



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



“IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE  
MUESTRAS DE LEISHMANIASIS PARA LA EXTRACCIÓN DE  
DNA EMPLEADO EN PCR EN TIEMPO REAL.”

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO  
PRESENTA

VÍCTOR WILFREDO MARIÑO CARRASCO  
DIRECTOR DE TESIS: M EN C. OCTAVIO CESAR  
RIVERA HERNÁNDEZ  
ASESOR Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO  
BIOQUÍMICA CLÍNICA



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.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Leishmania, departamento de Parasitología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos bajo la dirección del M en C. Octavio Cesar Rivera Hernández Jefe del Laboratorio de Leishmania con la asesoría del Q.F.B. José Oscar González Moreno de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme las herramientas necesarias para desarrollarme académica y profesionalmente.

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Gabriela Meneses Ruiz, al M. en C Octavio Cesar Rivera, al M. en C José Pablo García Ruiz, al Esp. en Sc. Rafael Acata, al QFB José Oscar González Moreno a la QFB. María del Rocío Robledo, al QFB. Cristhian Gilberto Zúñiga Ortega, a la QFB. Lidia Crescencio y a la Tec. Beatriz Ornelas Pérez por todo el apoyo y dedicación que tuvieron para transmitirme tanto sus conocimientos científicos, como personales que me permiten desarrollarme hoy en día como un profesional de la salud.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES.**

A mi madre Emilia Carrasco y hermana Andrea Mariño por ser mi inspiración día con día, por demostrarme cada mañana, que sin importar la situación en la que nos encontremos siempre podemos salir adelante, por siempre creer en mí, por apoyarme todo este tiempo a pesar de las muchas adversidades que se han presentado.

Un tardío y póstumo agradecimiento a mi padre Wilfredo Mariño por enseñarme todo, en especial que las experiencias que necesitamos en la vida son compradas, nunca imagine que esta última enseñanza de vida que me diste sería tan cara, no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí, todo ese sacrificio junto a mamá simplemente gracias y perdón por haberme tardado tanto.

A mi novia Itzayana Alva, por siempre estar a mi lado aun en los momentos más difíciles, por escucharme y sobre todo por aguantarme. Gracias por evitar que me hundiera más cuando ya no podía con el estrés y el cansancio rescatándome con esa hermosa sonrisa.

## Contenido

Capítulo

Página

Índice

Índice .....	III
Índice de cuadros .....	IV
Índice de graficas .....	V
Índice de Ilustraciones .....	VI
Índice en general .....	II

## Índice en general

1	Resumen	1
2	Introducción	2
2.1	Generalidades de <i>Leishmania</i>	2
2.1.1	Morfología	5
2.1.2	Ciclo de reproducción	6
2.1.3	Formas clínicas	7
2.2	Diagnóstico de Leishmaniasis	13
2.2.1	Microscopia	13
2.2.2	Inoculación en animales de laboratorio	14
2.2.3	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	15
2.3	Agentes conservadores de DNA durante el muestreo	16
2.4	Solución Guanidina EDTA	17
2.5	Extracción de ADN	18
2.6	PCR	20
2.7	PCR en tiempo real	23
3	Justificación	24
4	Objetivo General	25
5	Hipótesis	26
6	Metodología	27
6.1	Tipo de Estudio	27
6.2	Análisis de resultados	27
6.3	Procedimiento	27
6.3.1	Materiales y reactivos	27
6.3.2	Materiales biológicos	28
6.3.3	Equipos	28
6.3.4	Inoculación en Hámster	29
6.3.5	Eutanasia de Hámster y Obtención de Material Biológico	29
6.3.6	Examen directo (microscopia)	29
6.3.7	Extracción de DNA	30
6.3.8	PCR Tiempo Real	30
7	Diagrama de flujo	32

8	Resultados	34
8.1	Resultados de la infección en Hámsteres	34
8.2	Resultados de PCR	38
9	Discusión	45
10	Conclusiones	51
11	Referencias	52
12	Anexos	54
12.1	Material para inoculación en Hámster	54
12.2	Eutanasia de Hámster y Obtención de Material Biológico	54
12.3	Material para Examen directo (microscopia)	55
12.4	Material para Extracción de DNA	56
12.5	Material para PCR Tiempo Real	57
12.6	Preparación de la Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS 1X) 1L	57
12.7	Preparación del Colorante de Giemsa	58
12.8	Preparación de la Solución de Guanidina 6N con EDTA 0.2M 1L	58
12.9	Cantidades y reactivos Master Mix	58

## Contenido

Capítulo	Página
Índice de cuadros	
Número	
Cuadro 1 Inflamación contra amastigotes en tinciones.	35
Cuadro 2 Resultados qPCR.	42
Cuadro 3 CP's inversos.	44

## Contenido

Capítulo	Página
Índice de graficas	
Número	
Gráfica 1 Grafica de amplificación de todas las muestras y controles.	38
Gráfica 2 Grafica de amplificación Blancos y Controles.	39
Gráfica 3 Grafica de amplificación de las laminillas.	39
Gráfica 4 Grafica de amplificación de las muestras que no recibieron tratamiento.	40
Gráfica 5 Grafica de amplificación de las muestras que si fueron tratadas.	40
Gráfica 6 Grafica de amplificación de las muestras después de la Eutanasia.	41
Gráfica 7 Resultados de PCR.	43
Gráfica 8 Resultados de PCR inversos.	44

Contenido	Página
Capítulo	
Índice de Ilustraciones	
Número	
Ilustración 1 Clasificación taxonómica de Leishmania.	3
Ilustración 2 Distribución geográfica de Leishmaniasis en las Américas	4
Ilustración 3 Formas parasitarias de Leishmania spp.	5
Ilustración 4 Hembra del genero Lutzomyia spp alimentándose.	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 5 Ciclo de vida de Leishmania spp.	6
Ilustración 6 Lesión en un caso de Leishmaniasis cutánea.	7
Ilustración 7 Lesiones en caso de Leishmaniasis cutánea diseminada.	8
Ilustración 8 Lesiones en un caso de Leishmaniasis Mucocutánea	10
Ilustración 9 Esplenomegalia y hepatomegalia Leishmaniasis Visceral.	11
Ilustración 10 Lesiones en la espalda causadas por Leishmania spp.	12
Ilustración 11 Tropismo de Leishmania spp	12
Ilustración 12 Amastigotes de Leishmania spp.	13
Ilustración 13 Hámster dorado.	14
Ilustración 14 Promastigotes de Leishmania spp.	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 15 Bandas de un corrimiento electroforético.	15
Ilustración 16 IFI	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 17 Placa de ELISA para determinar Leishmaniasis	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 18 Inyección de Leishmanina.	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 19 Ampolletas de Glucantime	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 20 Molécula de Guanidina y EDTA	17
Ilustración 21 Condiciones del termociclador	31
Ilustración 22 Inflamacion en pata del hámster.	34
Ilustración 23 Amastigotes de Leishmania spp. Hámster 1	35
Ilustración 24 Amastigotes de Leishmania spp. Hámster 2	36
Ilustración 25 Amastigotes de Leishmania spp. Hámster 3	36
Ilustración 26 Amastigotes de Leishmania spp. Hámster 4	37
Ilustración 27 Amastigotes de Leishmania spp. Hámster 5	37





## 1 Resumen

c Debido a que las personas infectadas se encuentran en zonas muy aisladas las muestras tardan semanas en llegar al laboratorio y por lo tanto son susceptibles de deteriorarse.

El objetivo es evaluar la efectividad de la solución de Guanidina con EDTA en un lapso de 5 semanas como conservador de material biológico de *Leishmania* sp. para su determinación por PCR en tiempo real.

El experimento consta en inocular 5 hámsteres con el parásito y confirmar la infección por microscopía, después comparar la calidad del DNA dependiendo del tratamiento dado (5 semanas con la solución, 5 semanas sin la solución, extracción de la laminilla y extracción el mismo día de la obtención de la muestra).

Los resultados indican que las muestras que no recibieron tratamiento, amplifican de forma similar que las muestras extraídas de laminillas y las muestras que se mantuvieron en la solución amplifican en promedio 2 ciclos después que las muestras extraídas el mismo día que se obtuvieron.

Con estos resultados podemos afirmar que la solución de Guanidina con EDTA sirve como conservador de material genético para *Leishmania* spp.



## 2 Introducción

### 2.1 Generalidades de *Leishmania*

La *Leishmania* es un parásito protozoario de la familia Trypanosomatidae (orden Kinetoplastida), intracelular obligado y dimórfico. En los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas. Se transmite a los humanos por la picadura de flebotomos hembra infectados, en América, es transferido por un mosquito del género *Lutzomyia* spp., y en Europa, del género *Phlebotomus* spp. (Berrueta, 2017).

