterior sin formar membrana ondulante (figura 2 y 3); esta fase se encuentra en el insecto vector” (Tay *et al.*, 2002, p. 324).

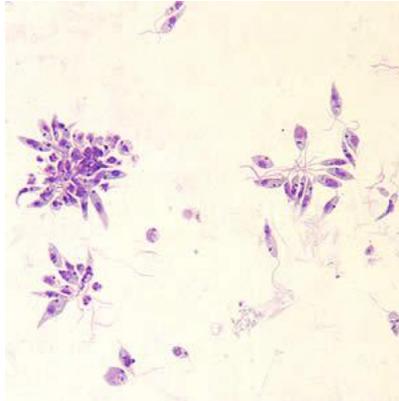


Figura 2. **Promastigotes de *Leishmania sp.* obtenidos de cultivo.** Se observan numerosos promastigotes teñidos con tinción de Giemsa. Tomado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

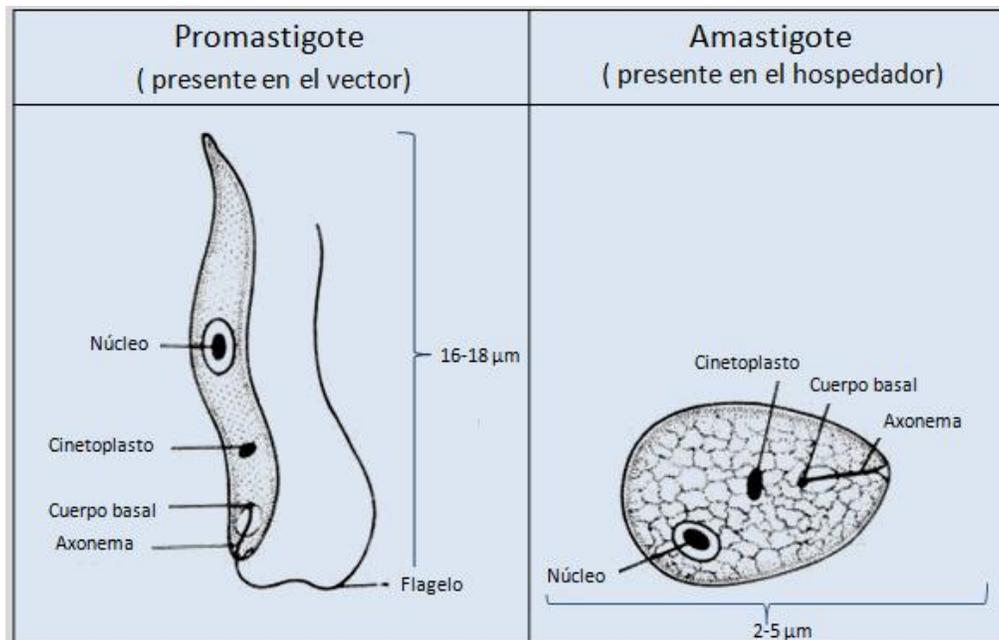


Figura 3. **Esquema de los estados Amastigote y promastigote de *Leishmania sp.*** Se observan las diversas estructuras presentes en los estados de desarrollo del parásito. Extraído y modificado de Acharya, 2013.

3.2 Ciclo de vida del agente etiológico

Para que este protozoo lleve a cabo su ciclo de vida requiere de insectos vectores y mamíferos hospedadores.

3.2.1 El vector

Los vectores del parásito, es decir los flebótomos, son insectos dípteros que pertenecen a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*.

De los cinco géneros de insectos flebotomíneos existentes, 88 especies son vectores potenciales pertenecientes solo a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya* (Apt, 2013, p. 299).

A continuación se citan algunas de las características del vector, las cuales pueden apreciarse en la figura 4:

- Presenta metamorfosis completa, es decir que pasan por las fases de huevo, larva, pupa y adulto.
- Los adultos miden menos de 5 mm de longitud, tienen patas largas, alas ampliamente lanceoladas (sin venas cruzadas más allá de la base) y tórax giboso.
- Se reproducen en el suelo, áreas húmedas y sombreadas con la presencia de materia orgánica.
- Las hembras se alimentan de sangre de animales y de humanos para realizar la oviposición.
- Son de hábitats variados, desde selva húmeda a regiones muy áridas.
- Tienen actividad crepuscular y nocturna, pero pueden estar activos durante el día.
- Su vuelo es corto, silencioso y en pequeños saltos.

En México se reconocen como posibles responsables de la transmisión de la leishmaniosis a once especies, las cuales varían en importancia de acuerdo a la localización geográfica de las zonas endémicas, la mayoría de éstas se encuentran en zonas selváticas o bosques tropicales pero existen especies que están localizadas en regiones áridas o semi-desérticas.

Algunos transmisores asociados son: *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia anthophora*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia diabólica*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia ovallesi* , *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia longipalpis* (figura 4) y *Lutzomyia evansi* .

En América, el nombre común del insecto vector es: Mosca chiclera, la chiclera, papalotilla o palomilla.

(CENAPRECE, 2015, p.10).



Figura 4. **Ejemplar femenino de *Lutzomyia longipalpis***. Se observa al flebótomo ingiriendo sangre (Wilson, 2018), extraído de Vector Base.

3.2.2 Ciclo biológico de Leishmania

El ciclo de vida comienza cuando el flebótomo hembra “toma sangre para alimentarse e ingiere amastigotes presentes en un hospedero previamente infectado (puede ser un humano u otro mamífero, como un roedor o un cánido)” (González *et al.*, 2017, p. 38).

En el intestino del vector, el parásito inicia un proceso de maduración en el cual los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (Becker *et al.*, 2014, p. 86); ésta forma, que es una fase reproductiva, no infectante, se adosa en la membrana peritrófica en la pared del tubo digestivo del vector, donde se reproducen por fisión binaria. Estas formas se tornan infectantes (promastigotes metacíclicos), a través de una serie de

procesos bioquímicos (metacicloogénesis), que determinan la pérdida de la capacidad de adhesión al epitelio del intestino medio del flebótomo. Como resultado, las formas metacíclicas migran a la faringe y cavidad bucal del insecto, donde son inoculadas por el vector cuando pica a un hospedador” (Apt, 2013, p. 299). “Cuando esta mosca hembra infectada pica a un nuevo hospedero, inocula entre 10 y 100 promastigotes” (González *et al.*, 2017, p. 38).

El parásito es internalizado por las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador donde se transforma en su forma intracelular, es decir, en la forma de amastigote. Aparentemente, este proceso toma aproximadamente de 12 a 24 horas. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en el interior del macrófago generando la ruptura de la célula y la liberación del parásito. Los amastigotes liberados son internalizados en nuevos macrófagos y así el ciclo continúa (Kumar, 2013, p. 9).

Las moscas de arena tienen un ciclo de vida de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto: Las larvas emergen de los huevos entre los 4 y 20 días tras la ovoposición. El periodo de vida larval es muy variable entre las especies y depende de las condiciones ambientales como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. En condiciones favorables algunas especies pueden completar su desarrollo en menos de tres semanas, mientras que las de climas fríos se pueden tomar varios meses (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). La etapa de pupa dura 6-13 días antes de que emerja el estadio adulto cuya longevidad varía de especie a especie, y no hay un estudio completo donde se haya calculado una esperanza (longevidad) de vida de estos vectores (Killick-Kendrick 1978, p. 308; ECDPC, 2018). Young y Lawyer (1987) mencionan que la mayoría de las hembras de *Lutzomyia sp.* viven generalmente de 1 a 4 semanas (citado por Rebollar, 1995, p. 17).

Existen escasos reportes acerca de la prevalencia de *Leishmania sp.* en los vectores, en uno de ellos se determinó que de un total de ciento veinticinco insectos flebótomos pertenecientes al género *Phlebotomus* capturados en diversas regiones de Pakistán, el sesenta y cinco por ciento se encontraba infectado con el parásito (Durrani *et al.*, 2012, p. 63).

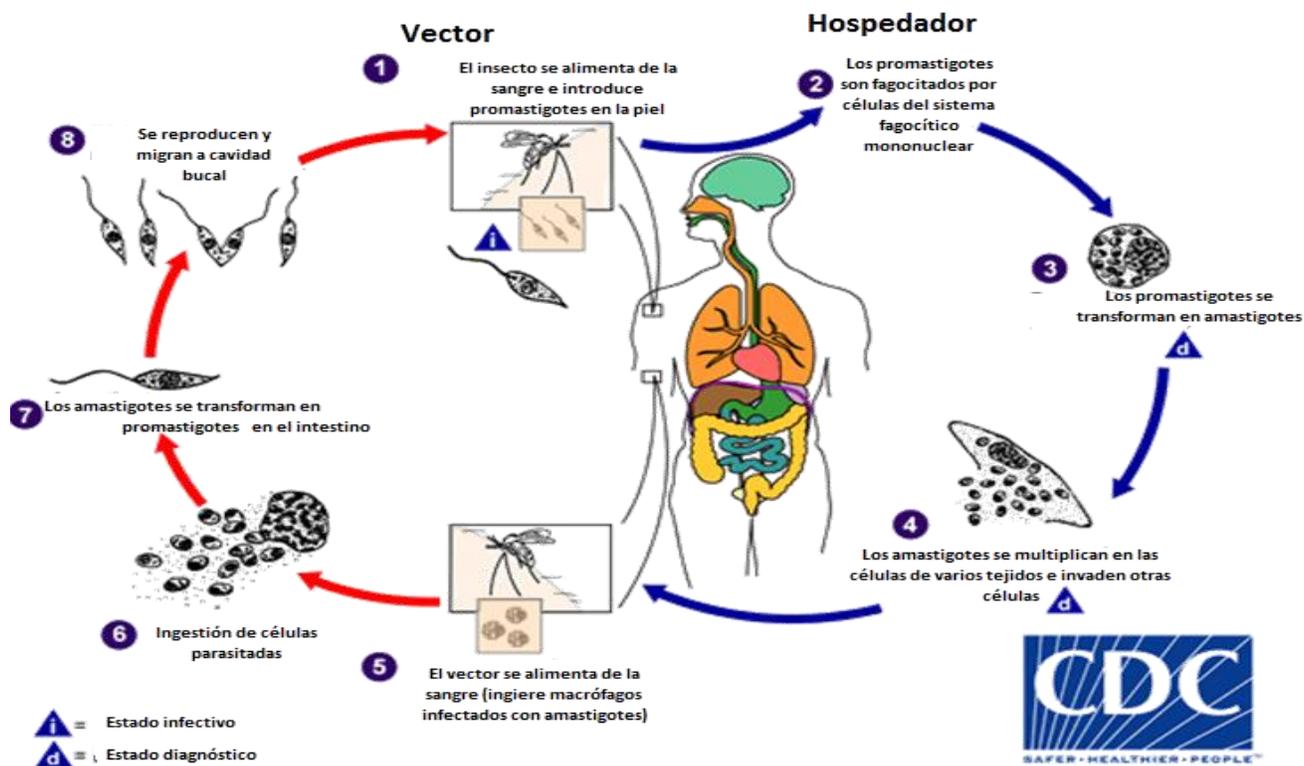


Figura 5. **Ciclo biológico de *Leishmania sp.*** Se ilustra la forma de transmisión de *Leishmania sp.* del vector hacia un organismo hospedador (en este caso humano) así como los estados de desarrollo del parásito existente en ambos organismos. Tomado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

3.2.3 Reservorios

El sistema ecológico en el que una especie de *Leishmania* se mantiene indefinidamente suele constar de una especie de flebótomos vectores, o un pequeño número de ellas, y de una o varias especies de reservorios vertebrados.

Los animales domésticos y selváticos infectados por *Leishmania sp.* pueden presentar signos evidentes de infección o no presentarlos. A menudo hay relativamente pocos amastigotes en la piel o las vísceras, y la respuesta del hospedador es mínima o indetectable. No obstante, algunos mamíferos, como el perro, que es reservorio de la leishmaniosis visceral por *L. infantum*, pueden morir a consecuencia de la infección.

La mera presencia de infección en una especie de mamíferos, aunque sea en numerosos individuos, no indica necesariamente que sea reservorio. Para incriminar formalmente un reservorio es necesario demostrar que la población de parásitos depende de ese mamífero en particular para su mantenimiento a largo plazo. Esto requiere amplios estudios ecológicos y toda conclusión extraída dependerá de la acumulación de pruebas basadas en los criterios siguientes:

- El reservorio es suficientemente abundante y longevo para proporcionarle a los flebótomos una fuente importante de alimento.
- Es necesario un contacto intenso entre el reservorio y los flebótomos.
- La proporción de organismos susceptibles de ser considerados reservorios que se infectan a lo largo de su vida suele ser considerable y puede superar el 20%, aunque la prevalencia puede variar mucho según la estación.
- El curso de la infección en el reservorio debe ser suficientemente prolongado, y la infección suficientemente no patógena para permitir que los parásitos sobrevivan a una estación sin transmisión.
- Los parásitos deben estar presentes en la piel o la sangre en número suficiente para que puedan pasar al flebótomo.

Los parásitos presentes en los reservorios deben ser los mismos que en el ser humano, por lo que es necesaria una identificación formal de los parásitos.

(OMS, 2010)

Existe una gran variedad de animales que han sido implicados como reservorios de las especies de *Leishmania* en América, pequeños mamíferos silvestres y cánidos domésticos son reservorios importantes. En las zonas de leishmaniosis visceral, el perro es un importante reservorio, a diferencia de las áreas endémicas de las otras variedades clínicas donde roedores, marsupiales y otros mamíferos son los principales reservorios. A continuación, se enlistan en la tabla 1, las especies que han sido identificadas como hospedadores o potenciales reservorios de *Leishmania*.

Tabla 1. Mamíferos hospedadores infectados por diferentes especies de *Leishmania*.

Order	Host species	<i>Leishmania</i> species	Infection pattern	Country	References	
Didelphimorphia	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. infantum</i>	Potential reservoir	CO, VE	Corredor et al., 1989; apud Quinnell and Courtenay, 2009	
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Grimaldi et al., 1991	
		<i>L. guyanensis</i>	Potential reservoir	BR; FG	Arias et al., 1981; Dedet et al., 1989	
	<i>D. albiventris</i>	<i>L. forattinii</i>	Parasite host	BR	IOCL 0067	
		<i>L. infantum</i>	Potential reservoir	BR	Sherlock et al., 1984; Sherlock, 1996	
		<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	Quaresma et al., 2011	
	<i>D. aurita</i>	<i>L. peruviana</i>	Potential reservoir	PE	Llanos-Cuentas et al., 1999	
		<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Carreira et al., 2012	
	<i>Philander opossum</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1981a	
	<i>Mammosa cinerea</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Arias et al., 1981	
	<i>Mammosa sp</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	BR	Brandão-Filho et al., 2003	
	<i>Micoreus paraguayanus</i>	<i>L. amazoensis</i>	Parasite host	BR	Quintal et al., 2011	
		<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	Quintal et al., 2011	
	<i>Gracilinanus agilis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	Quaresma et al., 2011	
	<i>Mamosops incanus</i>	<i>L. guyanensis</i>	Parasite host	BR	Quaresma et al., 2011	
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1981a	
	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	BR	Lima et al., 2013	
	Pilosa	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>L. guyanensis</i>	Potential reservoir	FG; BR	Gentile et al., 1981; Lainson et al., 1981a
			<i>L. shawi</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1989
		<i>C. hoffmanni</i>	<i>L. colombiensis</i>	Parasite host	PN	Kreutzer et al., 1991
<i>L. equatoriensis</i>			Parasite host	EC	Grimaldi et al., 1992	
<i>L. panamensis</i>			Parasite host	PN	apud Ashford, 2000	
<i>Bradypus tridactylus</i>		<i>L. shawi</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1989	
<i>Tamandua tetradactyla</i>		<i>L. guyanensis</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1981a	
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	EC	Mimori et al., 1989	
Cingulata		<i>Dasyopus novemcinctus</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Araújo et al., 2013
			<i>L. naiffi</i>	Potential reservoir	BR	Lainson and Shaw, 1989; Naiff et al., 1991
Rodentia		<i>P. semispinosus</i>	<i>L. guyanensis</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1979
			<i>L. panamensis</i>	Potential reservoir	CO	Travi et al., 2002
	<i>Thrichomys apereoides</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	CO	Travi et al., 2002	
		<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	Quaresma et al., 2011	
		<i>L. guyanensis</i>	Parasite host	BR	Quaresma et al., 2011	
	<i>T. laurentius</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Oliveira et al., 2005; Quaresma et al., 2011	
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Oliveira et al., 2005	
		<i>L. infantum</i>	Potential reservoir	BR	Roque et al., 2010	
	<i>T. inermis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Potential reservoir	BR	Roque et al., 2010	
		<i>L. naiffi</i>	Parasite host	BR	Cássia-Pires, unpublished data	
		<i>L. shawi</i>	Parasite host	BR	Cássia-Pires, unpublished data	
	<i>T. pachyurus</i>	<i>L. shawi</i>	Parasite host	BR	Cássia-Pires, unpublished data	
		<i>L. naiffi</i>	Parasite host	BR	Cássia-Pires, unpublished data	
	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Dantas-Torres and Brandao-Filho, 2006	
		<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	Peterson et al., 1988	
	<i>Rattus rattus</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR; VE	apud Quinnell and Courtenay, 2009	
		<i>L. braziliensis</i>	Potential reservoir	BR; VE	Vasconcelos et al., 1994; De Lima et al., 2002	
		<i>L. mexicana</i>	Parasite host	VE	De Lima et al., 2002	
	<i>Clyomys laticeps</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Cássia-Pires, unpublished data	
	<i>Dasyprocta azarae</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Cássia-Pires, unpublished data	
	<i>Dasyprocta sp.</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1981b	
	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Quaresma et al., 2011	
	<i>Coendu sp.</i>	<i>L. lainsoni</i>	Parasite host	BR	IOCL 1058	
		<i>L. hertigi/L. deanei</i>	Parasite host	PN; BR	Herrer, 1971; Silva et al., 2013	
	<i>Coendu prehensilis</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BO	Le Pont et al., 1989	
	<i>Akodon arviculoides</i>	<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	Forattini et al., 1972; Rocha et al., 1988	
	<i>Akodon sp.</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BO	Telleria et al., 1999	
	<i>Necomys lasiurus</i>	<i>L. braziliensis</i>	Potential reservoir	BR	Brandão-Filho et al., 2003; de Freitas et al., 2012	
<i>Sigmodon hispidus</i>	<i>L. braziliensis</i>	Potential reservoir	VE	De Lima et al., 2002		
	<i>L. mexicana</i>	Potential reservoir	MX, VE	Van Wynsberghe et al., 2000; De Lima et al., 2002		
<i>Holochilus scieurus</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Lima et al., 2013		
<i>H. scieurus</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	BR	Brandão-Filho et al., 2003		
<i>Cerradomys subflavus</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	BR	Lima et al., 2013		
<i>Mus musculus</i>	<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BR	de Freitas et al., 2012		

Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum</i>	Potential reservoir	BR	Deane and Deane, 1955; Courtenay et al., 1996
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	apud Rotureau, 2006
	<i>Speothos venaticus</i>	<i>L. infantum</i>	Potential reservoir	BR	Figueiredo et al., 2008; Lima et al., 2009
	<i>Pseudalopex vetulus</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008
	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008
	<i>Puma concolor</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Dahroug et al., 2010
	<i>Panthera onca</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Dahroug et al., 2010
	<i>Nasua nasua</i>	<i>L. shawi</i>	Parasite host	BR	Lainson et al., 1989
	<i>Potos flavus</i>	<i>L. guyanensis</i>	Parasite host	FG	Pajot et al., 1982
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	EC	Kreutzer et al., 1991
	<i>Conepatus chinga</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BO	Telleria et al., 1999
		<i>L. braziliensis</i>	Parasite host	BO	Buitrago et al., 2011
Primata	<i>Cebus apella</i>	<i>L. shawi</i>	Potential reservoir	BR	Lainson et al., 1989
	<i>Cebus xanthostemos</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Chiropotes satanas</i>	<i>L. shawi</i>	Potential reservoir	BR	Lainson et al., 1989
	<i>Saguinus geoffroyi</i>	<i>L. amazonensis</i>	Potential reservoir	PN	Herrer et al., 1973
	<i>Aotus trivirgatus</i>	<i>L. braziliensis</i>	Potential reservoir	PN	Herrer and Christensen, 1976
	<i>Aotus azarai</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	AR	Acardi et al., 2013
	<i>Aotus nigriceps</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Callicebus nigrifrons</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Alouatta guariba</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Leontopithecus crysomelas</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Pithecia irrorata</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Saguinus imperator</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Malta et al., 2010
	<i>Ateles paniscus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Lima et al., 2012a
	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>L. infantum</i>	Potential reservoir	VE	De Lima et al., 2008
	Chiroptera	<i>Molossus molossus</i>	<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Savani et al., 2010
		<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	BR	Shapiro et al., 2013
<i>M. rufus</i>		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Savani et al., 2010
<i>Glossophaga soricina</i>		<i>L. infantum</i>	Parasite host	BR	Savani et al., 2010
		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Savani et al., 2010
		<i>L. (Viannia) sp.</i>	Parasite host	BR	Shapiro et al., 2013
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>		<i>L. amazonensis</i>	Parasite host	BR	Savani et al., 2010

Tomado de Roque y Jansen, 2014

3.2.3.1 Coatí

3.2.3.1.1 Clasificación

Clase: *Mammalia*

Orden: *Carnivora*

Familia: *Procyonidae*

Género: *Nasua*

Nombre científico: *Nasua narica*

Otros nombres comunes son: Kuatí, en guaraní, osito de los palos y sachamono.

3.2.3.1.2 Caracteres externos

El coatí es un animal muy característico por su cuerpo, al cual resulta difícil encontrarle un parecido. El cuerpo es alargado, robusto, cabeza triangular, la cola muy larga y voluminosa, el hocico también es largo y puntiagudo y las patas son cortas y poseen cinco garras fuertes. Las orejas son bastante pequeñas, la

mandíbula superior sobrepasa a la inferior y la nariz está desprovista de pelo y la mueve con facilidad.

La coloración es variable de acuerdo a la zona donde habita y a la edad de los individuos: mientras que las partes laterales son pardas o pardo oscuras, la cara es negruzca, contrastando con la parte inferior que es blanca y dos manchas próximas a los ojos del mismo color, la zona ventral es blanca o bien puede ser de un todo anaranjado. Las orejas presentan también un reborde blanco. Las patas son de un tono amarronado bastante más oscuro que el resto del cuerpo y la cola tiene una serie de anillos oscuros, a veces poco evidentes, siendo el pelo largo y tupido. El macho es de mayor tamaño que la hembra. La longitud del cuerpo con la cabeza pasa frecuentemente los 75 cm y la cola mide algo más de 50 cm (Canevari y Vaccaro, 2007, p.100).

3.2.3.1.3 Comportamiento

Muchas de sus acciones las realiza sobre el suelo, sin embargo el coatí también es de hábitos arborícolas: sobre los árboles se moviliza con gran destreza, utilizando su larga cola para aferrarse en caso de correr el riesgo de caerse. Es un animal gregario, viéndoselo casi siempre en grupos, las hembras y los jóvenes de ambos sexos, suelen agruparse. Los machos son más bien solitarios y salen a buscar su alimento más durante el crepúsculo y la noche que durante el día. Al llegar la noche se refugian todos en lo alto de los árboles donde constituyen sus dormitorios (Rodríguez, 2018).

“Los coatíes se alimentan de fruta, invertebrados, pequeños roedores y lagartijas. Realizan la búsqueda de su alimento en la tierra y ocasionalmente en los árboles” (Smithsonian’s National Zoo & Conservation Biology Institute, 2018).

3.2.3.1.4 Hábitat

Los coatíes son altamente adaptables a varios tipos de ambientes pero predominan en zonas boscosas y selvas tropicales. Se han avistado también en pastizales abiertos y en desiertos (Glatston, 1994, p. 6).

3.2.3.1.5 Distribución

El coatí habita en regiones que se extienden desde Arizona y partes del sur de Nuevo México en los Estados Unidos hasta México y América Central y marginalmente en América del Sur en áreas al oeste de los Andes (Glatston 1994, p. 6; González-Maya *et al*, 2011, p. 26).

3.2.3.2 Mapache

3.2.3.2.1 Clasificación

Clase: *Mammalia*

Orden: *Carnivora*

Familia: *Procyonidae*

Género: *Procyon*

Nombre científico: *Procyon lotor*

Los mapaches son mamíferos de la familia *Procyonidae*, del género *Procyon*. El nombre científico del mapache del norte de América es *Procyon lotor*, también conocido como mapache común.

3.2.3.2.2 Caracteres externos

El mapache es un organismo prácticamente carnívoro, de tamaño mediano, con masa corporal que varía entre 4 y 12 kg. Dicha masa depende de la latitud, el sexo y la estación del año. La cabeza de estos animales es corta y ancha, el cuerpo rechoncho y las patas cortas. Las orejas están separadas y son redondeadas, los ojos son grandes y negros, y el hocico es corto y puntiagudo. El pelaje es largo, abundante y denso, de color gris, negruzco más claro en los flancos y las patas en comparación con el resto del cuerpo. El albinismo es raro, es un carácter recesivo (Hogan, 1988, p. 388). Los rasgos distintivos del mapache son la cola anillada, en la cual se pueden encontrar entre 5 y 7 bandas oscuras, y la máscara facial negra a modo de antifaz.

3.2.3.2.3 Comportamiento

Es un “animal nocturno y crepuscular” (Urban, 1970, p. 372), por el día descansa en refugios repartidos por el territorio en el que habita. La principal actividad que ejecutan durante la noche es la búsqueda de alimento y el desplazamiento entre las áreas de alimentación (Greenwood, 1982, p. 240). La actividad del mapache se centra en torno a cuerpos de agua (Gehrt y Fitzell, 1998, p. 594).

3.2.3.2.4 Hábitat

El mapache es nativo de América. Su distribución abarca el sur de Canadá, casi todo el territorio de Estados Unidos y el norte de América del Sur. Puede adaptarse a una gran variedad de hábitats y es normal encontrarlo cerca de las poblaciones humanas. Vive en zonas cercanas al agua, en zonas boscosas húmedas, tierras de cultivo, praderas, cuevas, minas e incluso en alcantarillas y cocheras.

3.3. Leishmaniosis

La leishmaniosis es el nombre que designa a un número de enfermedades generadas por el parásito *Leishmania sp.*, que tienen un amplio rango de “manifestaciones clínicas que dependen de la especie de *Leishmania*, el grado de virulencia y el estado inmunológico del hospedador” (Gupta *et al.*, 2013, p. 256).

La leishmaniosis es tradicionalmente clasificada en tres formas principales en base a los síntomas clínicos (Handman, 2001).

3.3.1 Leishmaniosis cutánea

Es la forma más común de las leishmaniosis y puede presentarse en dos formas clínicas.

“La forma cutánea es usualmente causada por *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, en el Viejo Mundo y por *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* en el Nuevo Mundo” (Kumar, 2013, p. 2).

3.3.1.1. Leishmaniosis cutánea localizada

Después de la picadura del mosquito infectado, los promastigotes son inoculados y posteriormente fagocitados por los macrófagos, donde adquieren la forma de amastigotes; es ahí mismo donde al multiplicarse generan la ruptura de las células; la lesión característica suele presentarse como “un pequeño nódulo rosado en la zona de la picadura, que crece evolucionando a una placa de aspecto queiloide y que tiende a ulcerarse” (Gil *et al.*, 2014, p. 313). La úlcera abarca piel y tejido celular subcutáneo, generalmente es única, circular, de bordes regulares enrojecidos, resulta indolora y presenta un fondo limpio (Figura 6). La ulceración tiende a la curación espontánea en menos de un año (Becker *et al.*, 2014, p. 87).



Figura 6. “Úlcera del chiclero” con lesiones características de leishmaniosis cutánea localizada. En estas anomalías, el macrófago contiene muy escasos amastigotes de *Leishmania*. Tomado de Becker *et al.*, 2014.

3.3.1.2 Leishmaniosis cutánea difusa

“Se caracteriza por la falta de respuesta inmune celular hacia antígenos de *Leishmania*, lo que permite la diseminación del parásito por el líquido tisular, la linfa o vía sanguínea, con desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel” (Becker *et al.*, 2014, p. 88).

La enfermedad se inicia bajo la forma de lesiones localizadas, de aspecto nodular o en placa infiltrada, que poco a poco se diseminan a todo el cuerpo (figura 7). La presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas, úlceras y, algunas veces, lesiones verrucosas de límites imprecisos, que se confunden con la piel normal, dan el aspecto de la lepra lepromatosa. La enfermedad no invade órganos internos (Grevelink y Lerner, 1996; Salazar y Castro, 2001; Sanguenza y Sanguenza, 1993).

“Las lesiones generadas por esta variante de la enfermedad no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento” (Ministerio de Salud de Perú, 2000, p. 37).



Figura 7. **Lesiones nodulares en un paciente con leishmaniosiscutánea difusa.** Se observan las lesiones características de la variante cutánea difusa de la enfermedad. El macrófago de estos defectos contiene abundantes amastigotes de *Leishmania*. Tomado de Becker *et al.*, 2014.

3.3.2 Leishmaniosis mucocutánea

Esta forma de la enfermedad, también es conocida como espundia; causa la destrucción extensiva de las cavidades naso-oral y faríngeas con lesiones desfigurativas y mutilantes (figura 8). Esta variedad de la enfermedad se presenta después de una aparente resolución de la leishmaniosis cutánea y se manifiesta la aparición de lesiones metastásicas en la mucosa oral o bucal (Becker *et al.*, 2014, p. 88).

De manera tradicional es atribuida a la infección por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. panamensis* (Kumar, 2013, p. 4).



Figura 8. **Lesiones mutilantes de mucosa nasal y oral de leishmaniosis mucocutánea.** Se observa la destrucción de las membranas mucosas de la nariz y la boca. Tomado de Becker *et al.*, 2014.

3.3.3 Leishmaniosis visceral

También conocido como kala-azar o fiebre Dumdum es causada por *L. donovani* que predomina en India y China, *L. infantum* presente en la costa del Mediterráneo europeo y africano y *L. chagasi* en América.

El parásito invade y se multiplica en el interior de los macrófagos y afecta al sistema retículo endotelial incluyendo al bazo, hígado, médula ósea y el tejido linfoide.

“Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral típica están asociadas con fiebre, la que casi siempre es progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles, que también duran semanas” (Sánchez et al., 2004, p. 9). También se presenta esplenomegalia, hepatomegalia (figura 9), pérdida sustancial de peso, anemia progresiva, pancitopenia, e hiperglobulinemia. Esta forma de la parasitosis puede presentar complicaciones a causa de infecciones oportunistas secundarias como resultado del estado de debilidad inmunológica del paciente (Kumar, 2013, p. 4).



Figura 9. **Leishmaniosis visceral en niña.** Se observa hepato-esplenomegalia evidente. Tomado de OMS, 2010.

3.4. Diagnóstico

La aproximación diagnóstica más exacta considera tres criterios que deberán abordarse en el siguiente orden: antecedentes epidemiológicos, cuadro clínico sugestivo de leishmaniasis, y exámenes de laboratorio. El diagnóstico de laboratorio de las leishmaniosis puede efectuarse por diversos métodos que se clasifican en directos e indirectos (Ministerio de Salud de Perú, 2000, p. 39); los primeros tienden a demostrar la presencia del parásito, mediante observación microscópica de impronta, extendido o biopsia que son efectivos en las etapas iniciales de la infección. Existen métodos indirectos, en lo que se detecta son anticuerpos específicos e identifican contacto con el parásito, sin embargo no distinguen entre infección pasada o actual (Apt, 2013, p. 306).

3.4.1 Frotis de la lesión.

Es de todos los métodos, el menos invasivo, en el diagnóstico clínico, las lesiones cutáneas se deben diferenciar de las heridas contaminadas, ulceraciones varicosas, micosis, etc.

El mayor éxito diagnóstico para el caso de la variante cutánea y mucocutánea se obtiene cuando la lesión es reciente y la muestra se toma del borde de la lesión, claro tras haber realizado previamente la limpieza de dicha región. La muestra puede obtenerse por raspado con hoja de bisturí, espátula o por aspiración con una aguja hipodérmica o micropipeta. La mejor muestra es aquella rica en linfa, con abundantes histiocitos y sin sangre, gérmenes o mucus que impidan una buena observación. El método de tinción principal es el Giemsa; los parásitos pueden hallarse libres o en el interior de los histiocitos. En lesiones recientes y no tratadas, el hallazgo de los amastigotes es frecuente, lo que no ocurre en lesiones contaminadas o crónicas.

Para el caso de las variantes cutánea y mucocutánea, debe hacerse en el borde de la lesión, y el material obtenido se utiliza para el estudio histopatológico y para la búsqueda del parásito. Este material también se usa para determinación de la especie de *Leishmania*, mediante la hibridación del ADNk y el uso de anticuerpos monoclonales (Apt, 2013, p. 306).

3.4.2 Biopsia

La biopsia consiste en tomar una muestra directamente del tejido infectado para su análisis histopatológico (Romero, 2007). Se realiza punción de médula ósea, ganglios linfáticos, bazo e hígado en el caso de la variante visceral; es más factible realizar la punción de médula ósea y buscar a los amastigotes de *Leishmania* en el interior de los histiocitos sólo cuando las condiciones generales lo permitan (Apt, 2013, p. 306).

Los sitios anatómicos anteriormente mencionados son los órganos blancos del parásito ya que: el hígado al ser un sitio de alta vascularización, los parásitos llegan a él por torrente sanguíneo, generando la obstrucción en los vasos sanguíneos que irrigan sangre a los hepatocitos y a su vez la presentación de nidos de amastigotes en éste órgano. Por otra parte el bazo es invadido por la llegada de macrófagos infectados que tras ser lisados, generan la liberación del parásito y la invasión de nuevas células del sistema fagocítico mononuclear, las cuales se encuentran abundantemente en éste órgano (Goldsmith y Heyneman, 1995).

3.4.3 Cultivos e inoculaciones

A partir del material obtenido para el frotis o de biopsia, se pueden llevar a cabo cultivos. El cultivo del agente etiológico es determinante para el diagnóstico de la leishmaniosis ya que en ello se puede observar fase de promastigote del parásito (CENAPRECE, 2015, p. 20): Las muestras obtenidas deben macerarse antes de la inoculación al medio de cultivo. El más usado es el NNN suplementado con sangre desfibrinada de conejo (15%) a 23 °C, para aislamientos iniciales del parásito. A partir de los siete días en caso de positividad, se desarrollan las formas de promastigotes, fáciles de identificar.