Con más de 30 especies identificadas, y al menos 20 patógenas para los mamíferos, el género *Leishmania* incluye dos subgéneros. Las especies del subgénero *Leishmania* solo crecen en los vectores naturales en la porción del tubo digestivo anterior al píloro, que se encuentra en la unión del intestino medio con el intestino posterior (desarrollo suprapilórico), mientras que las especies del subgénero *Viannia* crecen tanto en el intestino medio como en el intestino posterior (desarrollo peripilórico). (OMS, 2010)

La Leishmaniasis se contempla dentro del grupo de enfermedades tropicales zoonóticas menospreciadas. Es prevalente en más 98 países y se estima que hay alrededor de 350 millones de personas en riesgo y 12 millones de casos, con una incidencia anual de 0.7–1.2 millones de casos de Leishmaniasis cutánea y 0.2–0.4 millones de la forma visceral. (OMS, 2010)

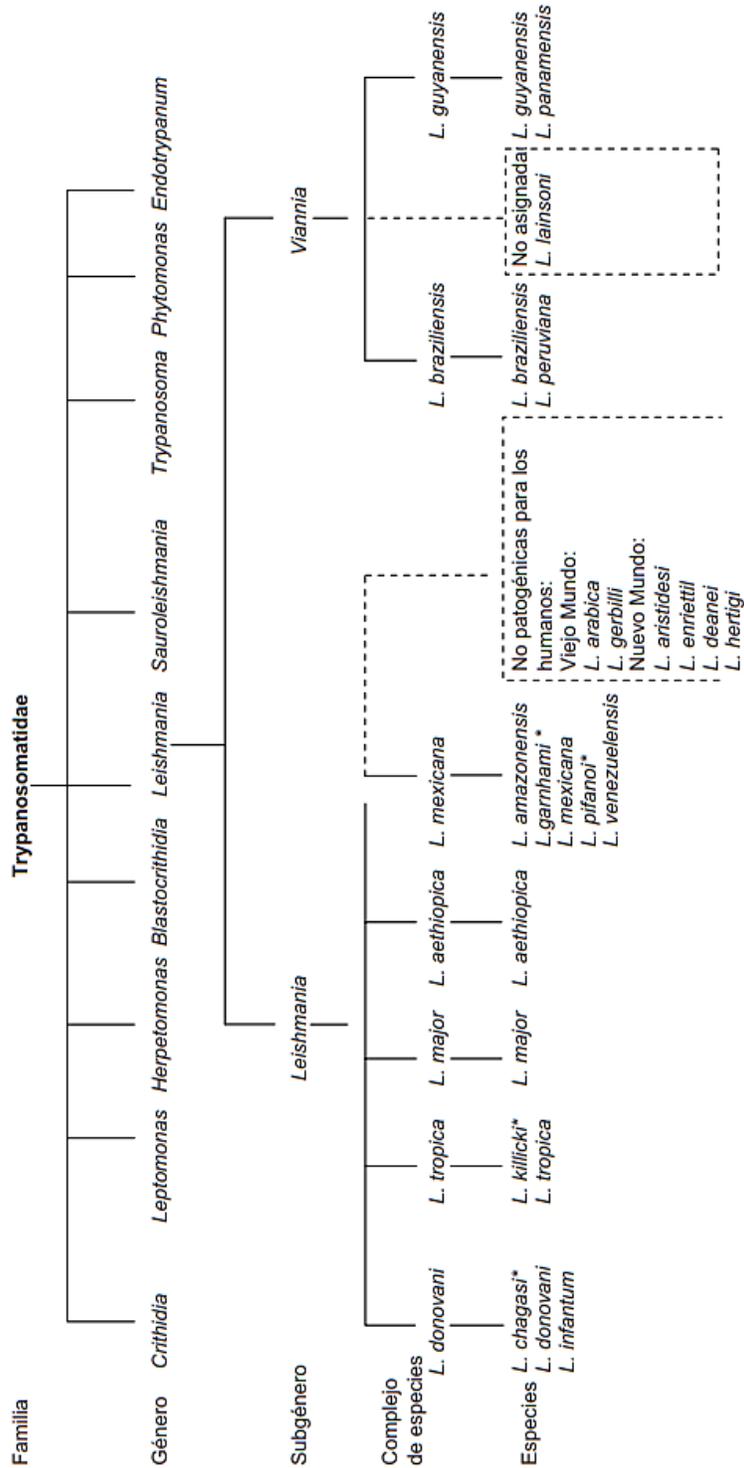


Ilustración 1 Clasificación taxonómica de *Leishmania* spp. la cual se divide en subgéneros, complejo y especies. Obtenido de (OMS, 2010)

La Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de Salud (OPS/OMS) ha promovido esfuerzos intensificados en los países endémicos para garantizar el acceso al diagnóstico y tratamiento oportuno de calidad para las personas afectadas por esta enfermedad. De los 18 países endémicos el 43.57% de la población en esos países está expuesta al riesgo de sufrir Leishmaniasis. (World Health Organization , 2016)

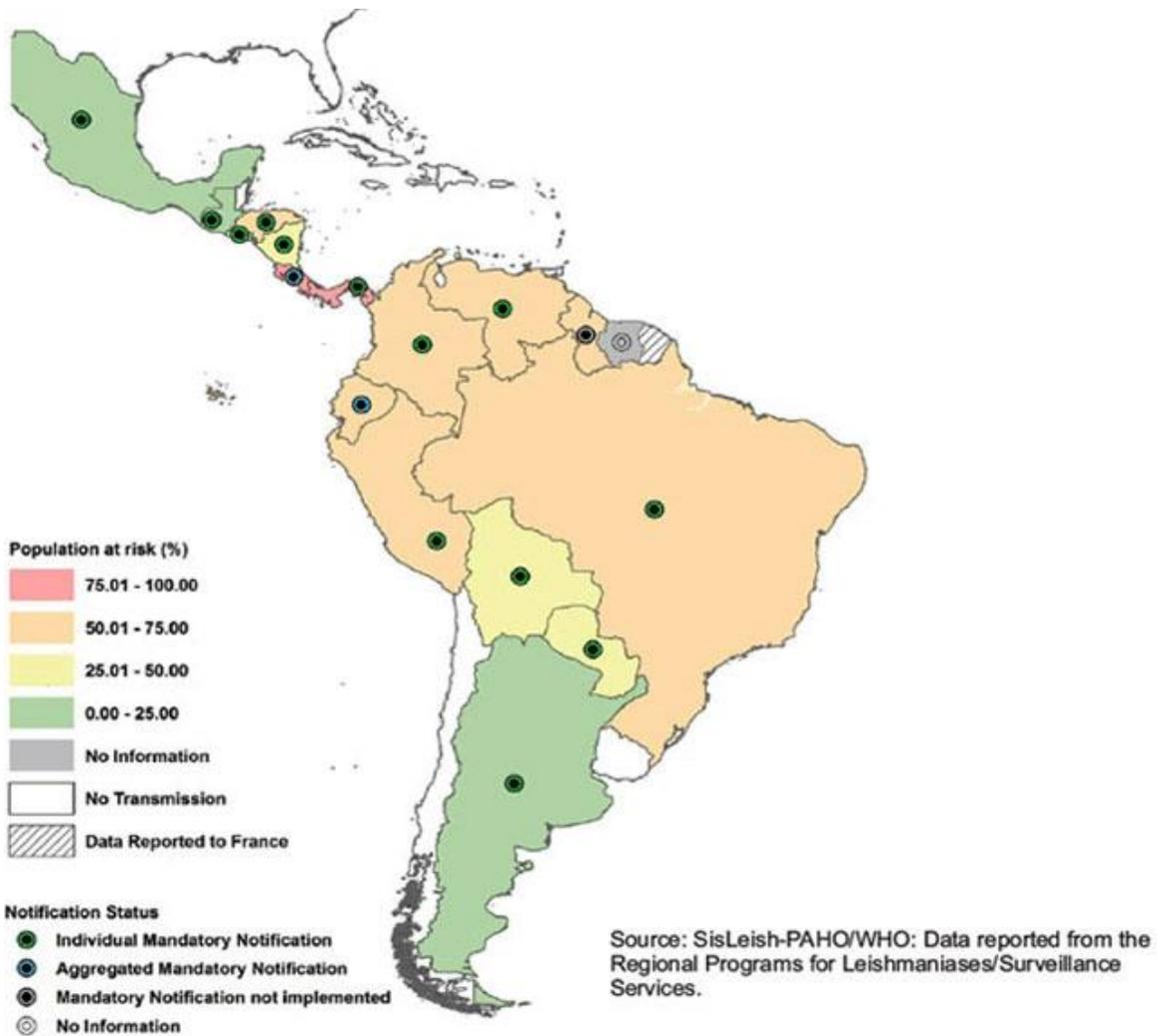


Ilustración 2 Mapa con la distribución geográfica de casos de Leishmaniasis en las Américas y el riesgo poblacional. Obtenido de (World Health Organization, 2016)

### 2.1.1 Morfología

Al ser un parásito dimórfico sus características varían de forma radical en cada una de ellas. En la etapa de promastigote (forma infectiva) es la etapa en la que se encuentra en el intestino del vector, su forma es elongada extracelular. Mide 10 - 20  $\mu\text{m}$ , sin contar la longitud del flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25  $\mu\text{m}$ . Presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1-2  $\mu\text{m}$  del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo. (Berrueta, 2017)

El amastigote (la forma replicativa) es la etapa en la que se encuentra en los fagolisosomas dentro de los fagocitos mononucleares del hospedero es redondo u oval, intracelular. Mide 2-4  $\mu\text{m}$ ; con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que une el cinetoplasto y cuerpo basal, éste último apenas un punto visible. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. (Berrueta, 2017)

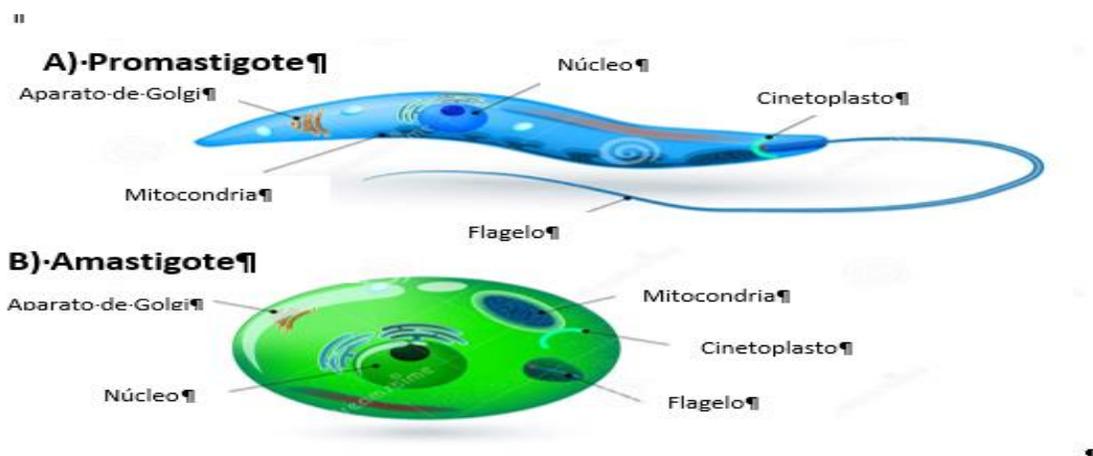


Ilustración 3 Formas parasitarias de *Leishmania* spp. A) se muestra el promastigote, el cual presenta un flagelo y forma alargada. B) se muestra el amastigote el cual se encuentra con el flagelo embebido con su característica forma circular Tomado de (*World Health Organization* , 2016).

## 2.1.2 Ciclo de reproducción

Como se muestra en la ilustración 5 1) Los promastigotes, una vez en la probóscide del flebótomo hembra, son introducidos en la piel de un hospedero durante la ingesta de sangre. 2) Los parásitos son fagocitados en piel por macrófagos, activando el complemento. 3) A pesar de que muchos promastigotes son destruidos, algunos promastigotes dentro de los fagolisosomas, pierden el flagelo y pasan a su forma de amastigote, donde se multiplicaran por fisión binaria. La replicación ocurre desde decenas hasta cientos. 4) Las células infectadas se rompen finalmente y los amastigotes se diseminan, hacia diferentes tejidos. 5) Cuando los flebótomos no infectados se alimentan de individuos infectados, ingieren las células con amastigotes 6) Los amastigotes se liberan en el intestino del flebótomo 7) Sufren cambios bioquímicos y se transforman en promastigotes 8) En el intestino medio del insecto, se multiplican y finalmente migran a la probóscide como promastigotes. (OMS, 2010)

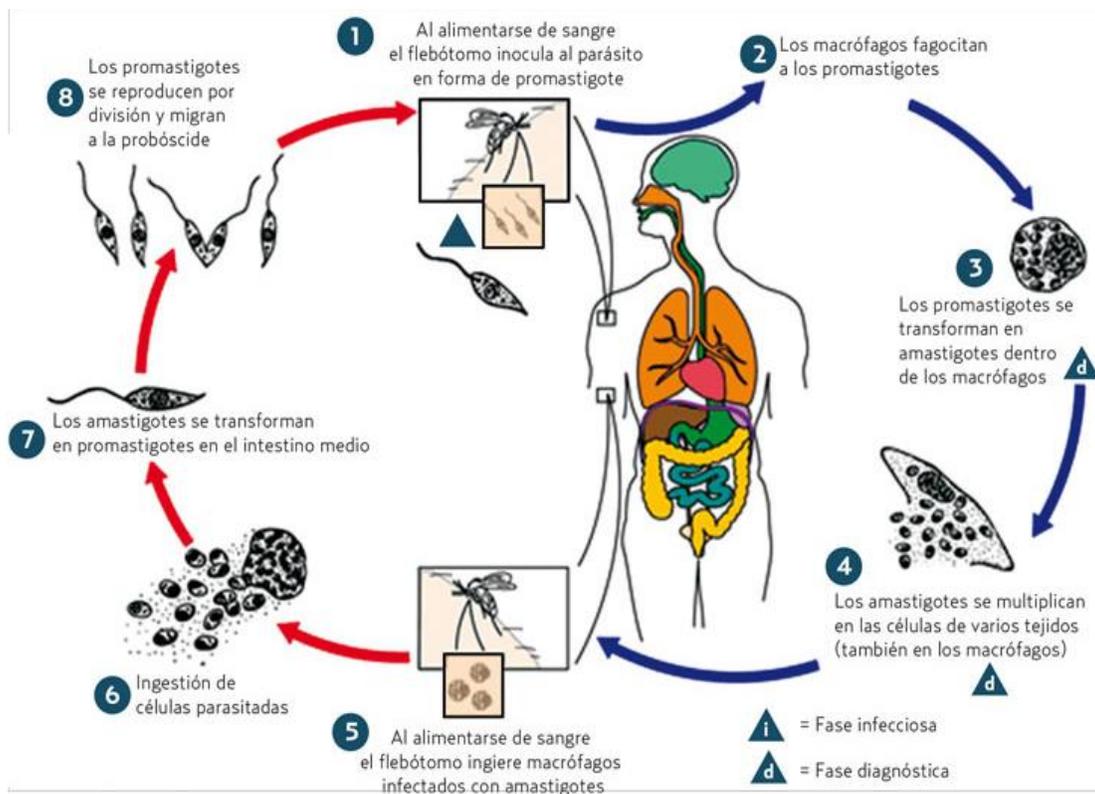


Ilustración 4 Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Obtenido de semFYC.

### 2.1.3 Formas clínicas

#### 2.1.3.1 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL).

Las características clínicas de la Leishmaniasis cutánea son muy variables dependiendo de la especie, región y el estado inmune del paciente. La lesión más común comienza en el punto de inoculación como una pápula o nódulo que crece lentamente y tarda como mínimo 1 semana en alcanzar su tamaño final.

En el centro se forma una costra que acaba desprendiéndose y dejando una úlcera de hasta 5 cm de diámetro, con borde elevado e induración periulcerosa variable. Son frecuentes los nódulos satelitales en el borde de la lesión, puede confundirse con otras enfermedades cutáneas, como las infecciones estafilocócicas o estreptocócicas, úlceras micobacterianas, lepra, infecciones fúngicas cáncer, sarcoidosis o úlcera tropical. (OMS, 2010)

La Leishmaniasis cutánea en Europa y África es causada por:

- *L. infantum*
- *L. tropica*
- *L. major*
- *L. aethiopica*
- *L. donovani*

En América es causada por:

- *L. mexicana*,
- *L. braziliensis*
- *L. panamensis*
- *L. guyanensis*
- *L. peruviana*.