También es posible inocular en animales susceptibles, como el ratón, rata y en especial, los hámsters. El perro es susceptible a la infección, y desarrolla la enfermedad (Apt, 2013). “Su mayor utilidad es para el estudio epidemiológico y conocer que especies y subespecies de *Leishmania* están involucradas” (CENAPRECE, 2015, p. 20).

3.4.5 Pruebas serológicas.

Se basan en la detección de anticuerpos específicos anti-*Leishmania* desarrollados como consecuencia de la enfermedad. Tiene sensibilidad y especificidad variable según forma clínica. Se recomiendan: Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba ELISA (Ministerio de Salud de Perú, 2000).

3.4.6 PCR, reacción de la cadena de polimerasa

La técnica consiste en amplificar regiones específicas del ADN del parásito de manera *in vitro* mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos que funcionan como iniciadores, polimerasa, dinucleótidos trifosfatos y cofactores para la extensión de las nuevas cadenas de ADN que se amplifica. Es un procedimiento costoso, cuya sensibilidad y especificidad es elevada si se utilizan iniciadores apropiados. El material que se utiliza se puede obtener de raspado o aspirado de la lesión, biopsia o sangre total (CENAPRECE, 2015, p. 21).

3.4.7 Diagnóstico de infección por *Leishmania* en pelo

Se han llevado a cabo diversos estudios para identificar la presencia de *Leishmania sp.* en muestras de pelo de animales infectados con el parásito, que han permitido proponer que el pelo es una muestra biológica útil para el diagnóstico de la infección por *Leishmania sp.*

Este campo de investigación fue iniciado en el año con un estudio en el que se determinó la presencia de *Leishmania infantum* en perros naturalmente infectados, mediante una prueba de PCR en tiempo real (qPCR), que detecta al ADNk del parásito y que fue realizada en muestras de pelo de la población en estudio. El ADNk de *L. infantum* fue detectado en el pelo de todas las zonas corporales de los animales infectados que fueron analizadas. Las muestras resultaron positivas en todas las secciones del pelo y en queratinocitos epidérmicos (Belinchón-Lorenzo *et al.*, 2013).

Posteriormente, se estudió el efecto de algunas condiciones ambientales en la detección del ADNk de *Leishmania*; en muestras de pelo de un zorro infectado por *Leishmania sp.* se demostró que el material genético de *Leishmania* puede ser detectado en pelo, mediante qPCR a pesar de que las muestras biológicas hayan sido expuestas a altas temperaturas, rayos ultravioleta y altas concentraciones de sales. Sin embargo, la putrefacción de los tejidos si previno la amplificación del ADNk del parásito (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013).

Un tercer reporte de la detección de ADNk de *Leishmania* en muestras de pelo, se realiza en infección experimental de ratones de la cepa BALB/c con *Leishmania major*. Se lleva a cabo la inoculación del parásito vía dérmica y después de transcurridas 5 semanas se obtiene para la evaluación de la presencia del protozoario: el bazo, los nódulos linfáticos retro-mandibulares y las orejas. Mediante la extracción de ADN de dichas muestras y

posterior PCR tiempo real, se logra la detección del parásito en todos los órganos extraídos. Así mismo tras llevar a cabo la inoculación del parásito en los ratones, se recolectan semanalmente muestras de pelo, las cuales tras ser sometidas a la extracción de ADN y amplificación de ADNk por PCR, revelan que la presencia del parásito es detectable en pelo cercano al sitio de inoculación a partir de la primera semana mientras que en pelo de regiones distantes al sitio de inoculación es posible detectar al protozoario a partir de la tercera semana (Iniesta *et al.*, 2013).

A través de los estudios mencionados se han propuesto mecanismos por los cuales es posible determinar la presencia de *Leishmania* en el pelo de los mamíferos infectados, en donde se resalta que el pelo es un tejido altamente especializado en la excreción de metabolitos tóxicos orgánicos extraños y por lo tanto en el secuestro y eliminación del ADN del parásito (Iniesta *et al.*, 2013). Los mecanismos propuestos de incorporación del ADN del parásito al pelo son los siguientes:

- a) Incorporación directa del ADN del parásito entre los queratinocitos de la piel y el cabello en el sitio de la inoculación.
- b) Eliminación transepidérmica, cuyo mecanismo aún se desconoce en gran medida, pero que resulta de la presencia de amastigotes de *L. major* en todas las capas epidérmicas e incluso en los folículos capilares de pacientes con leishmaniosis cutánea (Karram *et al.*, 2012). Una vez que el ADN del parásito se incorpora entre los queratinocitos, se puede pasar hacia arriba en el pelo formado durante el proceso de queratinización.
- c) Por otro lado, se tiene la posibilidad de que el ADNk se incorpore al cabello mediante la migración desde el torrente sanguíneo, con lo cual se tendría la razón de por qué es posible encontrar al ADNk en pelo de zonas distantes del sitio de inoculación del parásito (Iniesta *et al.*, 2013).

Por otra parte, en un ensayo realizado en ratones de la cepa BALB/c, se llevó a cabo la infección de dicho modelo murino con *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 a 22°C y a 32°C. El estudio histológico mostró que a 32°C se generan los patrones de infección conocidos (Barral *et al.*, 1983) en donde se presentan macrófagos parasitados en el tejido subcutáneo y músculo. Sin embargo, a 22°C se observaron parásitos embebidos en la corteza del pelo en vez de hallarse internalizados en los macrófagos. Este estudio propone que en la infección experimental por *Leishmania mexicana* en ratones de la cepa BALB/c, el parásito presenta diferente afinidad a los tejidos del hospedador dependiendo

de la variación de la temperatura en la que se encuentre el mamífero. Dicho tropismo explicaría por qué es posible detectar al parásito en zonas alejadas del sitio de inoculación (Quiñones-Díaz *et al*, 2012).

3.5. Tratamiento

El fármaco de elección para tratamiento en México, es un antimonial pentavalente, en forma de antimoniato de N-metilglucamina o estibogluconato sódico, que puede aplicarse por vía intravenosa, intramuscular e intralesional. Además del tratamiento con antimoniales, se emplea la anfotericina B y la pentamidina (CENAPRECE, 2015, p. 25).

3.6. Profilaxis

La profilaxis tiende a eliminar las fuentes primarias de la infección mediante el tratamiento de las personas infectadas y eliminación de los reservorios infectados además del combate a los vectores, que se hace a través de la aplicación de los insecticidas de acción residual.

3.7. Epidemiología

Se trata de una enfermedad tropical que se considera dentro de las enfermedades más importantes según la Organización Mundial de la Salud / Investigación de Enfermedades Tropicales. Después de la malaria, las leishmaniosis son la segunda enfermedad parasitaria más frecuente en el mundo. Según estimaciones recientes, las leishmaniosis afectan a aproximadamente 12 millones de personas en todo el mundo, con un incremento anual de 2 millones de personas. Se presentan entre 20,000 y 30,000 muertes por año a causa de las leishmaniosis. La forma más letal de la enfermedad es la visceral, endémica en India y el este de África, con 200,000 a 400,000 nuevos casos cada año. El 90% de los casos se reportan en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India y Sudán.

La forma cutánea predomina en América con 95% de los casos y el centro y este de Asia. Alrededor de un tercio de los casos que surgen, se concentran en 6 ciudades: Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Irán y la República Árabe de Siria. Se estima que alrededor de 0.7 a 1.3 millones de casos nuevos ocurren anualmente.

Respecto a la variante mucocutánea, se puede mencionar que el 90% de los casos ocurren en Bolivia, Brasil y Perú.

(OMS, 2018)

3.7.1 Leishmaniosis en México

Las leishmaniosis son consideradas como enfermedades desatendidas o rezagadas y al igual que en otros países latinoamericanos, afectan a los sectores más vulnerables y marginales de la población. La presentación de esta enfermedad se asocia a áreas agrícolas donde se siembra y cosecha cacao, café o árboles chicleros, pudiendo aparecer en brotes o de manera aislada. Actualmente la población en riesgo se distribuye en 13 entidades federativas con aproximadamente nueve millones de habitantes, agrupadas en tres áreas geográficas:

- a) Región del Golfo: Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.
- b) Región del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa.
- c) Región Centro: Morelos y Puebla

Los casos de leishmaniosis cutánea diseminada y mucocutánea, son de menor ocurrencia y presentan resistencia al tratamiento en comparación con la forma cutánea localizada, que es la de mayor frecuencia en México (99%); La forma visceral es frecuente en menores de cinco años y, sin tratamiento oportuno, es mortal. Esta última se presenta anualmente en el estado de Chiapas y algunos casos esporádicos en Guerrero, Morelos y Puebla.

La enfermedad es ocupacional y afecta principalmente a hombres en edad productiva de 15 a 44 años, quienes por motivos de trabajo se adentran a las áreas selváticas donde habita el vector, exponiéndose a su picadura. La mayor parte de la población expuesta vive en áreas rurales (cafetales, cacaotales y otros). La residencia en área de transmisión y los frecuentes movimientos migratorios propician la dispersión del padecimiento.

(CENAPRECE, 2015, p. 7)

Durante los últimos años, Tabasco ha ocupado el primer lugar, con el 37.4% de todos los casos reportados en el país. La mayor incidencia se ha registrado en la Chontalpa, particularmente en Cunduacán (Carrada *et al*, 2014).

3.7.1.1 La Venta

El parque-museo La Venta se encuentra en la ciudad de Villahermosa, Tabasco (Coordenadas: 18.002808,-92.94184,15, figura 10). Ubicada a 2 km al noroeste de la Zona Luz ubicada en el Centro de la ciudad, junto a la Avenida Ruíz Cortines, la principal autopista este-oeste que cruza la ciudad. El parque está enclavado en una superficie de ocho hectáreas, a orillas de la Laguna de las Ilusiones. El parque comenzó su operación al público el 4 de marzo de 1958, con el objetivo de conservar, resguardar, documentar, proteger, exhibir y difundir las piezas arqueológicas de la Cultura Olmeca descubiertas en la Venta Huimanguillo, Tabasco, así como de los recursos bióticos del museo asociados al ecosistema de la región. El área zoológica alberga 38 especies representativas de la región entre aves, mamíferos y reptiles, lo que hace un total de más de 550 organismos, entre las que destacan ejemplares de jaguares, cocodrilos y quelonios, otras especies de animales silvestres, así como muestras de plantas de ornato, árboles frutales, medicinales y maderables que forman parte de la vegetación típica de la región (Instituto Estatal de Cultura de Tabasco, 2018).

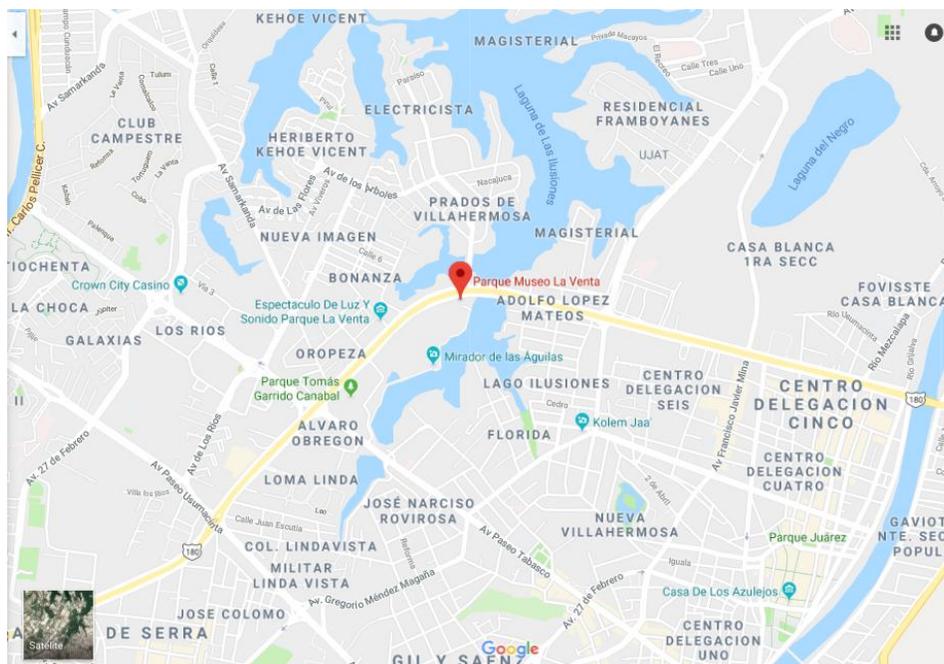


Figura 10. **Ubicación del parque-museo La Venta, Tabasco y sitios limítrofes.** Se observa la ubicación del parque Museo La Venta (Coordenadas: 18.002808,-92.94184,15). Rodeado de importantes cuerpos de agua y poblaciones urbanas. Recuperado de Google Maps, 2018

3.8 Factores de riesgo

Existen varios factores o situaciones que pueden propiciar que determinadas poblaciones tengan mayor riesgo de adquirir la enfermedad, entre estas condiciones se encuentra:

3.8.1 Urbanización

El número de casos de leishmaniosis está incrementando, debido principalmente a actividades tales como la minería, tala de árboles, expansión de caminos y carreteras y la creación de nuevos esquemas de irrigación y en general a actividades que generan los cambios ambientales artificiales que aumentan la probabilidad del contacto del hombre con el insecto vector, implicando así la posibilidad de adquisición de esta parasitosis.

3.8.2 Condiciones socioeconómicas

Las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana (por ejemplo, la ausencia de sistemas de gestión de residuos, alcantarillado abierto). Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre.

3.8.3 Movilidad de poblaciones

Las epidemias de las dos formas principales de leishmaniosis a menudo se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes. Por ejemplo, asentarse en zonas previamente boscosas significa acercarse al hábitat del flebótomo, lo que puede llevar a un aumento rápido del número de casos.

3.8.4 Cambio climático

La leishmaniosis es sensible a las condiciones climáticas, y los cambios en las precipitaciones. La temperatura y la humedad influyen en gran medida en la enfermedad. El calentamiento de la Tierra y la degradación del suelo afectan en muchos aspectos a la epidemiología de la leishmaniosis:

Los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e

influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población; pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica; las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la leishmaniosis, y la desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas.

(OMS, 2015)

3.9 Organización genómica de *Leishmania*

Los protozoarios pertenecientes al orden *Kinetoplastida*, presentan un ADN genómico (DNAg), formado por un mínimo de 22 cromosomas, localizado en el núcleo celular encargado de la replicación del parásito (Rivas, 1993, p. 378) y un “ADN extracromosómico (ADNk) situado en el cinetoplasto, organelo único de este grupo de organismos, que contiene ADN mitocondrial y se encuentra en la base del flagelo” (Vickerman y Preston, 1970, p. 368).

El cinetoplasto es una red compleja formada por dos clases de moléculas de ADN circular concatenadas entre sí, los mini círculos y los maxi círculos. Los primeros tienen un tamaño que varía entre 0.7 – 1.0 kb dependiendo de la especie de cinetoplasto, se encuentran repetidos entre 5000 - 50000 veces por cinetoplasto, en cada minicírculo existe una región muy conservada de 120 pares de bases y una región variable de 700 pares de bases. Poseen los ARN guías. Los maxicírculos por su parte, con tamaños de 20 - 38 kb y 20 – 50 copias por cinetoplasto, contienen los genes que codifican el ARN ribosomal y algunas proteínas mitocondriales (Arts y Benne, 1996).

3.10 PCR

“La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente” (Tamay *et al.*, 2013, p. 71).

La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar, la polimerasa, los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo

3' libre para que inicie la transcripción), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis, simulando así lo que ocurre durante la replicación celular (Espinosa, 2007). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) (Serrato *et al.*, 2018, p. 54).

Recordemos que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión:

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son expuestas a altas temperaturas y separadas a 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Hibridación. En esta etapa, los iniciadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-iniciador, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los iniciadores es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-iniciador y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

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 una solución amortiguadora que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo.

Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas.

Cuando los amplicones son separados en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado.

(Tamay *et al*, 2013, p. 72)

4. Justificación

En un estudio se reveló que Tabasco es el Estado que reportó el mayor número de casos clínicos con leishmaniosis (37.4%) durante el periodo 1990-2011 (Carrada *et al.*, 2014).

Varios trabajos evalúan la frecuencia con la que se presenta esta parasitosis en la población humana; sin embargo, existen pocos estudios que determinan la presencia de *Leishmania* en especies consideradas como hospedadores silvestres y potenciales reservorios. Dichos estudios son de importancia ya que evalúan indirectamente el riesgo de adquisición de leishmaniosis al que se enfrentan las comunidades que se encuentran en contacto con entornos en donde cohabitan los vectores y hospedadores del parásito.

En Tabasco existe el parque ecológico La Venta, de importancia turística en donde habita el insecto vector del parásito; y posibles hospedadores de *Leishmania* como son el coatí (*Nasua narica*) y el mapache (*Procyon lotor*). Debido a que es un sitio frecuentemente visitado, podría representar para los turistas y las comunidades aledañas, un riesgo de adquisición de la parasitosis.