Ilustración 5 Lesión característica en un caso de Leishmaniasis cutánea en la cual se observa una úlcera con borde elevado y fondo limpio. Obtenida de piel latinoamericana

### 2.1.3.2 Leishmaniosis Cutánea Difusa (LCD).

La Leishmaniasis cutánea difusa es causada por *L. aethiopica* y se caracteriza por máculas, pápulas, nódulos o placas cutáneas muy diseminadas, o infiltración difusa de la piel, sobre todo en las superficies extensoras de los miembros y en la cara, donde el engrosamiento de las cejas y los lóbulos de las orejas puede parecerse a la lepra.

No hay ulceración y la afectación mucosa está confinada a los bordes de los orificios nasales y los labios. La enfermedad no se cura espontáneamente, y las recaídas tras el tratamiento son frecuentes en pacientes coinfectados por el VIH o con otros tipos de inmunodepresión. En América se ha asociado únicamente con *L. mexicana* y *L. amazonensis*.



Ilustración 6 Lesiones más comunes en caso de Leishmaniasis cutánea diseminada donde se observan pápulas difusas por toda la espalda y brazos obtenido de (Zerpa, 2009)



### 2.1.3.3 Leishmaniosis Mucocutánea (LMC)

Las lesiones mucosas de la Leishmaniasis son raras en el Viejo Mundo, Los pacientes con Leishmaniasis visceral o PKDL y los coinfectados con VIH pueden presentar lesiones en la boca, la nariz o la mucosa genital causadas por *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica*. Las lesiones laríngeas pueden cronificarse y confundirse con cáncer.

En el Nuevo Mundo, es causada principalmente por *L. braziliensis* y *L. panamensis*, la característica destacada de la Leishmaniasis Mucocutánea es que producen metástasis en la mucosa de la boca y las vías respiratorias altas por diseminación linfática o hematógena. Estudios realizados en Brasil han revelado que la Leishmaniasis Mucocutánea puede presentarse desde varios meses hasta más de 20 años después de una lesión cutánea (OMS, 2010)

Otros factores de riesgo son la localización de la lesión primaria por encima de la cintura, las lesiones primarias grandes o múltiples y el retraso de la curación de la Leishmaniasis cutánea primaria.

Las lesiones nasales están siempre presentes, con nódulos e infiltración del septo cartilaginoso anterior, que conduce a la obstrucción del orificio nasal y, más tarde, a la perforación y colapso del septo, con ensanchamiento de la nariz. La piel de la nariz puede estar engrosada, tumefacta e hiperémica. En un tercio de los casos hay otros lugares afectados: por orden de frecuencia, la faringe, paladar, laringe, tráquea y labio superior. En la fase final hay mutilación grave, con obstrucción y destrucción de la nariz, faringe y laringe. Las infecciones bacterianas secundarias son frecuentes, y la causa de muerte más frecuente es la neumonía intercurrente.

Otras enfermedades, tales como la rinitis alérgica, paracoccidiodomicosis, estomatitis gangrenosa, linfoma, lepra y la sarcoidosis, pueden simular Leishmaniasis Mucocutánea temprana o avanzada.



Ilustración 7 Perforación de la parte superior del labio causando lesión en el paladar y pérdida del ojo derecho presente en un caso de Leishmaniasis Mucocutánea obtenido de (Diego Fernando Zea, 2009)

#### 2.1.3.4 Leishmaniasis Visceral (LV)

La Leishmaniasis visceral puede presentarse en personas de cualquier edad que entren en una zona endémica. Los casos pueden ser agudos, con fiebre de inicio brusco que aparece de 3 semanas a 2 años después de la exposición.

La enfermedad puede progresar rápidamente, con escalofríos, fiebre ondulante elevada, esplenomegalia, hepatomegalia, sudoración profusa, pérdida de peso rápido y profundo malestar.

Estos pacientes tienen más probabilidades de presentar complicaciones raras, tales como anemia hemolítica aguda grave, lesiones renales agudas o hemorragias mucosas.

En America la Leishmaniasis visceral puede ser endémica o esporádica. El agente etiológico es *L. infantum*.



Ilustración 8 Esplenomegalia y hepatomegalia señaladas con marcador en un paciente con Leishmaniasis Visceral. Obtenido de [step1.medbullets.com](http://step1.medbullets.com)

### 2.1.3.5 Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD)

La Leishmaniasis cutánea diseminada presenta numerosas lesiones nodulares o ulceradas extensas, y se ha descrito en relación con infecciones por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*. Puede haber desde más de 20 hasta cientos de lesiones cutáneas, con o sin afectación mucosa.



Ilustración 9 Lesiones con pequeñas úlceras con fondo plano y algunas pápulas en la espalda causadas por *Leishmania* spp obtenido de (Kunze, 2015)

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki<sup>a</sup></i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifano<sup>a</sup></i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnham<sup>a</sup></i>	<i>L. naïffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiense<sup>b</sup></i>	
Tropismo principal	Visceral	Dérmico	Dérmico	Mucoso

Ilustración 10 Muestra la afinidad que tienen las distintas especies de *Leishmania* spp en los casos clínicos obtenido de (OMS, 2010)

## 2.2 Diagnóstico de Leishmaniasis

### 2.2.1 Microscopia

La visualización de amastigotes en el examen microscópico es el estándar de oro para la confirmación de Leishmaniasis Cutánea. A pesar que la especificidad de la microscopía es elevada, su sensibilidad es variable, dependiendo principalmente de la capacitación del personal para realizar la técnica.

La técnica se realiza haciendo una punción en el borde de la lesión y del líquido ceroso que brota, se hacen frotis o improntas para después ser fijados y teñidos con colorante de Giemsa.

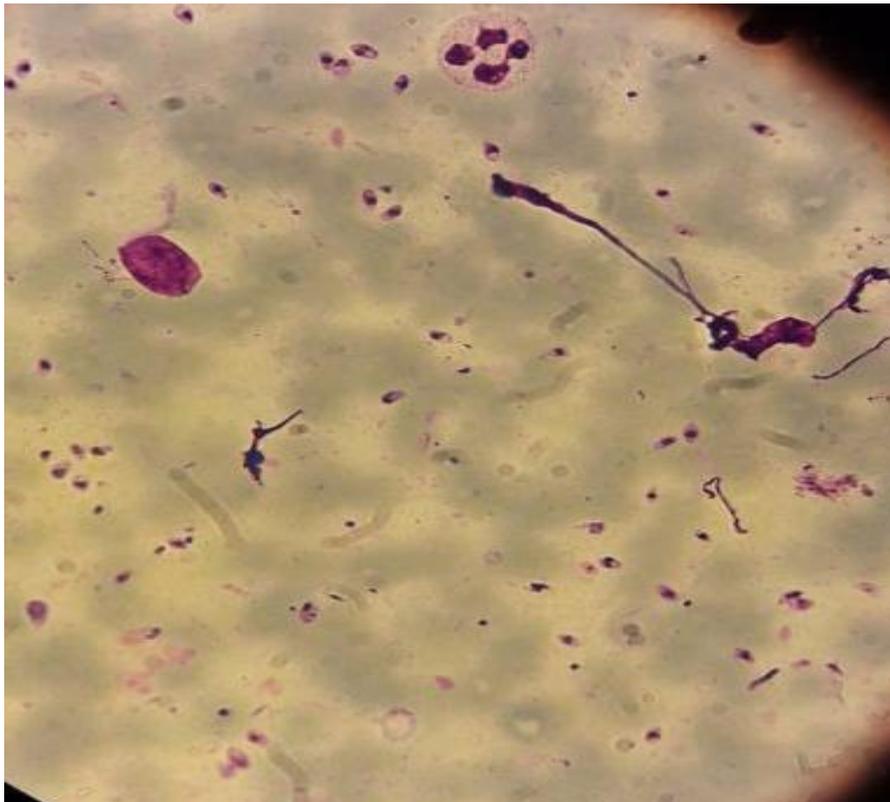


Ilustración 11 Amastigotes de *Leishmania* spp. En tinción de Giemsa a 100x (Mariño-González)

## 2.2.2 Inoculación en animales de laboratorio

La inoculación de animales es un método que puede resultar inconveniente para el diagnóstico debido al largo tiempo de incubación que requiere, el cual puede ser desde meses hasta un año, en comparación a la microscopia que puede ser realizada en cuestión de horas.

Así mismo, este es un excelente método para el aislamiento del parásito y su posterior tipificación. La inoculación se realiza en animales susceptibles como son el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y los ratones singénicos de la cepa BALB/c .ya sea inoculando el parasito en orejas, nariz o principalmente en el cojinete plantar (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiologica y Control de Enfermedades, 2015)



Ilustración 12 Hámster dorado utilizado para la conservación de cepas de *Leishmania* spp. Laboratorio de Leishmania, parasitología InDRE

### 2.2.3 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La detección del parásito mediante PCR es más sensible que el examen microscópico al ser una técnica molecular. Lamentablemente su uso se encuentra limitado a hospitales de referencia y centros de investigación debido al alto costo de sus reactivos y equipos.

Debido a su elevada sensibilidad, la PCR detecta más infecciones asintomáticas que el examen microscópico y permite dar un diagnóstico en cuestión de horas.

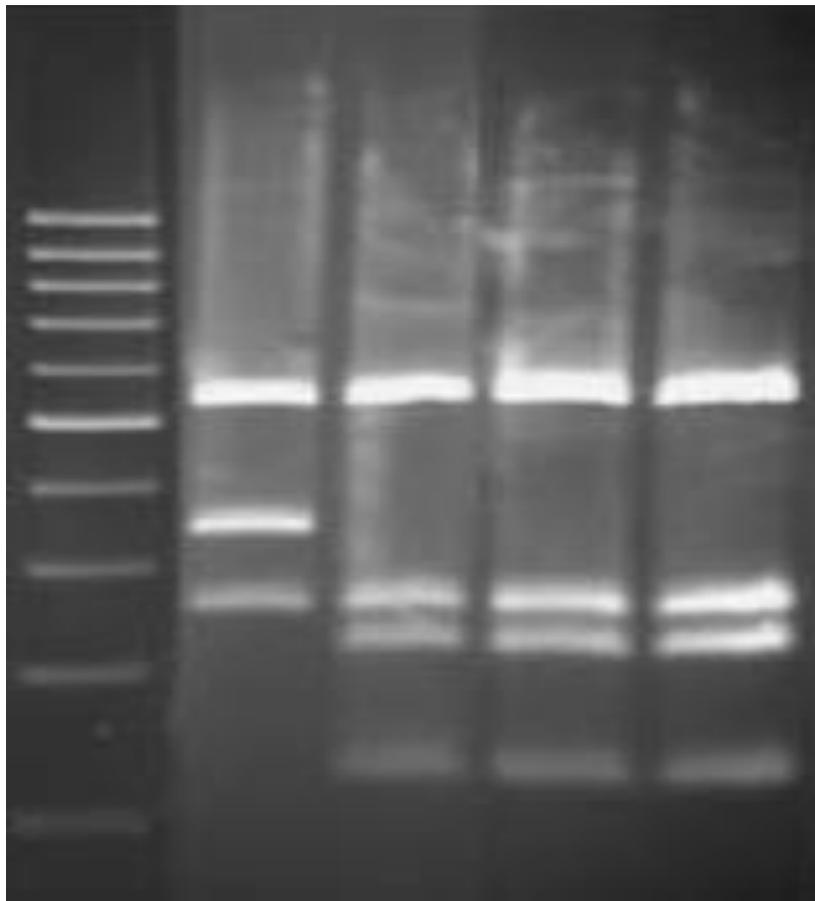


Ilustración 13 Bandas de un corrimiento electroforético después de una PCR de Leishmania (*Montalvo, 2008*)



### 2.3 Agentes conservadores de DNA durante el muestreo

Para que una prueba de laboratorio pueda ser realizada de manera efectiva, es necesario hacer una buena toma de muestra y mantener las muestras en las condiciones óptimas para evitar que se degrade. En el caso de la biología molecular este es un paso crítico debido a que el material genético puede degradarse, ya sea por las sustancias que la misma muestra pudiera liberar (DNasas, Hemoglobina, y cofactores) o por alguna contaminación externa.

Para ello se han desarrollado algunas técnicas que evitan o retrasan estos procesos, dentro de estas técnicas se encuentra el uso de Nitrógeno líquido, el cual congela la muestra en cuestión de segundos evitando la formación de cristales que pudieran lisar las células.

También se puede deshidratar la muestra con etanol al 70 % como en el caso de las muestras fijadas en portaobjetos (aunque esta opción puede degradar el ADN).

Utilizar un buffer especializado que inactive las endonucleasas también es una buena opción aunque un poco más cara.

Otra opción es mantener la muestra en soluciones que contengan sales de Guanidina o  $\beta$ -Mercaptoetanol que inhiben DNasas y RNasas debido a su actividad desnaturalizante de proteínas.

Por último los anticoagulantes los cuales evitan la hemólisis ya que al liberarse hemoglobina esta inhibe las reacciones enzimáticas, por otro lado la coagulación tiene la capacidad de atrapar entre sus fibras proteínas, agua y células impidiendo una lisis apropiada. En el caso del EDTA puede captar iones como el calcio el cual es necesario para realizar varias funciones enzimáticas (Cornejo, 2013).

## 2.4 Solución Guanidina EDTA

El Hidrocloruro de Guanidina posee propiedades caotrópicas y es uno de los desnaturalizantes de proteínas más potentes haciendo que su estructura definida se pierda, quedando en forma de ovillo.

El ácido etilendiaminotetraacético, también denominado EDTA, es una sustancia utilizada como agente quelante la cual crea complejos con iones metálicos polivalentes en solución para formar complejos coordinados cíclicos no iónicos, solubles en agua y virtualmente no disociables.

Coordina a metales pesados de forma reversible por cuatro posiciones acetato y dos amino, lo que lo convierte en un ligando hexadentado.

Por lo tanto al tener una solución con estas dos sustancias podemos mantener una muestra en buen estado por mayor tiempo, debido a que la Guanidina desnaturaliza las proteínas que pudieran degradar la muestra y el EDTA se quelara los cofactores los cuales son iones requeridos para el correcto funcionamiento de una enzima, como ejemplos de estas tenemos hierro, magnesio y zinc que son iones metálicos cargados positivamente.

Si el cofactor es removido la enzima no es capaz de hacer su trabajo como en el caso de la anhidrasa carbónica que cataliza la reacción entre el agua y el dióxido de carbono para formar ácido carbónico, la cual requiere zinc como cofactor para su funcionamiento.

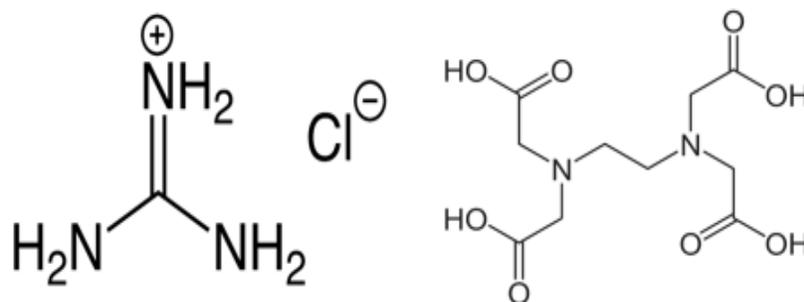


Ilustración 14 Molécula de Guanidina y EDTA



## 2.5 Extracción de ADN

Hay una gran cantidad de métodos para extraer DNA pero solo hablaremos de extracción en general en tejidos animales.

Primero debemos realizar una toma de muestra adecuada para evitar alguna contaminación, las cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR.

Cada tejido tiene sus consideraciones propias y siempre será necesario conocerlas o preguntar a los especialistas de cada grupo para llevar a cabo una toma de muestra exitosa.

Para tejidos animales hay que cortar el tejido en pedazos pequeños para facilitar su maceración, la cual consiste en romper las uniones entre las células para mejorar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético.

Una vez obtenida la muestra es necesario liberar el material genético el cual se encuentra dentro de las células lo cual se puede hacer de diferentes formas.

- Lisis por ruptura mecánica y extracción con disolventes orgánicos.

La lisis debe de ser lo suficiente fuerte para lisar las células, pero no muy agresivo para proteger el DNA. Este método puede ser usado para extraer DNA de material crudo, liofilizado o congelado. Se puede utilizar cloroformo, alcohol isoamílico o fenol, para separar las proteínas y otros componentes de la célula solubles en el disolvente orgánico, por lo que de esta forma se logra la separación de los ácidos nucleicos, siempre teniendo en cuenta que hay que controlar el pH de la fase acuosa y la concentración de sales.



- Lisado y purificación con un detergente iónico.

Este es un procedimiento básico para extraer DNA de donde un detergente aniónico puede romper la pared celular y así se produce la lisis de las células. Un ejemplo de este método, quizás el más conocido, es el uso de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) como detergente para lograr la lisis. El CTAB, además, en presencia de EDTA como agente quelante y TRIS-HCl como tampón, forma complejos insolubles con el DNA. Luego se extraen los residuos orgánicos con cloroformo, para separar posteriormente el DNA por precipitación con etanol.