En un estudio previo (trabajo en proceso) se determinó la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* entre el año 2014 y 2015 en mapaches y coatíes del parque ecológico. Sin embargo, la presencia de estos anticuerpos no es indicativa de una parasitosis activa de ahí surge la necesidad de identificar directamente al parásito, a través de la determinación del ADNk, con el objetivo de determinar el porcentaje de mapaches y coatíes de La Venta, Tabasco que resultan positivos a la presencia de *Leishmania*.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar la presencia de *Leishmania sp.* en una población de mapaches y coatíes del parque ecológico La Venta, Tabasco para establecer el porcentaje de individuos que presentan una parasitosis activa.

5.2 Específicos

1. Extraer ADN de muestras de sangre a través del uso de un kit comercial.
2. Poner a prueba dos diferentes técnicas de extracción de ADN de muestras de pelo: kit comercial vs Fenol-cloroformo.
3. Amplificar un fragmento de 120 pb del ADNk mediante PCR punto final.
4. Realizar un cruce de variables entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y lo obtenido en la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania* de un estudio previo en la misma población.

6. Metodología

6.1 Material biológico

6.1.1 Muestras problema

Se presenta el análisis de 9 muestras de sangre y 9 muestras de pelo de mapache así como 30 muestras de sangre y 30 de pelo de coatíes que habitan el parque ecológico La Venta, Tabasco (Coordenadas: 18.002808,-92.94184,15) recolectadas durante enero de 2016. En el parque, los animales se encuentran en libertad, sin embargo, son atrapados ocasionalmente para revisarlos. A cada uno de ellos se le ha colocado una marca para su identificación. Los mamíferos fueron seleccionados de manera completamente aleatoria, ninguno de los animales presentó lesiones sugerentes o compatibles con la infección por *Leishmania sp.*

6.1.2 Muestras control

6.1.2.1 Control negativo de muestras de pelo

Se prepararon muestras de fragmentos de pelo humano de 2 cm de largo.

6.1.2.2 Control positivo de muestras de pelo

Muestras de pelo humano, en cantidad y condiciones similares a las descritas en el punto anterior, recibieron la incorporación de 1 promastigote/ μL de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379.

6.1.2.3 Control negativo de muestras de sangre

Como control negativo de sangre, se recolectaron alícuotas de 250 μL de sangre de catéter de un neonato de 1 mes de edad que recibió atención médica en el Instituto Nacional de Perinatología, ni el neonato ni la madre presentan signos clínicos sugerentes de infección por *Leishmania*.

6.1.2.4 Control positivo de muestras de sangre

Se prepararon mezclas de las alícuotas de sangre del neonato con 1 promastigote/ μL de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379.

6.1.2.4 Control ADN de *Leishmania mexicana*

Se prepararon alícuotas de ADN de promastigotes de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379, cepa de referencia, creciendo en forma axénica en medio de cultivo Dulbecco's con 10% SFB. El ADN es extraído mediante QIAamp DNA Blood mini kit 250 de QIAGEN.

6.2 Procesamiento de las muestras problema

6.2.1 Extracción y purificación de ADN de muestras de sangre

El procesamiento de las muestras de sangre de los mapaches y coatíes se realizó mediante el uso del QIAamp DNA mini kit 50 (Qiagen Sciences, Maryland, USA). Las muestras de sangre fueron suspendidas en 500 µl del buffer ASL y homogeneizadas por agitación en vórtex, posteriormente fueron centrifugadas a 16,099 g durante 1 minuto. Los sobrenadantes fueron recolectados y se les adicionó las tabletas adsorbentes que proporciona el kit. Posteriormente, se llevó a cabo la homogeneización por agitación en vórtex y se centrifugaron a 16,099 g durante 1 minuto. Se recolectaron los sobrenadantes y a estos les fueron agregados 10 µl de proteinasa K y 500 µL de buffer AL, dichas mezclas se homogeneizaron por agitación en vórtex y se colocaron en baño María a 70°C durante 10 minutos. Finalizado este tiempo se agregaron 500 µL de etanol y se llevó a cabo la homogeneización por agitación en vórtex, obteniendo así los lisados, de los cuales se recolectaron 500 µl en una columna QIAamp. Posteriormente se llevó a cabo la centrifugación a 16,099 g durante 1 minuto y se desecharon los eluatos. Se agregaron 500µl de la solución AW1 a las columnas QIAamp, se centrifugaron a 16,099 g durante 1 minuto y se descartaron los eluatos. Posteriormente se agregaron 500µl de la solución AW2 a las columnas, se llevó a cabo una centrifugación a 16,099 g durante 1 minuto y se descartaron los eluatos. Finalmente se agregaron 50 µl de solución AE a las columnas, se centrifugaron a 16,099 g durante 1 minuto y se colectaron los eluatos finales.

6.2.2 Extracción de ADN de pelo mediante uso de QIAamp DNA Blood mini kit 250 (Qiagen Sciences, Maryland, USA)

Se prepararon 4 pelos por cada muestra problema, a los cuales se les adicionaron 30µL de proteinasa K y 23 µL de DTT 1M. Posteriormente las mezclas se homogeneizaron en vórtex y se incubaron durante 1 hora a 56°C; pasado este tiempo, se les adicionó 200 µL de buffer AL y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A la totalidad de las mezclas se les agregó 200 µL de etanol y se homogeneizaron en vórtex vigorosamente. Cada una de las mezclas se transfirió a columnas de separación y se centrifugaron durante 4 minutos a 7,155 g. Se descartaron los eluatos y a las columnas se les agregó 500 µL del buffer AW1; se sometieron a centrifugación durante 4 minutos a 7,155 g. Nuevamente se descartaron los eluatos, se agregaron 500 µL de buffer AW2 a las columnas y se centrifugaron a 16,099 g durante 8 minutos. Se desecharon los eluatos y a las columnas se agregó 60 µL de buffer AE, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. Las mezclas se centrifugaron durante 1 minuto a 7,155 g. Se colectaron los eluatos finales.

6.3 Amplificación por PCR punto final de un fragmento del ADNk de *Leishmania sp.*

Este proceso fue llevado a cabo con el kit de PCR Taq Master Mix de QIAGEN (Qiagen Sciences, Maryland, USA) que incluyó Buffer de PCR 2x y H₂O grado biología molecular. Se les añadieron los iniciadores JW11 y JW12 (Nicolas, 2002) y ADN genómico de las muestras problema y muestras control, en un volumen final de 25 µL/vial, como se muestra en la siguiente tabla:

Reactivo		1x (µL)
Buffer de PCR 2x	MgCl ₂ (3 mM)	12.5
	Taq DNA polimerasa (5 U/µl)	
	2-desoxirribonucleósido 5-trifosfatos (DNTPs) (400µM)	
H ₂ O		5.5
JW 11 (10 pM)		1
JW12 (10 pM)		1
ADN		5
Total		25

Tabla 1. **Cantidades/ concentraciones de los reactivos y muestras usados en la reacción de PCR punto final.**

Usando un termociclador (Mastercycler Gradient; Eppendorf, Westbury, NY); Se manejaron las siguientes condiciones:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos (#)
Desnaturalización inicial	95	10	1
Desnaturalización	95	1	31
Alineamiento	52	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	10	1

Tabla 2. **Condiciones de temperatura, tiempo y numero de ciclos en el proceso de PCR punto final.**

Finalmente enfriamiento a 4 °C. Después, los viales se almacenaron a una temperatura de -20 ° C.

6.4 Amplificación por PCR punto final de un fragmento de β -globina humana.

Para identificar si el proceso de lisis del pelo permitía la liberación del ADN sin dañarlo, se amplificó un gen que se encuentra de manera ubicua en las células. Para ello, se extrajo el ADN como ya se describió y se amplificó con los iniciadores GH21 (25 μ M) y PCO3 (25 μ M) (Saiki *et al.*, 1985) en las muestras control, en un volumen final de 25 μ L/vial. Las condiciones de amplificación fueron las descritas en la siguiente tabla:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos (#)
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	58	30	
Elongación	72	30 s	
Elongación final	72	10 m	1

Tabla 3. **Condiciones de temperatura, tiempo y numero de ciclos en el proceso de PCR punto final.**

Finalmente se llevó a cabo un enfriamiento a 4 °C. Después, los viales se almacenaron a una temperatura de -20 °C.

6.5 Análisis del producto de amplificación por PCR

Se preparó gel de agarosa ultrapura (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil) al 3.5% diluido en solución tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x (ver anexo 1). La agarosa se calentó en microondas hasta que se logró la disolución completa. Se adicionó como revelador Gelred (Biotium Inc, Landing Parkway, CA) 1:1000.

Antes de amplificar el ADN, se determinó su integridad, en un gel similar al arriba descrito, de una concentración de 0.8% de agarosa. Las muestras de ADN de sangre de los mamíferos se mezclaron con 1 µl de colorante de carga Orange G (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri USA), de dichas mezclas se tomaron alícuotas de 10 µL y se descargaron en los pozos del gel de agarosa. Si el ADN se observó íntegro, entonces se realizó la amplificación del ADN y los amplicones obtenidos de la PCR punto final se mezclaron con 1 µl de colorante de carga Orange G. De dichas mezclas se tomaron alícuotas de 10 mL y se descargaron en los pozos del gel de agarosa. Así mismo, se añadió un marcador de peso molecular (ADN de 50 pb, Invitrogen, Sao Paulo, Brasil) en el primer pozo. La electroforesis se ejecutó a 70 V durante 2 horas.

La observación se llevó a cabo usando un transiluminador Alphalmager, Sistema HP (Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA). Esperando productos de amplificación de 120 pb para

el caso de la identificación de la presencia de ADNk de *Leishmania sp.* y de 250 pb en el caso del fragmento de la β -globina humana.

6.6 Datos de la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania*

Los resultados de la determinación de la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* realizada en muestras sanguíneas recolectadas en julio y diciembre de 2014, y julio y diciembre de 2015, fueron contrastados con la determinación del ADN, realizada durante este trabajo.

6.7 Análisis estadístico

Se presentan los resultados como positivos o negativos. Se prepararon tablas de contingencia entre los resultados de PCR y las determinaciones de anticuerpos obtenidas anteriormente por el grupo de trabajo.

7. Resultados obtenidos

7.1 Estandarización de la extracción de ADN de muestras de pelo

Se realizó la extracción y purificación del ADN de muestras control de pelo mediante el uso del QIAamp DNA Blood mini kit 250 de QIAGEN y la técnica de fenol cloroformo. En ambas técnicas se realizaron modificaciones en el uso de los reactivos de la fase de lisis, así como en el orden en el que éstos se adicionaron, lo anterior con el propósito de determinar si las técnicas permiten una buena extracción del ADN bajo diversas condiciones de lisis. A continuación se describen detalladamente cada una de las condiciones que utilizamos durante el proceso de estandarización:

Se realizaron experimentos con diferentes mezclas de extracción de DNA del pelo:

7.1.1 Comparación de la técnica de fenol cloroformo y el QIAamp DNA Blood mini kit 250 de QIAGEN para la extracción de ADN de muestras de pelo.

7.1.1.1 Fase de lisis para el QIAamp DNA Blood mini kit 250 de QIAGEN

Los controles positivos y negativos preparados como se describió previamente, fueron tratados en tres combinaciones para la fase de lisis, con el objetivo de identificar las mejores condiciones de extracción del ADN en el pelo:

30µL de proteinasa K, 200 µL de buffer AL y 23 µL de DTT 1M;

30µL de proteinasa K y 23 µL de DTT 1M;

30µL de proteinasa K,

Posteriormente, las mezclas se homogeneizaron en vórtex y se incubaron durante 1 hora a 56°C. En aquellas mezclas que inicialmente no contenían buffer AL, les fue agregado este reactivo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente a la totalidad de las mezclas se les agregó 200 µL de etanol y se homogeneizaron en vórtex vigorosamente. A continuación el ADN se extrajo como se describió en material y métodos, se amplificó y se identificó en geles de agarosa. Figura 11

7.1.1.2 Fase de lisis para la técnica de extracción de fenol-cloroformo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri USA)

Controles negativos y positivos descritos anteriormente, fueron lisados con las siguientes mezclas:

300 µL de buffer de lisis NET 100 (ver anexo 1)

30µL de proteinasa K, 200 µL de buffer AL y 23 µL de DTT 1M;

30µL de proteinasa K y 23 µL de DTT 1M;

30µL de proteinasa K,

Las mezclas se homogeneizaron por agitación vigorosa con vórtex y se incubaron a 56 °C durante 1 hora. Posteriormente se adicionaron 300 µL de fenol saturado y se mezclaron por agitación con vórtex. Se centrifugaron a 1,006 g durante 10 minutos y se recuperaron las fases acuosas, se les añadió a cada una 150 µL de fenol y 150 µL de cloroformo, dichas mezcla se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 1,006 g durante 10 minutos. Se recuperaron las fases acuosas y a estas se les adicionaron 600 µL de cloroformo y se agitaron durante 5 minutos con vórtex, se centrifugaron nuevamente las mezclas a 1,006 g durante 10 minutos y nuevamente se recolectaron las fases acuosas, a las cuales se les adicionaron 40 µL de NaCl 5 M y 1000 µL de etanol absoluto. Se agitaron por inmersión y se centrifugaron a 16,099 g durante 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y al botón se les agregaron 800 µL de etanol al 70% a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 6,289 g durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón se dejó secar durante 40 minutos. Finalmente, las muestras se hidrataron adicionando 60 µL de agua MiliQ y se almacenaron a -20°C.

En la Figura 11, Se observa la banda esperada de 120 pb en el carril del control positivo *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 (1:25,000); bandas similares se obtuvieron en los carriles de los tratamientos de lisis ADK, DK, D, K por extracción con Kit QIAamp de QIAGEN.

Con extracción de DNA mediante técnica de fenol-cloroformo la banda de 120 pb se obtuvo únicamente en el carril del tratamiento de lisis Buffer NET 100. En el resto de los tratamientos no se obtiene amplicón.

La elección de la técnica óptima se realizó con base en las ventajas que cada una ofrece, como el tiempo que se requirió para efectuarse, la sencillez del proceso, la exposición a reactivos tóxicos y por supuesto la visualización de los amplicones a través de electroforesis en gel de agarosa al 3.5%.

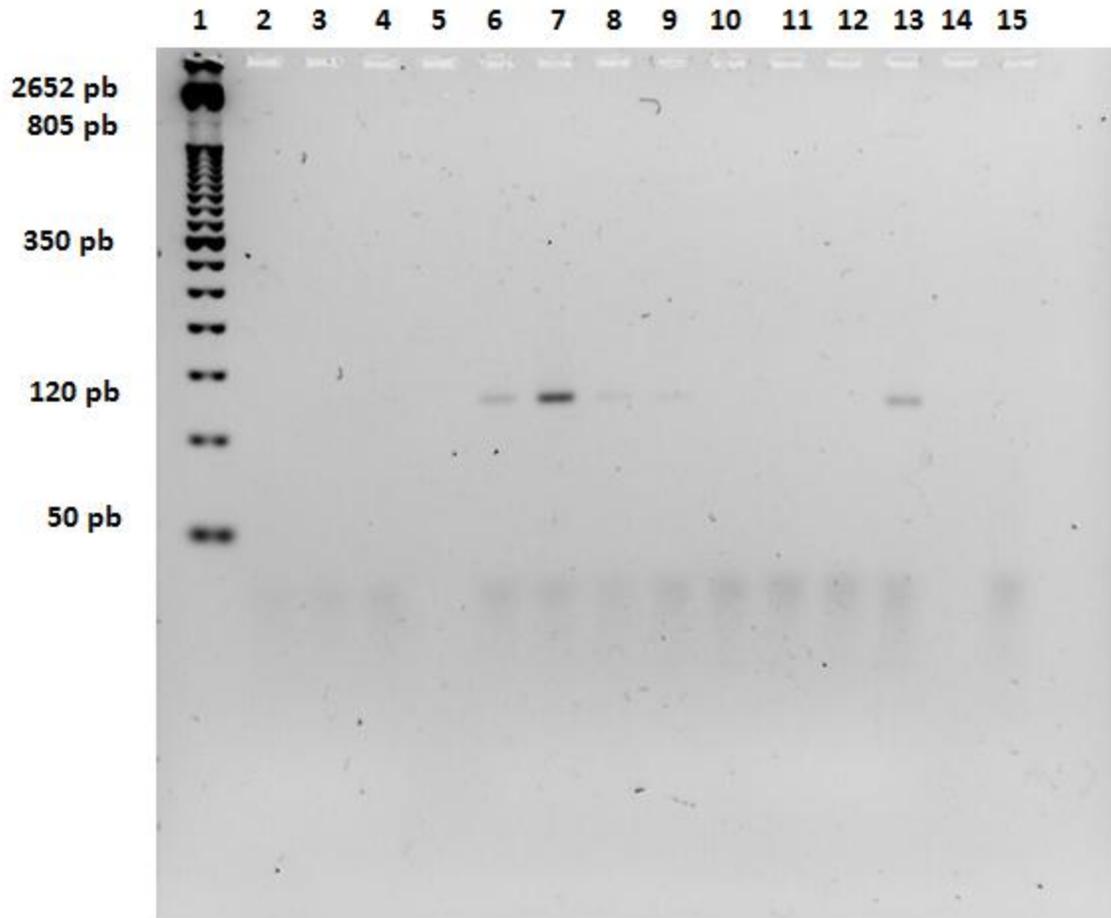


Figura 11. **Efecto de la lisis de los pelos en la amplificación del ADN de *Leishmania*.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de un fragmento de 120 pares de bases del DNAk de *Leishmania mexicana*, llevada a cabo bajo diferentes tratamientos de lisis. Carril : (1) marcador de peso molecular 50bp, (2) mezcla de reacción , (3) agua , (4) muestra control negativa extracción con kit, (5) carril vacío, muestras control positivas extracción con kit, tratamiento: (6) Buffer AL, DTT y proteinasa K, (7) DTT y proteinasa K*, (8) proteinasa K*; muestras control positivas extracción con técnica fenol-cloroformo, tratamiento: (9) Buffer NET 100, (10) Buffer AL, DTT y proteinasa K, (11) DTT y proteinasa K, (12) proteinasa k; (13) Control positivo M379 (C+); (14) carril vacío, (15) agua.

*Adición de Buffer AL post incubación

Al comparar ambas técnicas se pudo determinar que el uso del kit resultó más sencillo que la técnica de fenol-cloroformo, se necesitó menos tiempo para llevarla a cabo y no utiliza reactivos altamente tóxicos como es el cloroformo, además permite llevar a cabo la lisis de las muestras en diversas condiciones, algo que la técnica de fenol-cloroformo no permitió, con lo cual esta última técnica se descartó para el procesamiento de las muestras problema de pelo.

7.1.1.3 Incremento de controles a la fase de lisis del QIAamp DNA Blood mini kit 250

Una vez que se ha seleccionado la técnica con la que se ha de extraer el ADN de las muestras de pelo, es preciso llevar a cabo la estandarización de la fase de lisis ya que el kit se encuentra adaptado para procesar muestras sanguíneas, tejido que en cuanto a composición y estructura difiere completamente de la muestra a manipular, en este caso pelo de mamífero. Las modificaciones realizadas consistieron en la variación del uso de los reactivos manejados: buffer AL, Proteinasa k y Dithiothreitol (DTT) 1M, este último reactivo no forma parte del kit de extracción sin embargo su uso se ha descrito en protocolos de extracción de ADN de pelo.

Se prepararon controles positivos y negativos a los cuales se les adicionaron los reactivos de la fase de lisis:

30µL de proteinasa K, 200 µL de buffer AL y 23 µL de DTT 1M;

30µL de proteinasa K y 23 µL de DTT 1M;

30µL de proteinasa K;

200 µL de buffer AL y 23 µL de DTT 1M;

200 µL de buffer AL y 30µL de proteinasa K;

23 µL de DTT 1M

Las mezclas se homogeneizaron en vórtex y se incubaron durante 1 hora a 56°C; a aquellas mezclas que no contienen de manera inicial buffer AL les fue agregado este reactivo tras la incubación anteriormente mencionada y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente el ADN se extrajo como está descrito en material y métodos y se identificó en geles de agarosa. Figura 12.

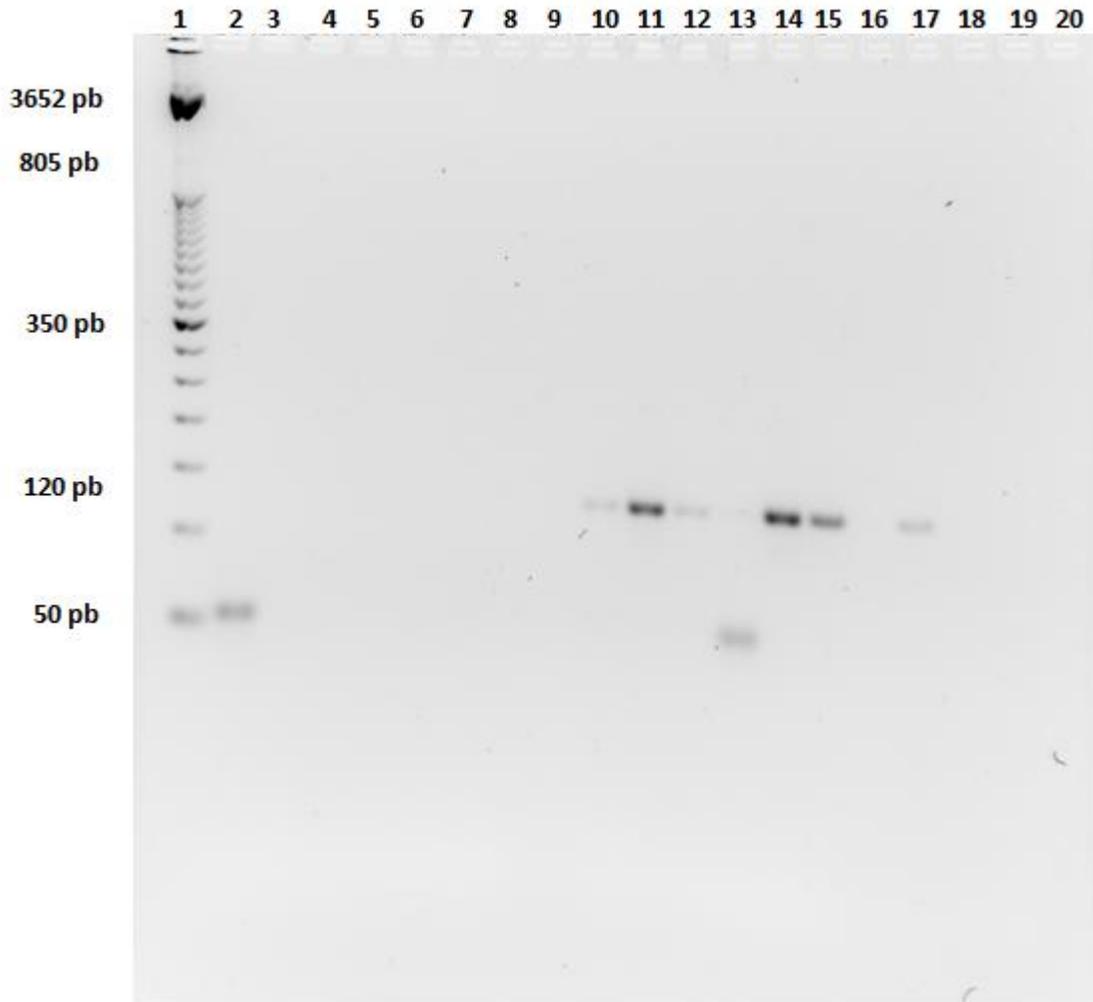


Figura 12. **Amplificación de ADN de *Leishmania* extraído de pelos.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de los primers JW11/12, llevada a cabo en ADN de muestras control de pelo, extraído mediante QIAamp DNA Blood mini kit 250 bajo diferentes tratamientos de lisis. Carril: (1) marcador de peso molecular 50bp; (2) Blanco, muestras negativas tratamientos: (3) buffer AL, DTT y proteinasa K, (4) DTT y proteinasa K*, (5) buffer AL y proteinasa K, (6) buffer AL y DTT, (7) proteinasa K*, (8) DTT*. (9) Carril vacío; muestras positivas tratamientos: (10) buffer AL, DTT y proteinasa K, (11) DTT y proteinasa K*, (12) buffer AL y proteinasa K, (13) buffer AL y DTT, (14) proteinasa K*, (15) DTT*; (16) carril vacío; (17) Control positivo M379, (18) carril vacío; (19) blanco de agua, (20) carril vacío.

*Adición de Buffer AL post incubación

Como se puede apreciar en la figura 12, todas las condiciones de lisis manejadas con el kit permitieron la amplificación del fragmento del ADNk de interés, sin embargo las bandas de los amplicones se observan con diferentes intensidades, siendo las más nítidas las bandas generadas por el tratamiento DTT y proteinasa K (Adición de Buffer AL post

incubación), así como el tratamiento con proteinasa K (Adición de Buffer AL post incubación).

7.2. Amplificación de un fragmento de la beta-globina

Hasta este punto de la experimentación, se habían identificado las condiciones óptimas de lisis en la extracción de ADN de pelo y del parásito cuando éste último se encuentra en el exterior de la muestra biológica seleccionada, sin embargo es necesario demostrar que las condiciones de lisis son aptas para degradar el pelo y liberar cualquier partícula que se encuentre en su interior, ya que es probable que el parásito se encuentre embebido en la corteza del pelo, por lo tanto es necesario encontrar las condiciones óptimas de lisis de la muestra que permita liberar al parásito de la estructura interna del pelo, para llevar a cabo una amplificación por PCR punto final; para esto se procede a realizar la amplificación de un fragmento de 250 pb presente en el gen de la β -globina humana, ubicado en el cromosoma 11, haciendo uso de los iniciadores GH21 y PCO3.

Como se puede observar en la figura 13, todas las condiciones de lisis manejadas permiten la amplificación del fragmento de ADN de interés, siendo las bandas más nítidas generadas por el tratamiento AL, DTT y proteinasa K (Adición de Buffer AL post incubación) así como el tratamiento DTT y proteinasa K (Adición de Buffer AL post incubación).

El tratamiento de lisis consistente en la exposición de la muestra a DTT y proteinasa K (exposición a buffer AL post incubación) permitió la generación de las bandas más nítidas tanto en la amplificación del fragmento de interés del ADNk de *Leishmania* así como de la β -globina humana, por lo tanto se seleccionó como el tratamiento a utilizar en las muestras problema.

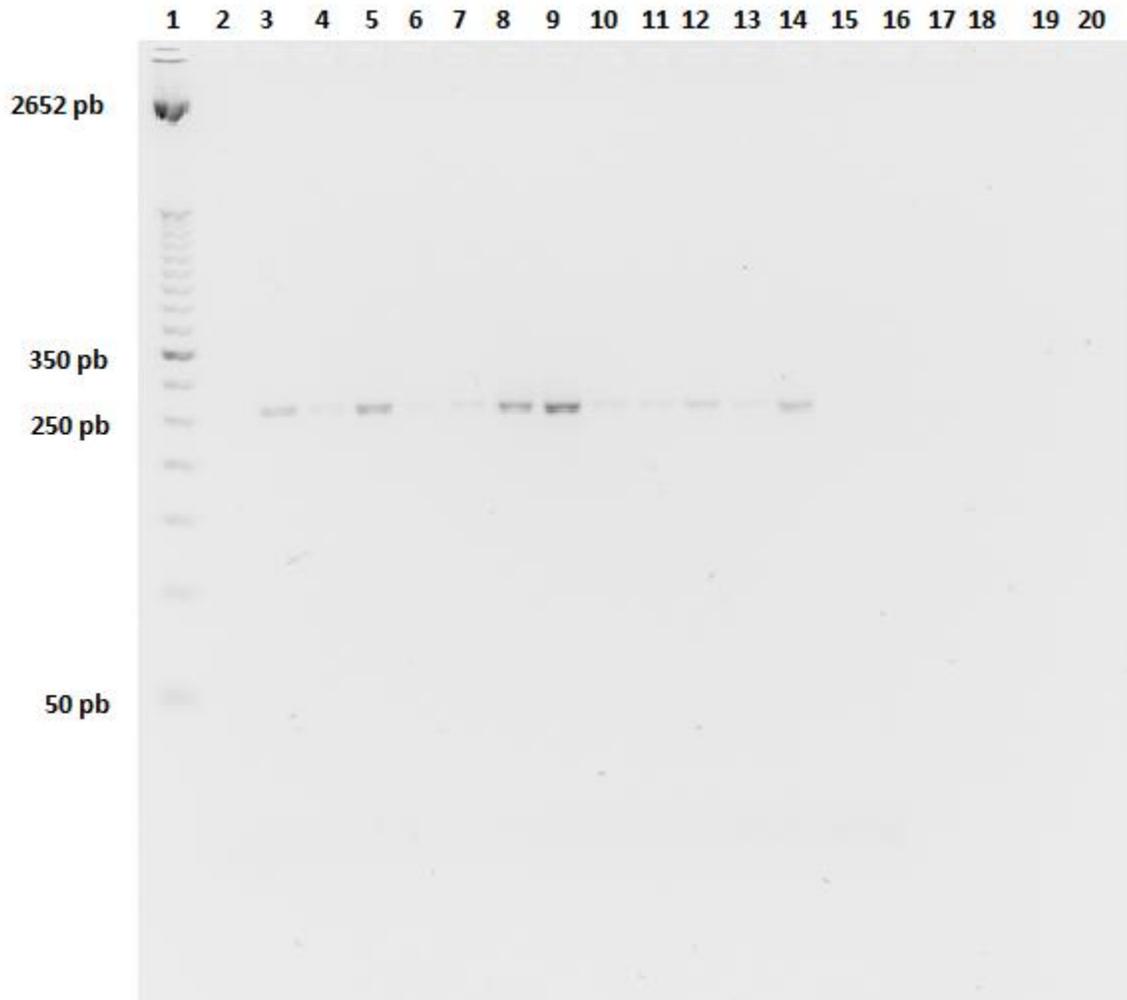


Figura 13. **Corroboración de la adecuada extracción de ADN del pelo.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de un fragmento de 250 pares de bases del gen de la Beta globina con los primers HG21 y PCO3, llevada a cabo en ADN de muestras control de pelo, extraído mediante QIAamp DNA Blood mini kit 250 bajo diferentes tratamientos de lisis. Carril: (1) marcador de peso molecular 50bp Ladder, (2) Blanco 1, muestras negativas tratamiento; buffer (3) AL, DTT y proteinasa K, (4) DTT y AL (5) AL y proteinasa K, (6) Proteinasa K*(7) DTT*, (8) DTT y proteinasa k*; Muestras positivas tratamiento (9)AL, DTT y proteinasa K, (10) DTT y AL (11) AL y proteinasa K, (12) proteinasa k*, (13) DTT*(14) DTT Y proteinasa k *(15) Control positivo M379; (16) Blanco 2,(17,18,19,20) carriles vacíos.

*Adición de Buffer AL post incubación

Se observa la banda esperada de 250 pb en todos los carriles, no importando el tratamiento de lisis al que fueron sometidas las muestras por extracción con QIAamp DNA Blood mini kit 250. El resto de los carriles no presentan amplicón.

7.3 Detección de la presencia de *Leishmania sp.* en muestras biológicas de mapaches y coatíes del parque ecológico La Venta, Tabasco.

Como se observa en las figuras 14 y 15, aquellos prociénidos cuyas muestras permitieron la amplificación de una banda de 120 pares de bases, fueron considerados positivos en la determinación de la presencia de *Leishmania sp.*; los coatíes 2, 4, 14, 15, 18, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29 y 3 presentaron resultados positivos en ADN extraído de pelo, siendo que este último también obtuvo resultado positivo en ADN proveniente de sangre, mientras que solo el coatí 1 presentó resultado positivo en ADN de sangre; así el 46.66% de la población analizada de coatíes fue positiva a la presencia del protozoo, de la totalidad de estos individuos ninguno presentó anticuerpos anti-*Leishmania* durante el periodo de análisis serológico.

Del grupo de mapaches ninguno dió resultados positivos en muestras de ADN de sangre, los individuos 5 y 6 resultaron ser positivos en la determinación del parásito en muestras de ADN de pelo, es decir que el 22.22% de la totalidad de la población analizada fue positivo a la presencia de *Leishmania sp.*, ambos mamíferos resultaron ser seropositivos durante todo el periodo de análisis serológico.

Cabe mencionar que algunas de las muestras de sangre presentaron degradación, como se observa en la figura 16, donde se no se aprecian los ADN genómicos como una única banda sino como un barrido de degradación.

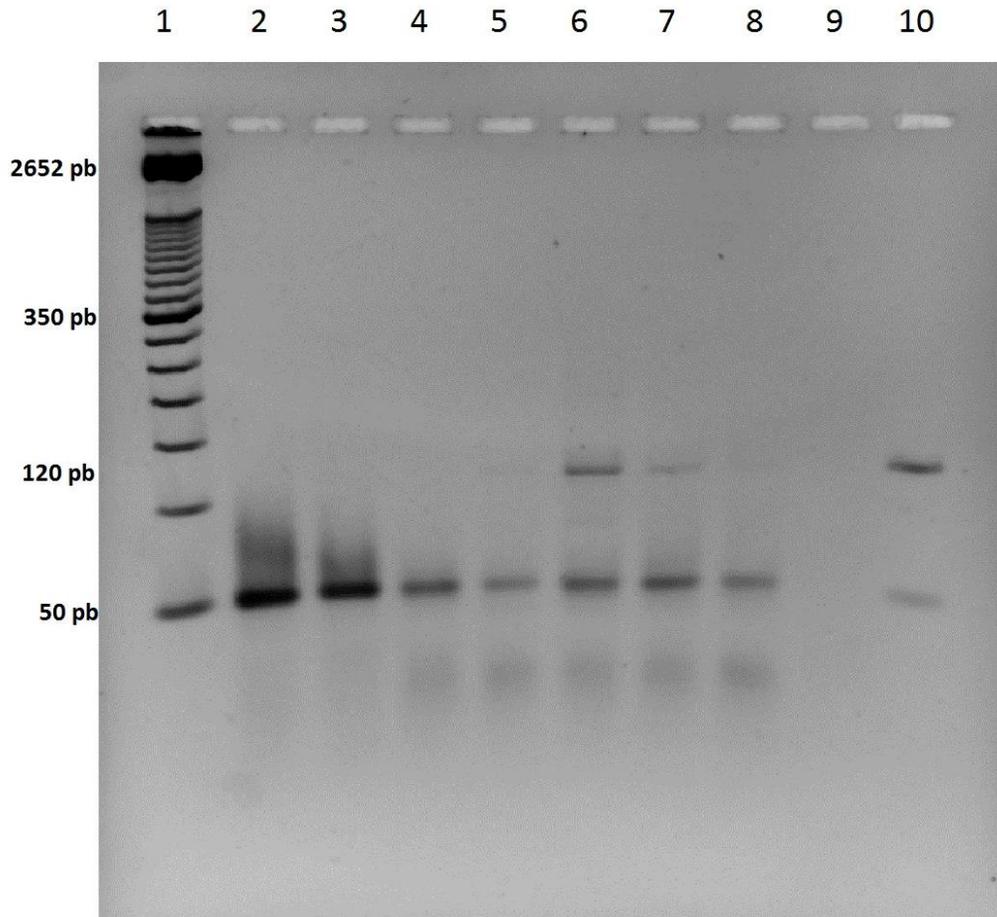


Figura 14. **Análisis de *Leishmania* en el ADN en el pelo de coatíes.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de los primers JW11/12. Carriles: (1) marcador de peso molecular 50 pb, (2) blanco inicial, (3) blanco final; muestras de DNA extraído de pelo :(4) coatí 30, (5) coatí 27, (6) coatí 28, (7) coatí 29, (8) coatí 26 , (9) vacío, (10) control M379.