- Método de salting-out

A partir de un lisado celular se pueden separar las moléculas de proteínas y otros contaminantes del DNA mediante la adición de altas concentraciones de sal que hacen que disminuya la solubilidad de las moléculas orgánicas en la fase acuosa. En este método se utiliza frecuentemente la proteinasa K, el TRIS-HCl para regular el pH y otros reactivos químicos que aseguren la total inactivación de las enzimas que pueden actuar sobre las moléculas de DNA. Para la extracción se utilizan sales inorgánicas como el perclorato de sodio y el cloruro de sodio en concentraciones muy altas que hacen precipitar a las moléculas orgánicas. El precipitado formado se separa por centrifugación y luego se puede extraer el DNA de la disolución acuosa mediante la adición de alcohol, por precipitación.



## 2.6 PCR

Se trata de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR. Esta técnica permite multiplicar pequeñas cantidades de DNA entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de DNA que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas.

- Los Nucleótidos

Los nucleótidos se diluyen en agua, la solución debe ser en un pH 7,7-8,0, si no un pH ácido promoverá la hidrólisis del dNTP (Desoxiribonucleótido trifosfato) en dNDP (Desoxiribonucleótido difosfato) y dNMP (Desoxiribonucleótido monofosfato) y los hará inútiles para las reacciones de polimerización de la DNA enzimática.

Los cuatro dNTP deben ser usados en concentraciones equivalentes para minimizar errores de incorporación de bases. Se debe decidir la más baja concentración adecuada de dNTP para la longitud y composición de la secuencia blanco.

- Iniciadores o Primers

Los nucleótidos iniciadores son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de DNA. La selección de nucleótidos iniciadores es muy importante en la PCR los cuales deben de contar con las siguientes condiciones

1. Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud.
2. Temperaturas de fusión ( $T_m$ ) 50-65 °C
3. Contenido GC 40-60%
4. Debe ser evitada la auto-complementariedad para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
5. Debe tener un 100% de apareamiento con el molde.
6. Las concentraciones óptimas de los Primers son generalmente entre 0.1 y 0.5  $\mu\text{M}$ .



7. Los Primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados
8. Los Primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos.
  - La polimerasa

Un rango de concentración recomendado para Taq polimerasa es entre 1 y 2.5 unidades por 100  $\mu$ l de reacción cuando los otros parámetros son óptimos.

- Concentración de Magnesio

Es benéfico optimizar la concentración del ion magnesio, ya que afecta: el alineamiento de los Primers, la temperatura de disociación de las cadenas, tanto del templado como del producto de PCR, la especificidad del producto, la formación de dímeros de primer y la actividad y fidelidad de la enzima. La Taq polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los Primers y los dNTP. Los PCR deben contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio.

- Desnaturalización

Consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C.

- Alineamiento

Consiste en la hibridación de los Primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento en el rango de 55 a 72°C genera buenos resultados.



- Extensión

La tercera reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud.

Una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida.



## 2.7 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real da resultados cuantitativos debido a que los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR. Está basado en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción, con la ayuda de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.

- SYBR Green

Es un agente intercalante que se une al DNA de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Es simple y económico, fácil de usar, sensible, versátil y no se necesitan sondas específicas. Sin embargo durante la reacción de PCR puede unirse a dímeros de primers y a otros productos inespecíficos.

- Hydrolysis probes (TaqMan™)

Se emplea una sonda que tiene unidos un fluorocromo reportero y un fluorocromo quencher. Cuando ambos fluorocromos están unidos a la sonda, el reportero no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa corta al fluorocromo reportero del resto de la sonda, permitiendo la emisión una señal fluorescente. Se monitorea la señal fluorescente del reportero que se va acumulando en los sucesivos ciclos de PCR.



### 3 Justificación

La Leishmaniasis a pesar de ser una enfermedad que se encuentra en gran parte del mundo, no cuenta con la suficiente atención debido a que está altamente relacionada con la pobreza. En el caso de América latina la transmisión se ve incrementada debido al alto índice de migración de todos los países de centro y sur América hacia Estados Unidos, trayendo con ellos especies no endémicas las cuales no siempre reaccionan de la mejor manera ante el tratamiento que se da en México. Por lo cual es necesario implementar métodos diagnósticos más sensibles y específicos como es la PCR en tiempo real.

Dentro de las mejoras que ofrece la técnica es que ya no se requiere cortar con un bisturí la lesión y después raspar con el bisturí dentro de la lesión para obtener el material biológico lo cual es un método agresivo para el paciente aumentando las probabilidades de una infección secundaria por algún otro patógeno, sin tomar en cuenta que el resultado se limita solo al género del parásito. Por otro lado, al utilizar un hisopo como método de recolección de DNA y mantener la muestra en una solución de Guanidina con EDTA evita que el material biológico presente una mayor degradación antes de su extracción.

Esto permitirá incrementar la sensibilidad en contraste con el método actualmente utilizado el cual consiste en obtener el material genético a partir de una laminilla previamente teñida con Giemsa y ya utilizada para su detección por microscopía. De esta manera podemos aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica brindando un mejor resultado diagnóstico el cual puede influenciar hasta en la elección del tratamiento.



## 4 Objetivo General

Evaluar la efectividad de la solución de Guanidina con EDTA en un lapso de 5 semanas como conservador de material biológico de para la posterior determinación de *Leishmania* spp. por PCR en tiempo real.



## 5 Hipótesis

Hipótesis alternativa (H1): La solución de Guanidina con EDTA presenta efectividad como conservador de material biológico el cual se ve reflejado en su determinación por PCR en tiempo real para la detección de *Leishmania* spp en comparación del método de extracción en laminilla.

Hipótesis nula (H0): La solución de Guanidina con EDTA no presenta efectividad como conservador de material biológico el cual se ve reflejado en su determinación por PCR en tiempo real para la detección de *Leishmania* spp en comparación del método de extracción en laminilla.



## 6 Metodología

### 6.1 Tipo de Estudio

Experimental, Comparativo, Transversal, Prolectivo.

### 6.2 Análisis de resultados

Los resultados serán analizados por estadística no paramétrica.

### 6.3 Procedimiento

#### 6.3.1 Materiales y reactivos

- Aceite de inmersión
- Agua grado Molecular
- Agua libre de nucleasas.
- Colorante Giemsa.
- Etanol al 70%
- Etanol grado molecular (96-100%)
- Gradilla para tinción.
- Guantes
- Hipoclorito de sodio al 2%.
- Hisopos de Rayon marca Puritan núm. 6 con mango de poliestireno
- Hoja para bisturí #15 desechable.
- Jeringas para insulina
- Kit de extracción DNeasy Blood y Tissue kit
- Mango para bisturí #3.
- Marcador indeleble punta fina
- Metanol absoluto.
- Micropipetas (1000, 200, 20 y 10  $\mu$ L) y puntas con filtro
- Papel seda
- Pisabental (Sol. inyectable de Pentobarbital sódico 6.9g/100mL) Reg. SAGARPA Q-7833-215
- Porta objetos nuevos y desengrasados.



- Rompun (Sol. Inyectable de Hidrocloruro de Xilazina 20mg/mL) Reg. SAGARPA Q-0615-035
- Solución salina estéril.
- SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase
- Toallas de papel absorbente.
- Tubos Eppendorf nuevos y estériles.

#### 6.3.2 Materiales biológicos

- 6 Hámsteres dorados macho
- Cepa de *Leishmania* spp.
- DNA
- Extremidad infectada de Hámster
- Hámster infectado con *Leishmania* spp

#### 6.3.3 Equipos

- Baño María
- Cabina de bioseguridad
- Cabina de bioseguridad
- Cabina de PCR
- Cronometro
- Equipo de disección.
- Microcentrífuga
- Microscopio óptico
- Termociclador CFX96
- Vortex



#### 6.3.4 Inoculación en Hámster

Se cargaron las jeringas con las suspensiones de *Leishmania* spp. A una concentración de  $3 \times 10^7$  promastigotes por mililitro. Después se inocularon 5 de los 6 Hámsteres con 0.1 mL de la suspensión de *Leishmania* spp. En el cojinete plantar. El sexto hámster no se inoculó para utilizarlo como control negativo y se mantuvo bajo las mismas condiciones que los demás dentro del bioterio del InDRE.

Se verificó tanto el crecimiento de los animales como el proceso de infección, en un periodo de 3 a 8 meses hasta que se presentó inflamación en el área inoculada.

#### 6.3.5 Eutanasia de Hámster y Obtención de Material Biológico

Se inmovilizó al hámster y fue sedado con 1 mL de Rompun por vía subcutánea para disminuir el estrés que pudiera sufrir el animal, una vez sedado se inyectó por vía intraperitoneal una sobredosis de Pentobarbital sódico para causar la muerte del Hámster, por último, se cortó la extremidad inferior infectada.