En la figura 14 se observa la banda esperada de 120 pares de bases en el carril del control positivo, bandas similares se observan en los carriles de las muestras de los coatíes 26, 28 y 29. Se observan bandas inespecíficas de 50 pb y 200 pb atribuidos a la presencia de regiones con secuencias complementarias a las secuencias de los iniciadores utilizados en el genoma de los individuos analizados.

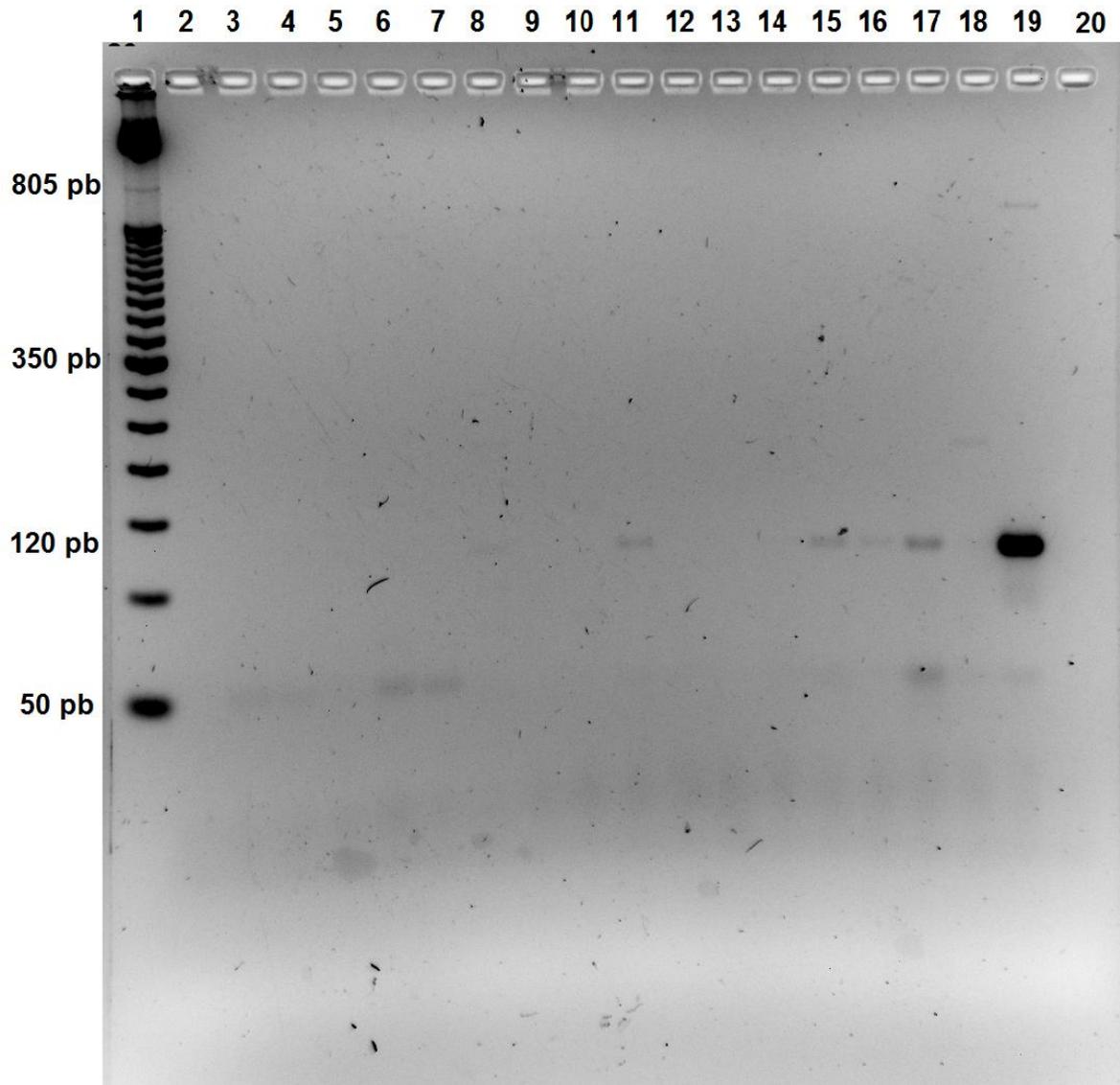


Figura 15. **Análisis de *Leishmania* en el ADN en el pelo de coatíes.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de los primers JW11/12. Carriles: (1) marcador de peso molecular 50 pb, (2) blanco inicial ; muestras de DNA extraído de pelo : (3) negativo, (4) mapache 1 , (5) mapache 2, (6) mapache 3, (7) mapache 4, (8) mapache 6, (9) coatí 1, (10) coatí 7, (11) coatí 3, (12) coatí 5, (13) coatí 6, (14) coatí 8, (15) coatí 14, (16) coatí 15, (17) coatí 21, (18) mapache 7, (19) control M379, (20) blanco final.

Se observa la banda esperada de 120 pares de bases en el carril del control positivo M379, bandas similares se observan en los carriles de las muestras de los coatíes 3, 14, 15, 21 y la muestra del mapache 6.

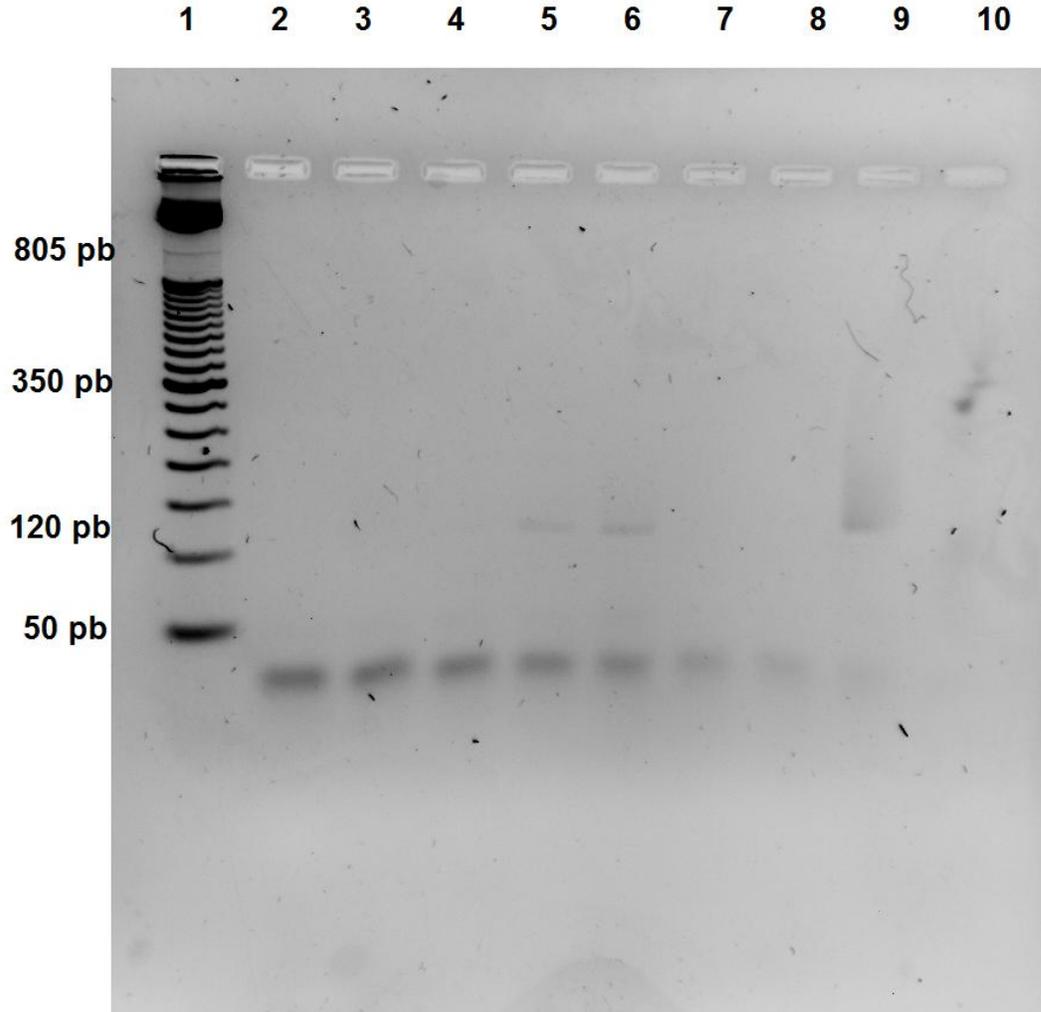


Figura 16. **Análisis de *Leishmania* en el ADN en el pelo de coatíes.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de los primers JW11/12. Carriles: (1) marcador de peso molecular 50 pb, (2) blanco inicial ; muestras de DNA extraído de pelo : (3) negativo, (4) coatí 20 , (5) coatí 22, (6) coatí 23, (7) coatí 24, (8) coatí 25, (9) control M379, (10) blanco final.

Se observa la banda esperada de 120 pares de bases en el carril del control positivo M379, bandas similares se observan en los carriles de las muestras de los coatíes 22 y 23.

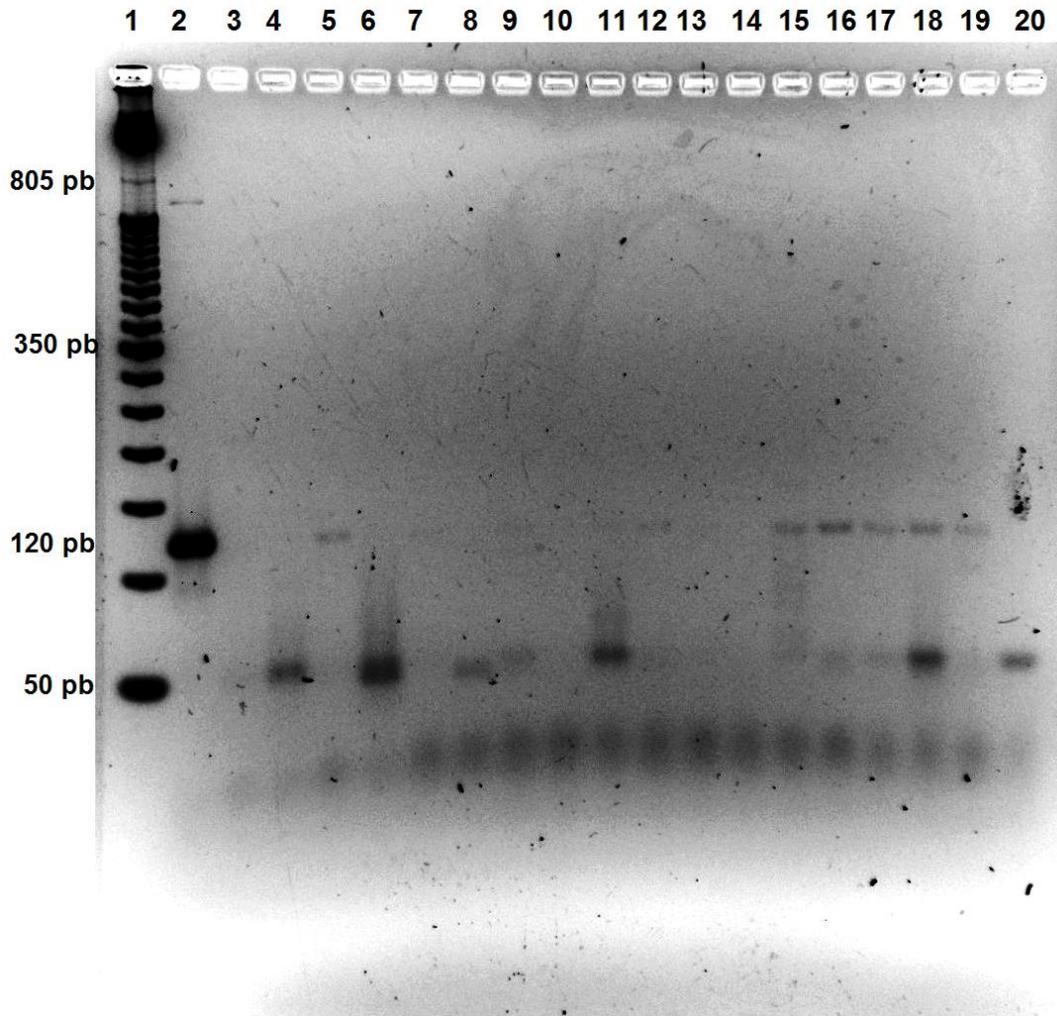


Figura 17. **Análisis de *Leishmania* en el ADN en el pelo de coatíes.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de los primers JW11/12. Carriles: (1) marcador de peso molecular 50 pb, (2) control m379, (3) Blanco inicial; muestras de DNA extraído de pelo : (4) negativo, (5) mapache 6, (6) mapache 2, (7) coatí 22, (8) mapache 4, (9) coatí 23, (10) coatí 1, (11) coatí 2, (12) coatí 18, (13) coatí 19, (14) coatí 6, (15) coatí 4, (16) coatí 14, (17) coatí 15, (18) coatí 21, (19) mapache 5, (20) blanco final.

Se observa la banda esperada de 120 pares de bases en el carril del control positivo M379, bandas similares se observan en los carriles de las muestras de los coatíes 22, 23, 2, 18, 4, 14, 15, 21 y mapache 5.

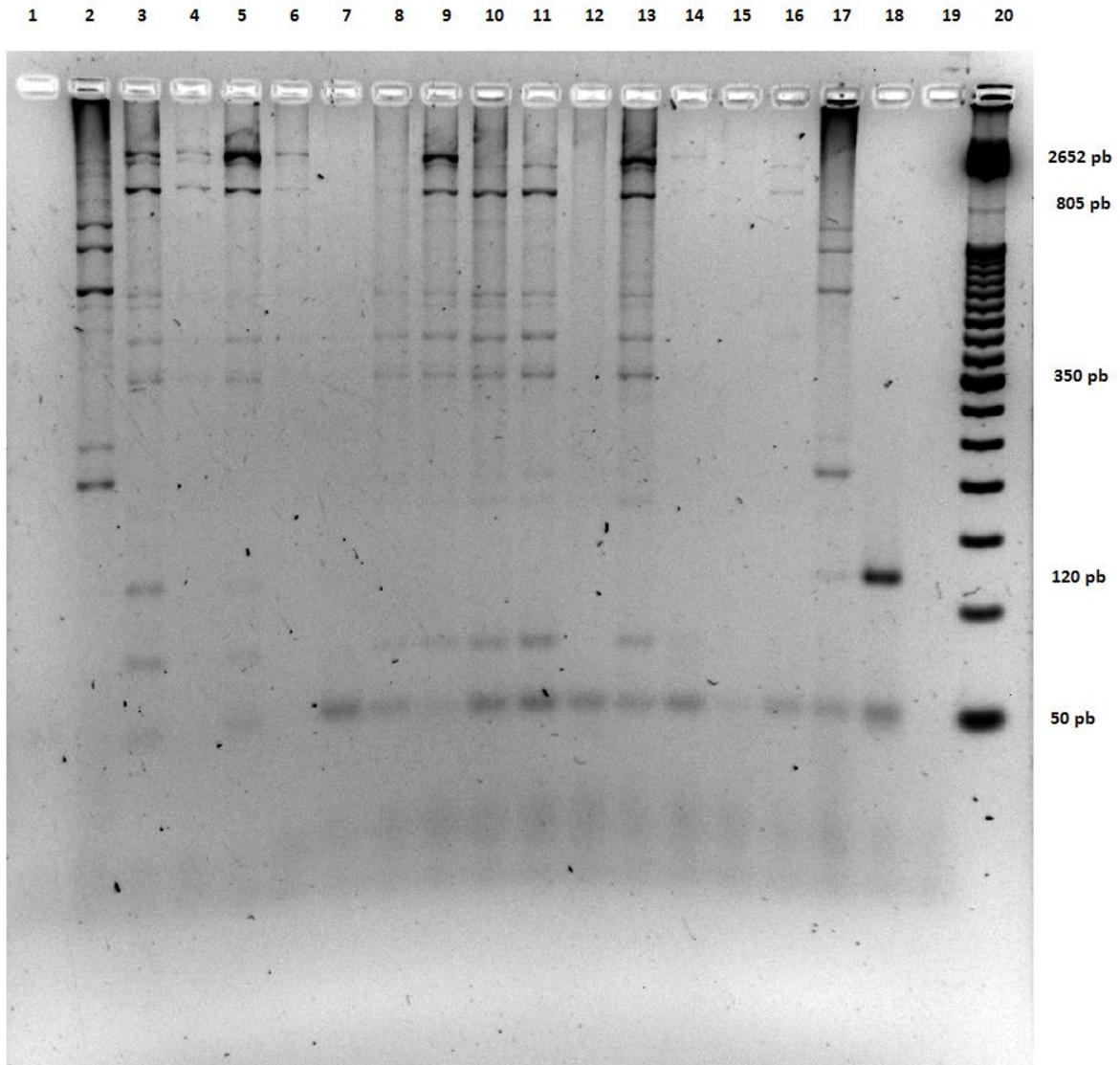


Figura 18. **Análisis de *Leishmania* en el ADN en sangre de coatíes.** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, de los productos de amplificación de los iniciadores JW11/12, llevada a cabo en muestras de DNA extraído de sangre de coatíes. Carriles: (1) blanco inicial, (2) control negativo; muestras de DNA extraído de sangre: (3) coatí 1, (4) coatí 2, (5) coatí 3, (6) coatí 4, (7) coatí 5, (8) coatí 6, (9) coatí 7, (10) coatí 8, (11) coatí 9, (12) coatí 10, (13) coatí 11, (14) coatí 12, (15) coatí 14, (16) coatí 15, (17) control positivo, (18) control m379, (19) blanco final, (20) marcador de peso molecular 50 pb.

Se observa la banda esperada de 120 pares de bases en el carril del control positivo M379, bandas similares se observan en los carriles de: control positivo, las muestras de los coatíes 1 y 3. Se observan bandas inespecíficas de diversos pesos moleculares, atribuidos a la presencia de regiones con secuencias complementarias a las secuencias de los iniciadores utilizados en el genoma de los individuos analizados.

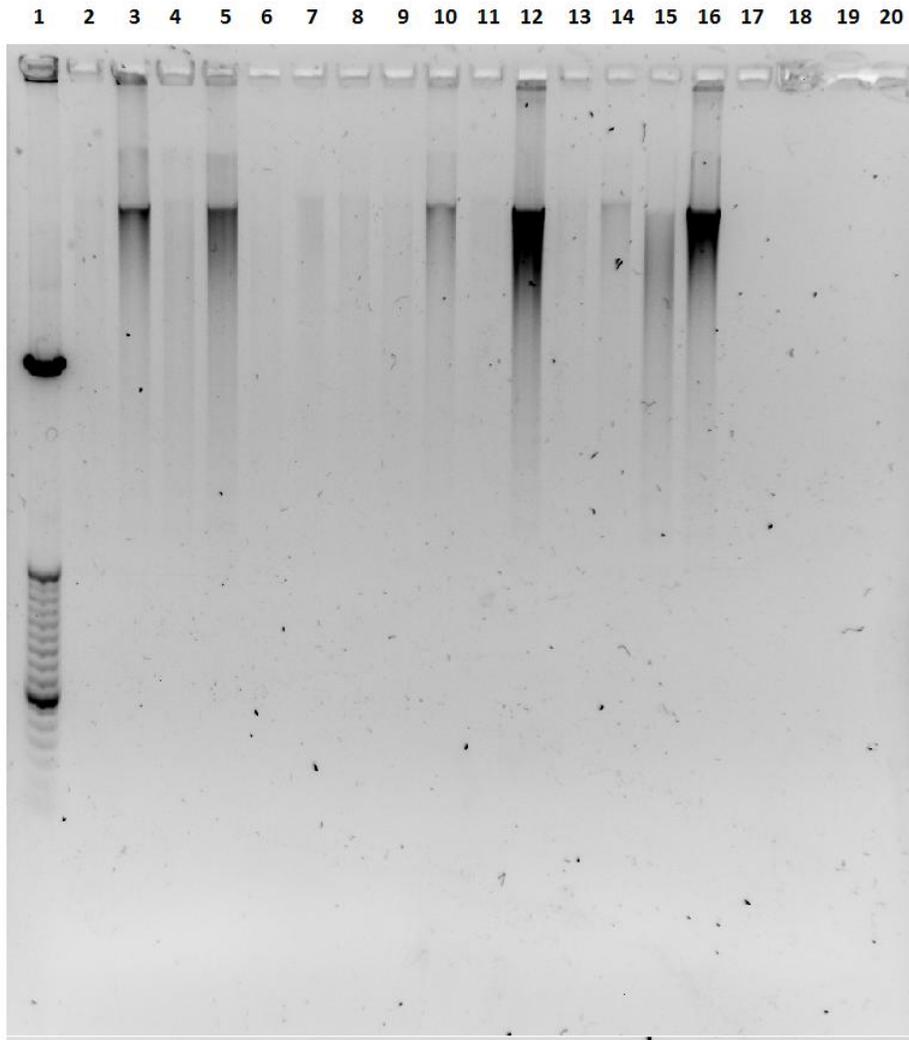


Figura 19. **Determinación de integridad del ADN de prociónidos extraído de sangre.**

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carriles: (1) marcador de peso molecular 50 pb., muestras de DNA: (2) coatí 2, (3) coatí 4, (4) coatí 5, (5) coatí 10, (6) coatí 12, (7) coatí 14, (8) coatí 15, (9) coatí 16, (10) coatí 17, (11) coatí 18, (12) coatí 19, (13) coatí 21, (14) coatí 22, (15) coatí 29, (16) coatí 30, (17)mapache 1, (18) mapache 4, (19) mapache 3, (20) vacío.

Se observa degradación en varias de las muestras de ADN de sangre, en algunos carriles incluso no se aprecia la presencia del mismo.

Tabla 4. Resumen de coatíes positivos

Figura	Carril	Coatí
18	3	1
17	11	2
15	11	3
18	5	4
17	15	14
15	15	15
15	16	18
17	12	21
15	17	22
16	5	23
16	6	26
14	8	27
14	5	28
14	6	29
14	7	
Total		14

Resultados en muestra de pelo

Resultados en muestra de sangre

Tabla 5. Resumen de mapaches positivos

Figura	Carril	Mapache
17	19	5
15	8	6
Total		2

Resultados en muestra de pelo

Tabla 6. Presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en mapaches y coatíes con resultado positivo en la determinación de la presencia de *Leishmania sp.* por PCR punto final en muestras de pelo y sangre.

Población	Número de identificación	Anticuerpos Anti- <i>Leishmania</i>			
		2014		2015	
Coatí	1	0.03	0.02	0.07	0.08
	2	0.04	0.04	0.01	0.08
	3	0.01	0.02	0.07	0.07
	4	0.01	0.03	0.02	0.02
	14	0.03	0.0	0.0	0.0
	15	0.01	0.0	0.0	0.01
	18	0.01	0.02	0.01	0.01
	21	0.05	0.01	0.03	0.02
	22	0.02	0.09	0.01	0.02
	23	0.04	0.0	0.02	0.01
	26	0.04	0.0	0.03	0.03
	27	0.05	0.05	0.05	0.05
	28	0.03	0.0	0.03	0.04
29	0.02	0.0	0.02	0.04	
Mapache	5	0.2	0.21	0.29	0.3
	6	0.23	0.33	0.35	0.3

* El punto de corte para el ensayo inmunoenzimático es 0.2 unidades de absorbancia.

*2014, 2015: año de recolección de la muestra.

Tabla 4. Resultados positivos en la determinación de *Leishmania sp.* por PCR punto final en ADN extraído de muestras biológicas de mapaches y coatíes del parque-museo La Venta, Tabasco.

Población	Individuos	Número de positivos		Número de positivos totales	Porcentaje de positivos totales (%)
		Sangre	Pelo		
Coatíes	30	2	13	14	46.66
Mapaches	9	0	2	2	22.22

Tabla 5. Individuos con resultados positivos en la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania* respecto a los individuos con resultados positivos por PCR punto final.

Población	Individuos con resultados positivos en PCR	Número de positivos totales en serología	Porcentaje de positivos totales en serología (%)
Coatíes	14	0	0
Mapaches	2	2	100

8. Análisis de resultados

Como se muestra en los resultados, el 46.66 % de la población de coatíes analizados dio resultado positivo en la determinación de la presencia del parásito por PCR punto final. Sólo en una de las muestras fue detectada la presencia del parásito exclusivamente en sangre y en otro individuo fue posible detectar el ADN del parásito tanto en pelo como en sangre, en el resto de los casos el ADN de interés fue hallado sólo en una de las muestras biológicas: pelo.

En cuanto a la población de mapaches estudiados, sólo 22.2 % dio resultado positivo en la determinación de la presencia del parásito en pelo. En ninguno de los mapaches se identificó la presencia del parásito en sangre.

Es de gran importancia mencionar que los resultados de la presencia de ADNk de *Leishmania sp.* en muestras sanguíneas no es concluyente en este trabajo ya que el ADN extraído de dicho tejido presentó degradación en numerosos casos. El estado del ADN proveniente de varias de las muestras de sangre pudo haber impedido la amplificación del ADNk de *Leishmania sp.* y por lo tanto no permite determinar si efectivamente el parásito se encuentra presente o no en las muestras analizadas.

En la literatura se atribuye la degradación del material genético a dos factores principales: altas temperaturas durante el periodo de conservación o en su defecto al tiempo de almacenamiento (Payares, 2012, p. 30). La degradación del material genético proveniente de las muestras sanguíneas puede ser atribuida al prolongado periodo de tiempo que las muestras se resguardaron sin ser procesadas, ya que fueron recolectadas en enero de 2016 y (debido a percances relativos a material y reactivos) su procesamiento se llevó a cabo a inicios del año 2017.

Al comparar los porcentajes de organismos que dieron resultados positivos en la detección del parásito, se puede observar que en la mayoría de los casos, el parásito *Leishmania* se detectó en pelo y no en sangre. Esto puede ser atribuido al curso natural de la infección, ya que la especie de parásito que se encuentra en esa zona es parásito con tropismo dérmico.

Uno de los factores a considerar podría ser el comportamiento del protozoario respecto a la temperatura. Se ha sugerido previamente que la distribución de *Leishmania* en el organismo humano puede ser explicada con base en la sensibilidad del parásito a la

temperatura. En humanos la temperatura de la piel es más baja que la temperatura interna, así los parásitos termo-sensibles pueden permanecer en la piel mientras que los parásitos termo-resistentes pueden ir a las vísceras (Callahan, 1996, p. 401).

Se ha demostrado que el tropismo de *Leishmania* en el hospedador humano se correlaciona con la termo-sensibilidad del amastigote *in vitro*: Los amastigotes de especies visceralizantes que están expuestos a temperaturas más altas *in vivo* (37 °C) se replican igualmente bien a temperaturas de 35 a 39 ° C *in vitro*, mientras que las cepas cutáneas que son expuestas a temperaturas más bajas *in vivo* (33 ° C) se replican mejor a temperaturas más bajas *in vitro* <35°C (Berman y Neva 1981; Sacks *et al.*, 1983). Según Engleberg (2017, p. 515), las especies clásicamente asociadas con la variante cutánea de la enfermedad crecen *in vivo* mejor a temperaturas entre los 25°C y 30°C, mientras que las especies asociadas a la variante visceral se desarrollan mejor a 37°C. De acuerdo con lo anterior, podría ser posible que el mismo fenómeno se repita en las especies analizadas (es importante mencionar que no existen estudios en los que se determine la temperatura corporal interna y externa de las especies estudiadas) y así la *Leishmania* hallada en los mapaches y coatíes del parque-museo La Venta podría pertenecer a una especie que por su termo-sensibilidad presente un tropismo por el tejido cutáneo. Lo cual tiene congruencia con las estadísticas reportadas, donde es señalado que Tabasco es sitio endémico de leishmaniosis cutánea y cuya forma principal de presentación es la ulcera de los chicleros (Jheman, 2007, p. 3). Esto es considerable siempre y cuando realmente no haya existencia del parásito en sangre, lo cual en varios de los casos no puede ser determinado por la degradación del ADN. Por otra parte, en los casos en los que se detectó la presencia de *Leishmania* en sangre, se puede considerar que la infección está progresando al estadio visceral o simplemente, que se desprendieron macrófagos infectados de las lesiones, se movieron a través de la linfa y terminaron en la sangre por la descarga de la linfa a la sangre a través del conducto torácico.

Al comparar los resultados obtenidos de la población de coatíes contra lo obtenido en la población de mapaches, se puede determinar que el primer grupo obtuvo un mayor porcentaje de individuos parasitados por *Leishmania*. Sin embargo no es lo más apropiado comparar dichos resultados ya que el número de individuos por población no es equitativo. Si fuese admisible considerar que el parásito afecta en mayor proporción a una de las especies analizadas (*Nasua narica*), se podría atribuir esta preferencia a las características metabólicas o incluso físicas propias de cada especie, ya que los

mosquitos manifiestan preferencias hacia ciertas propiedades como la cantidad de CO₂ emitida en el aliento, a mayor cantidad es más fácil que los flebótomos identifiquen a sus blancos por medio de órganos denominados palpadores maxilares. Así como por las diferencias en la producción de ciertos metabolitos o presencia de bacterias, se podría favorecer que una de las especies sea blanco fácil de interacción con los vectores lo cual aumente la probabilidad de ser infectado con *Leishmania*. En humanos se ha observado una preferencia que depende de los niveles de ácido láctico, ácido úrico y amoníaco en la piel, así como la cantidad y tipo de bacterias sobre este tejido (Stromber, 2013).

También podría considerarse que la diferencia en el número de individuos parasitados por *Leishmania* en los grupos estudiados no se atribuya al comportamiento del parásito respecto a la especie hospedadora, sino a la muestra utilizada, ya que las especies comúnmente asociadas a la leishmaniosis cutánea tienden a localizarse en orejas, nariz, patas y cola, donde la temperatura es menor que en otras partes del cuerpo (Lainson, 1989, p. 206). En este caso se desconoce el sitio corporal de donde se extrajeron las muestras de pelo en cada uno de los individuos. Así puede ser probable que algunas de las muestras fueran tomadas de sitios en los que haya menor probabilidad de hallar al protozoario.

Al comparar los resultados obtenidos de la PCR punto final con los resultados de serología, se puede observar que ninguno de los individuos de la especie *Nasua narica* que fue positivo en PCR, presentó anticuerpos en el periodo de tiempo de análisis.

Al contrario de los miembros de la especie *Procyon lotor*, cuyos individuos con resultados positivos en PCR presentaron anticuerpos anti-*Leishmania* en el periodo de análisis comprendido entre los años 2014 y 2015.

Lamentablemente la recolección de muestras para llevar a cabo la determinación de la presencia de *Leishmania* a través de PCR punto final y las muestras para realizar las pruebas de serología no ocurrió al mismo tiempo; puede ser posible que en el momento de la captura, los prociónidos que no presentaron anticuerpos anti-*Leishmania* realmente no se encontraban parasitados. Así mismo podría ser considerado que la parasitosis se adquirió durante el lapso transcurrido entre la recolección de las muestras o que a pesar de no mostrar una respuesta sero-positiva, estos animales se encontraran infectados, de ser este el caso, un factor por el cual haya sido posible detectar al parásito pero no anticuerpos sea precisamente el tiempo de infección ya que de ello depende que se pueda detectar tanto al agente infeccioso como los anticuerpos. Puede ser posible que la

infección tenga un tiempo lo suficientemente prolongado para poder detectar a *Leishmania* en muestras como el pelo, pero no para detectar respuesta humoral. Por ejemplo, en perros la producción de anticuerpos IgG o seroconversión se desarrolla durante los meses siguientes al momento de la infección, la media es de unos 5 meses para la infección natural y 3 meses para la infección experimental (Moreno, 2002, p. 402). Por otra parte en modelos murinos donde se ha llevado a cabo la infección experimental se ha podido detectar la presencia del parásito en pelo (por PCR tiempo real) alejado de la zona de inoculación a partir de la tercera semana (Inieta 2013). Fenómeno que podría haber sido similar en los coatíes, sin embargo se trata de un número elevado de individuos que presentan resultados discordantes en la serología y la PCR, existen estudios en infantes humanos donde se han obtenido resultados similares, donde no hay correlación entre los resultados de PCR, serología y manifestaciones clínicas para la determinación de infección por *Leishmania*.