#### 6.3.6 Examen directo (microscopia)

De la misma lesión donde se tomó la muestra para PCR con el bisturí se realizó un ligero raspado con el mismo y se distribuyó sobre un portaobjetos limpio de manera circular de adentro hacia afuera

Se dejaron secar las laminillas durante 15 min a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo, después fueron fijadas con metanol absoluto durante 1 min.

Para la tinción fueron cubiertas con solución de Giemsa durante media hora, después enjuagadas con agua de la llave evitando que la presión del chorro dañe la muestra.

Una vez secas se colocaron las laminillas en el microscopio para buscar amastigotes intra o extracelulares en todos los campos de ser necesario para confirmar la infección por *Leishmania* spp.



### 6.3.7 Extracción de DNA

Con un bisturí se realizó una pequeña incisión en la zona inflamada y con los hisopos de Rayón se tomaron 3 muestras a cada uno de los hámsteres, se depositaron 2 de las puntas de los hisopos en un tubo Eppendorf vacío y la otra en un tubo Eppendorf con 500µL de la solución de Guanidina y se mantuvieron a 20°C, cerrados hasta su extracción 5 semanas después

Para la extracción de DNA ya sea para los que tenían Guanidina como para los que no, se agregaron 200µL de Buffer ATL, 20µL de proteinasa K y se agitaron con Vortex 5 seg.

Después se incubó a 56°C durante 10 minutos y se volvió a agitar con Vortex 5 seg. Se agregaron 200 µL de etanol absoluto grado molecular y se agitó con Vortex durante 5 seg.

Con una micropipeta se retiró la solución y se vertió en una columna de extracción, centrifugándola por 1 min a 8000 rpm y se desechó el eluido.

Para hacer los lavados se agregaron a la columna 500µL de buffer AW1 y se centrifugó 1 min a 8000 rpm, se desechó el eluido, después se agregaron 500µL de buffer AW2 y se centrifugó 3 min a 14000 rpm volviendo a desechar el eluido.

Por último, se colocó la columna dentro de un tubo Eppendorf estéril y se vertieron en la columna 50µL de buffer AE, para después centrifugarlo durante 1 min a 8000 rpm esta vez quedándonos con la solución eluida y manteniéndola a 4°C bien cerrada y etiquetada.

### 6.3.8 PCR Tiempo Real

Dentro de la cabina de bioseguridad del área de Master mix se mezclaron todos los reactivos como se muestra en anexo 11.8 en un solo tubo Eppendorf.

En una tabla se designaron la posición que cada muestra iba a tener dentro de la placa de 96 pozos.

Conforme a lo especificado en la tabla se agregaron 20µL de la mezcla antes preparada en los pozos correspondientes, esta se mantuvo cerrada y se llevó a la cabina de bioseguridad del área de PCR.

Se agregaron a los pozos 5 µL del material correspondiente ya sea muestra, control positivo o control negativo dependiendo de lo descrito en la tabla anterior. Se taparon cuidadosamente verificando que no hubiese algún lugar donde pueda ocurrir alguna fuga.

Se programó el termociclador con el proceso ya establecido por el departamento de Parasitología Molecular, para la determinación de *Leishmania* la cual requiere de 40 ciclos para poder observar la amplificación de manera objetiva

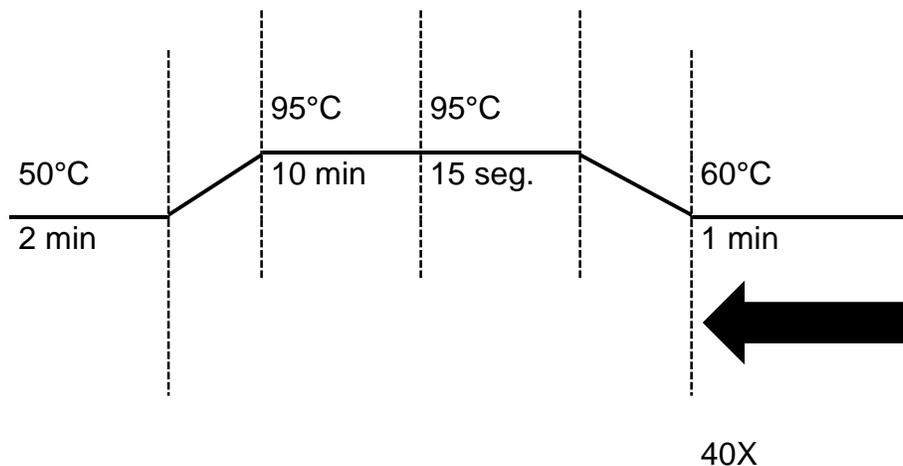


Ilustración 15 Condiciones del termociclador por cada ciclo.

Se colocó la placa dentro del Termociclador de la misma manera en que fue anotada en la tabla y se inició al proceso el cual duró 1 hora.