En Brasil, por ejemplo, se llevó a cabo un seguimiento de neonatos durante 18 meses. Las madres de dichos neonatos no presentaron signos clínicos sugestivos de leishmaniosis sin embargo algunas de ellas presentaron anticuerpos anti-*Leishmania*, en la mayoría de los neonatos los resultados de las pruebas serológicas y PCR obtenidas mostraron la presencia de seroconversión pero resultados negativos en PCR y viceversa. Al final del estudio, 17 niños de 18 meses de edad tenían al menos una prueba de diagnóstico de leishmaniosis positiva. Sin embargo no hubo manifestación clínica de la enfermedad. Por otra parte dos neonatos, a los 6 y 12 meses respectivamente presentaron signos de la enfermedad como hepato-esplenomegalia, tos seca, pérdida de peso y fiebre. Sin embargo los análisis de PCR fueron negativos en todo momento y solo en uno de ellos la serología arrojó resultados positivos hasta el momento de la presentación clínica de la enfermedad (Borges, 2014). Se piensa que este tipo de fenómenos se asocia a la transmisión vertical de *Leishmania*, descrita en numerosos estudios (Boggiato, 2011; Avila-Garcia, 2013; Teichman, 2011; Magno, 2009; Papageorgios, 2010), ya que esta clase de transmisión puede desempeñar un papel importante en el curso de la enfermedad. Todo dependerá del momento en el que el parásito establezca contacto con el sistema inmune fetal: antes del reconocimiento de los antígenos propios o después de este periodo. Si el sistema inmune tiene contacto con los antígenos de *Leishmania* antes del momento del autorreconocimiento podría conducir a la tolerancia, lo que hace que un individuo sea específicamente tolerante e insensible o incluso susceptible a la infección. En el escenario alternativo, la infección después del

autorreconocimiento permitiría el desarrollo adecuado de clones de linfocitos T en respuesta a antígenos de *Leishmania*, proporcionando resistencia a la enfermedad (Galindo-Sevilla y Mancilla-Ramirez, 2018). Es probable que estas especies, por habitar en una región endémica de la enfermedad, sean altamente susceptibles de la transmisión vertical de la parasitosis. Así, el contacto en un punto determinado de tiempo entre el sistema inmune del feto y los antígenos del parásito será determinante del curso de la infección: como se mencionó anteriormente, en aquellos individuos cuyo primer contacto con el protozoario fuese antes del reconocimiento de autoantígenos, los antígenos de *Leishmania* serían reconocidos como antígenos propios, lo cual sería traducido en la no producción de anticuerpos contra el parásito, así como el nulo control de la infección. Por el contrario, en el caso de aquellos individuos en los que el contacto entre el parásito y el sistema inmune del individuo durante el periodo fetal haya sido después de la fase de reconocimiento de los auto-antígenos, se observaría una producción de anticuerpos y limitación de la parasitosis.

Sería muy prudente llevar a cabo un seguimiento a largo plazo de estos prociónidos ya que en vista del promedio de vida que ambas especies tienen (entre 8 años en estado salvaje y 13 años en cautiverio (Kalman y Crossingham 2013, p. 8; Hoagstrom 2002, p. 1348) y con base en el tiempo que persista la parasitosis, así como los signos de la infección que estos presenten, podrían comenzar a descartarse o considerarse como verdaderos reservorios, ya que una de las características que deben cumplir es que tengan un promedio de vida largo y que mantengan la parasitosis por un gran periodo de tiempo respecto a su tiempo de vida (OMS, 2010).

9. Conclusiones

Para el análisis de la presencia de *Leishmania sp.* en muestras de pelo de los prociónidos analizados que habitan el parque-museo La Venta, Tabasco, el mejor método de extracción de ADN resultó ser el QIAamp DNA Blood mini kit 250, donde el tratamiento de lisis óptimo consiste en la exposición de la muestra a DTT y proteinasa K, con la adición de buffer AL posterior a la incubación a 56 °C durante 1 hora.

Del total de la población analizada en el presente trabajo, conformada por 30 coatíes y 9 mapaches habitantes del parque museo La Venta, Tabasco; el 46.66% y el 22.22 % respectivamente arrojaron resultados positivos en la determinación de la presencia de *Leishmania sp.*

El mayor porcentaje de resultados positivos se manifestó en las muestras de pelo, sin embargo los resultados obtenidos en las muestras de sangre no son concluyentes ya que un gran número de estas presentaron degradación.

De la población de coatíes que arrojaron resultados positivos en PCR punto final, ninguno manifestó anticuerpos anti-*Leishmania*. Al contrario de los mapaches, que en los dos casos donde hubo resultados positivos por PCR punto final se mostró la presencia de anticuerpos contra el protozooario.

10. Bibliografía

1. Acharya T. (2013). Key points for the laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Microbeonline. Consultado el 18 de agosto de 2018. Extraído de: <https://microbeonline.com/key-points-laboratory-diagnosis-visceral-leishmaniasis/>
2. Apt, W. (2013). Parasitología Humana. Chile: McGraw-Hill interamericana.
3. Arts, G. y Benne, R. (1996). Mechanisms and evolution of RNA editing in kinetoplastida. Biochimica et Biophysica Acta. 1307 (1): 39-54.
4. Avila-García, M., Mancilla-Ramírez J., Segura-Cervantes E., Farfan-Labonne B., Ramírez-Ramírez A., Galindo-Sevilla N.(2013). Transplacental Transmission of Cutaneous Leishmania mexicana Strain in BALB/c Mice. American Journal of Tropical Medicine. 89(2): 354–358.
5. Arts, G. y Benne, R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. Biochim Biophys Acta, 1307 (1): 39-59.
6. Barral, A., Petersen E., Sacks, L.,(1983). Late Mestastasic leishmaniasis in the mouse. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 32(2):277-85.
7. Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Gutiérrez Kobe, L., Hernández Ruiz, J. (2014). Leishmaniasis. En Becerril (Ed.) Parasitología Médica. (4ª). México: McGraw-Hill interamericana.
8. Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta V., Parejo J., Fernández-Cotrina, L., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.(2013). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 192 (1-3):43-50.
9. Berman, J. y Neva, F. (1981). Effect of temperature on multiplication of Leishmania amastigotes within human monocyte-derived macrophages in vitro. J. Parasitol. 67 (20): 318-21.
10. Boggiano, P., Gibson-Corley, K., Gallup, J., Hostetter J., Mullin, K. y Petersen, C. (2011). Transplacental Transmission of Leishmania infantum as a Means for Continued Disease Incidence in North America. Neglected Tropical Diseases. 5(4):e1019.
11. Borges, D., Almeida, T., Gomez, L., de Oliveira, E., Gomes, M., Faria, R., Avelar, D., Ronaldo, R., Furtado, E., Rabello, N. y de Almeida, L.(2014). Infection with Leishmania (Leishmania) infantum of 0 to 18-month-old children living in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. American Journal of tropical medicine and hygiene. 91(2): 329–335.

12. Callahan, H., Portal, I y Grogl, M.(1996). Leishmania spp: Temperature Sensitivity of Promastigotes in Vitro as a Model for Tropism in Vivo. *Experimental Parasitology*. 84(3):400-9.
13. Canevari, M y Vaccaro, O. (2007). *Guía de Mamíferos del Sur de América del Sur*. Argentina: Literature of Latin American.
14. Carrada, G., Leal, V., Jiménez, A. y López, J. (2014). Transmisión de leishmaniosis cutánea asociada con plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco. *Gaceta Médica de México*. 150: 499-508.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Leishmania. Recuperado de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>.
16. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2015). *Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniosis*. Subsecretaría de prevención y promoción de la salud: México.
17. Dahroug, M.A., Almeida, A.B., Sousa, V.R., Dutra, V., Guimaraes, L.D., Soares, C.E., et al., 2011. The first case report of Leishmania (leishmania) chagasi in Panthera leo in Brazil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.1(3): 249–250.
18. Durrani, A., Durrani, H., Kamaal, N. (2012). Prevalence of Leishmania in sanfly in Pakistan. *Pakistan Journal of zoology*. 1 (44): 61-65.
19. Engleberg, N., DiRita, V. y Dermody, T.(2017). *Mechanisms of microbial disease (5ª)*. EUA: Wolters Luwer.
20. Espinosa L. (2007). Capítulo 17 *Guía práctica sobre la técnica de PCR*. En *Ecología molecular (517-536)*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
21. European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). *Phlebotomine sand flies-Factsheet for experts*. Consultado el 9 de septiembre de 2018. Extraído de: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>.
22. Galindo-Sevilla, N., Mancilla-Ramirez, J.(2018). Immune response of children born to Leishmania infected mothers. *Parasite Immunology*.
23. Gil, F., Fernández, M., Durán, G., Martínez, B., Zanduetta, L. y Gimeno, J. (2014). Leishmaniosis cutánea como diagnóstico diferencial de un impétigo de evolución tórpida: a propósito de un caso. *Dermatología Pediátrica*, 72(9): 311-314.

24. Gehrt, S. D. y Fritzell, E. K. (1999). Behavioural aspects of the raccoon mating system: determinants of consortship success. *Animal Behaviour*, 57(3): 593-601.
25. Glatston, A.R. (1994). *The Red Panda, Olingos, Coatis, Raccoons, and their Relatives*. Switzerland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.
26. Goldsmith, R. y Heyneman, D. (1995). *Parasitología y medicina tropical*. México: Manual moderno.
27. González, A., Osorio, C. y Talamás, P. (2017). Leishmaniosis. *Ciencia*. 68 (1) 38-41.
28. González-Maya, J.F., Rodríguez-Bolaños, A., Pinto, D. and Jiménez-Ortega, A.M. 2011. Recent confirmed records and distribution of the White-nosed Coati *Nasua narica* in Colombia. *Small Carnivore Conservation* 45: 26-30.
29. Greenwood, R. J. (1982). Nocturnal activity and foraging of prairie raccoons *Procyon lotor* in North Dakota. *American Midland Naturalist*, 107(2): 238-243.
30. Grevelink, S., Lerner, E. (1996) Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of dermatology*;34(1) :257- 72
31. Gupta, G., Oghumu, S. y Satoskar, A. (2013). Mechanisms of immune Evasion in Leishmaniosis. *Advances in Applied Microbiology*. 82:155-84.
32. Handman, E. (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(2):229-43.
33. Hoagstrom, C. *Magill's Encyclopedia of Science: Animal Life*. EUA: Salem Press.
34. Hogan, A. (1988). Two independent loci for albinism in raccoons *Procyon lotor*. *Journal of Heredity*, 79(5): 387-389.
35. Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V. Gómez-Luque, A., Parejo, J., Alonso, C., Gómez-Nieto, L. (2013). Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Tropica*. 128(3):468-72.
36. Instituto Estatal de Cultura de Tabasco. (2018). Parque Museo La Venta. Recuperado de: <http://iec.tabasco.gob.mx/parque-museo-venta>
37. Isaak-Delgado, A., Romero-Callejas E., Acosta-Gutierrez R., Rendón-Franco, E., Villanueva-García, C., Muñoz-García, C. (2013). Identification of ectoparasites of

- coatimundi (*Nasua narica*) and Raccoons (*Procyon lotor*) in the museum of La venta in Villahermosa, Tabasco. *Entomología Veterinaria*. : 1309-1312.
38. Jheman. J. (2008). Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México. *Dermatología Revista Mexicana* 52 (1): 3-9.
 39. Kalman, B. y Crossingham, J. (2003). The life cycle of a raccoon. EUA: Crabtree Publishing Company.
 40. Karram, S., Loya, A., Hamam, H., Habib, R.H., Khalifeh, I., 2012. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. *Journal of Cutaneous Pathology* 39 (4): 406–412.
 41. Killick- Kendrick, R. 1978. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. *Acta Tropica*. 35 (4): 297-313.
 42. Kumar, A. (2013). *Leishmania and leishmaniasis*. India: Springer.
 43. Lainson, R., Braga, R., de Souza, A., Pova, M., Ishikawa, E., Silveira, F., (1989). *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de parasitologie humaine et compare*. 64 (3): 200–207.
 44. Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, A., Loeblich, A., Lom, J., Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G. (1980) A newly revised classification of protozoa. *Journal of protozoology*, 27 (1), 37-58.
 45. Lima, V., Santiago, M., Sanches, L., Lima, B., (2012) Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, Sao Paulo, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 43 (4), 943–945.
 46. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Perú. 2000:08-83.
 47. Moreno J, Alvar J., (2002): Canine leishmaniosis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* 18(9):399-405.
 48. Muñoz-Madrid, R. , Belinchón-Lorenzo, S. , Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J. , Parejo, J., Serrano, F., Monroy, I. , Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.(2013). First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta tropica*. 128(3):706-709
 49. Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G. (2002). Real time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of clinical microbiology*. 40 (5):1666-1669.

50. Organización Mundial de la Salud. (2010). Control de la Leishmaniosis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniosis. Suiza.
51. Organización Mundial de la Salud. (2018). Leishmaniosis, nota descriptiva. Extraído de: <http://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/index.html>.
52. Papageorgiou, T., Pana Z, Tragiannidis A, Tsotoulidou V, Pratsiou E, Tzouveleki G, Athanassiadou F (2010). The first case of congenital leishmaniosis in a female infant in Greece. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 46 (10): 611-612.
53. Payares, N. y Mancilla, L. (2012). ADN de alta calidad a partir de sangre total almacenada por largo tiempo para amplificación por PCR. *Ciencia & Salud*.1(1):29-34.
54. Petrie, K. (2015). Raccoons. EUA: Checkerboard library.
55. Quinonez-Díaz, L., Mancilla-Ramirez, J., Ávila-García, M., Ortiz-Avalos, J., Berron, A., González, S., Paredes, Y., Galindo-Sevilla, N. (2012). Effect of ambient temperature on the clinical Manifestations of experimental difusse cutaneous Leishmaniasis in a rodent model. *Vector-borne and zoonotic diseases*. (12)10: 851-859.
56. Rebollar (1995). Bionomía de *Lutzomyia spp.*(diptera: psychodidae) vectores de leishmaniosis cutánea localizada en el área endémica del Ejido La Libertad, Escárcega, Campeche, México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
57. Rivas, L., López, M.(1993). Parasitología molecular. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
58. Rodino, A. (1981). Fauna Silvestre de la Provincia de Corrientes: Clase Mamíferos. Sus principales especies. Argentina: Secretaría de Agricultura y Ganadería.
59. Rodríguez, G. (2018). Coatí. Patrimonio natural. Recuperado de <http://www.patrimonionatural.com/HTML/especies/mamiferos/coati/descripcion.asp>
60. Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana.(3ª) México: Médica Panamericana.
61. Roque,A. y Jansen, M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. *International Journal of Parasitology*. 3 (3): 251-262.

62. Roviroso-Hernández ,M., García-Orduña, F., Morales-Mávil, J., Hernández-Salazar, L., Hermida-Lagunes, J., Lagunes-Merino, O., Fuentes-Anaya, T. (2012). Valores hemáticos y química sanguínea de una población en semi-libertad de coati nariz blanca (*Nasua narica*) en La Venta Tabasco, México. *Acta zoológica Mexicana*. 28 (2):1302-1319.
63. Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230 (4732): 1350-4.
64. Salazar, M. y Castro, E. (2001). Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997-1999. *11 (1):21-25*.
65. Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N. , Regis-Roggero, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*. 14 (2): 92.
66. Sanguenza, O., Sanguenza, J., Stiller, M. y Saguenza, P. (1993). Mucocutaneous leishmaniasis: a clinicopathology classification. *Journal of the American Academy of Dermatology* 28 (6) :927-932.
67. Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. y Sierra, E. (2018) PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. México: Instituto nacional de ecología y cambio climático. Recuperado el 20 de septiembre de 2017 de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
68. Service M. (2008) Phlebotomine sand-flies. In: Service M, Editor. *Medical Entomology for Students*.(4^a). Cambridge: Cambridge University Press.
69. Silva, M., Ribeiro, V., Ribeiro, R., Tafuri, W y Michalick, M. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 166(1-2):159-62.
70. Simpson,L., Simpson, A., Kidane, G., Livingston, L y Spithill, t.(1980). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*.. 29 (5): 1053-1063.
71. Smithsonian's National Zoo & Conservation Biology Institute. White-nose coati. E.U.A. Recuperado el 5 de octubre de 2017 de <https://nationalzoo.si.edu/animals/white-nosed-coati>
72. Stevens, J., Noyes, H., Schofield, C. y Gibson, W. (2001). The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*. 2001 (48). 1-56.

73. Stromberg, J. (2013). Why Do Mosquitoes Bite Some People More Than Others?.
Smithsonian. Recuperado el 6 de Octubre de 2017 de:
<https://www.smithsonianmag.com/science-nature/why-do-mosquitoes-bite-some-people-more-than-others/>
74. Tamay, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad. 2(2): 70-78.
75. Tay, Z., Lara, R., Gutiérrez, A. y Velasco, C.(2002).Parasitología Médica. (7^a). México: Méndez Editores.
76. Teichman, C.. (2011). Evidence of Venereal and Transplacental Transmission of Canine Visceral Leishmaniosis in Southern Brazil. Acta Scientiae Veterinaria. Brasil.
77. Urban, D. (1970). Raccoon populations, movement patterns, and predation on a managed waterfowl marsh. Journal of Wildlife Management, 34(2): 372-382.
78. Vickerman,K. y Preston,T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. J. Cell Sci., 6, 365-383.
79. Young, D., Lawyer, P.(1987). New World vectors of the leishmaniasis. In: K.F. tarris (ed.) Current Topics in Vector Research, "ol. 4. Sprinyer-Verlag, Nueva York Inc.

Anexo 1

Preparación de soluciones

1. Solución tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x

Tris-base 2.0 M, ácido acético glacial 1.0 M y EDTA 0.5 M; pH 8.0 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri USA).

2. Buffer de lisis NET 100

NaCl 100 mM, Tris HCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 2% , - y Proteinasa K (4 µL/mL de solución (Qiagen Sciences, Maryland, USA).