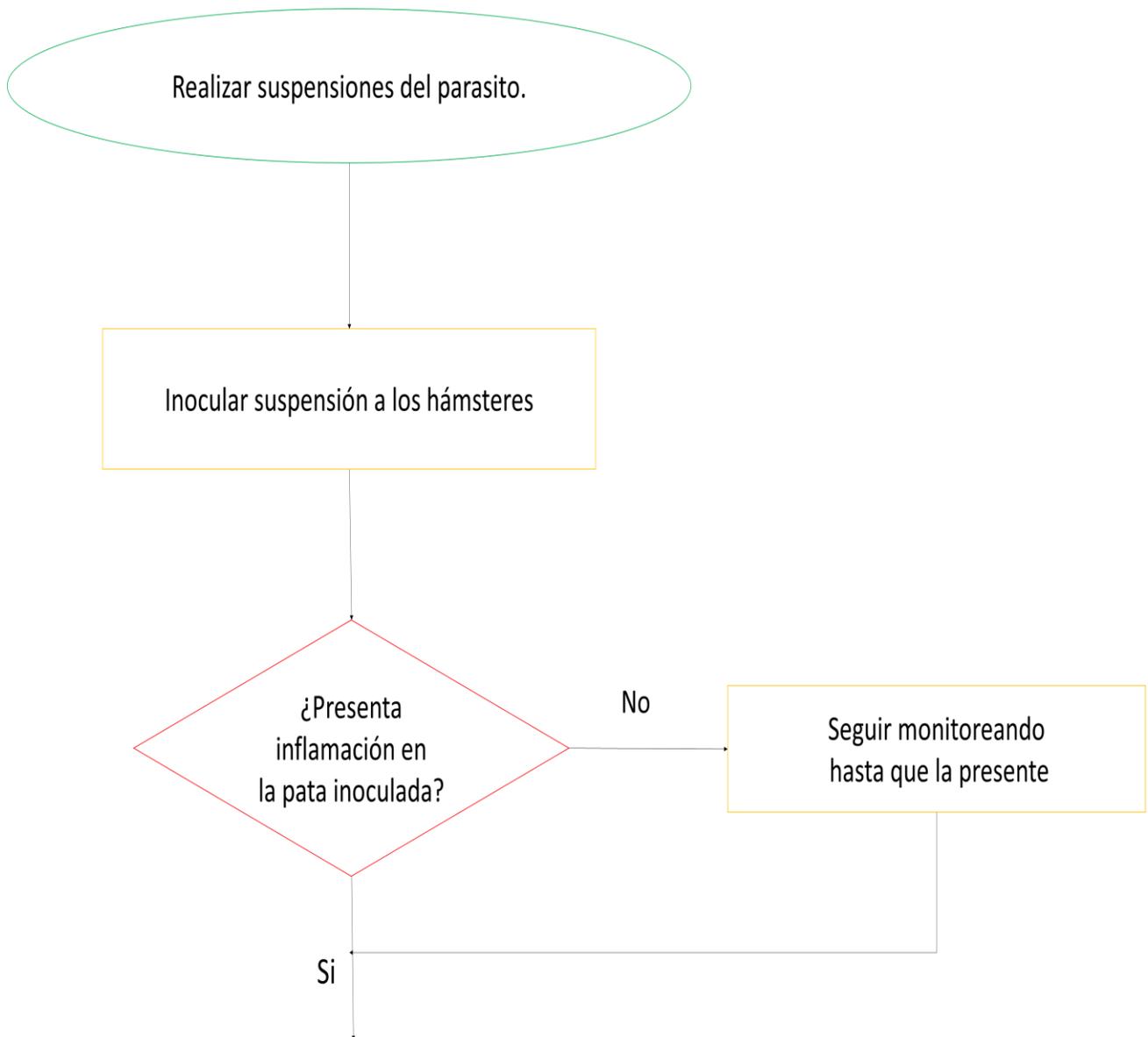
## 7 Diagrama de flujo

### Parte 1

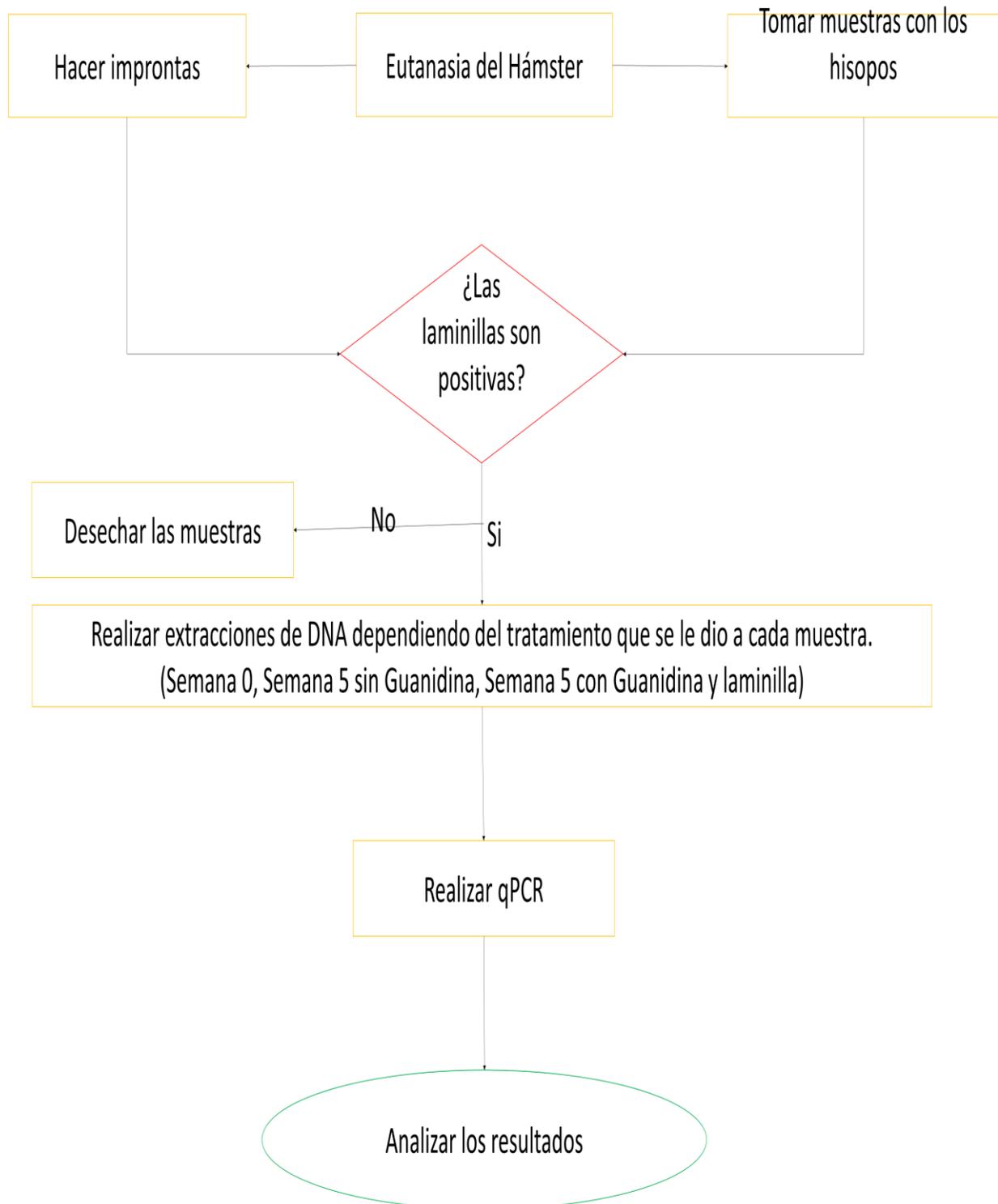
Diagrama de flujo para Evaluar la efectividad de la solución de Guanidina con EDTA

En un lapso de 5 semanas como conservador de material biológico de *Leishmania* spp.

Para su determinación por PCR en tiempo real.



Parte 2



## 8 Resultados

### 8.1 Resultados de la infección en Hámsteres

Los 5 hámsteres inoculados mostraron signos de infección a partir del tercer y cuarto mes post-inoculación, siendo estos la inflamación de la pata donde se inoculo el parásito e irritabilidad, los cuales aumentaban con el paso de los días como se esperaba.



Ilustración 16 podemos observar el crecimiento en la pata del hámster debido al proceso inflamatorio causado por la *Leishmania* spp. (Mariño- Bermúdez 2018).

Durante la eutanasia de los Hámsteres, se tomaron 10 improntas y 10 frotis para su posterior tinción, donde se observaron las formas amastigotes confirmando que la infección fue causada por *Leishmania* spp y no por algún otro patógeno, también se utilizaron 3 hisopos por hámster separando cada uno en un tubo Eppendorf para su posterior tratamiento y extracción de DNA.

Hámster	Inflamación	Amastigotes
0	Negativa	Ausentes
1	Positiva	Presentes
2	Positiva	Presentes
3	Positiva	Presentes
4	Positiva	Presentes
5	Positiva	Presentes

Cuadro 1 Se compara el signo de inflamación que presentaron contra la ausencia o presencia de amastigotes en las tinciones.

Se tomaron las siguientes fotos de las laminillas ya teñidas con Giemsa donde podemos observar los amastigotes, confirmando que el proceso inflamatorio en los hámsteres es causado por *Leishmania* spp.

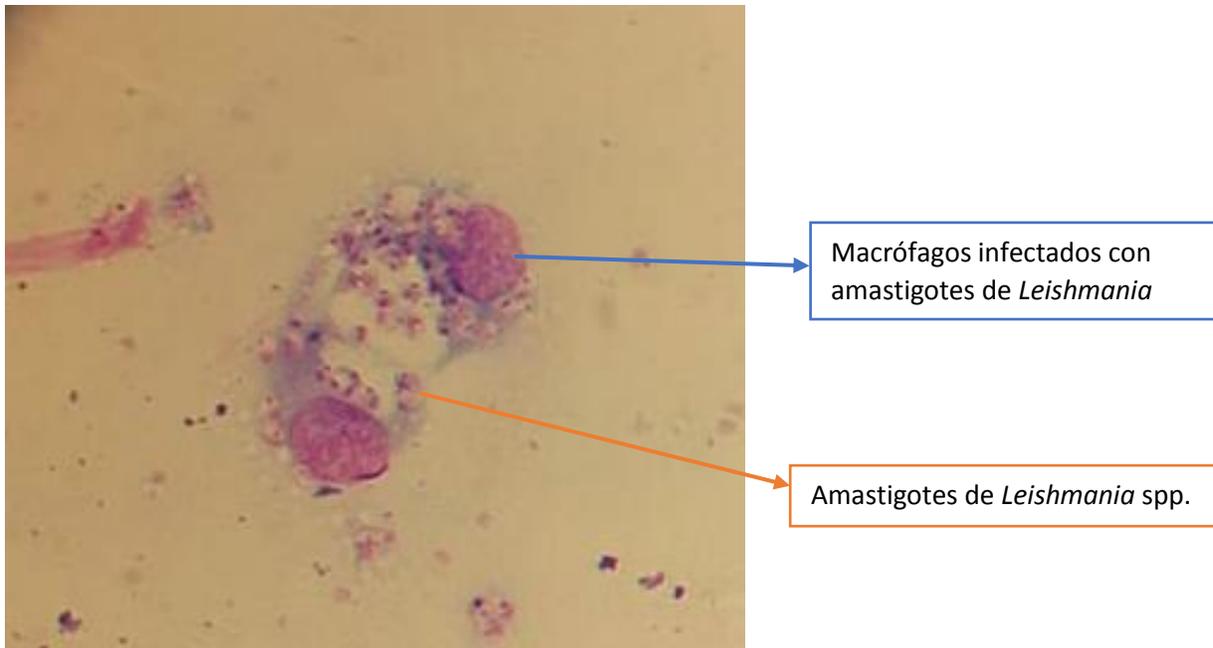


Ilustración 17 Amastigotes de *Leishmania* spp. Provenientes de la lesión del Hámster 1 Tinción tipo Romanowsky (Giemsa) 100X aceite de inmersión Soto/Mariño 2019.

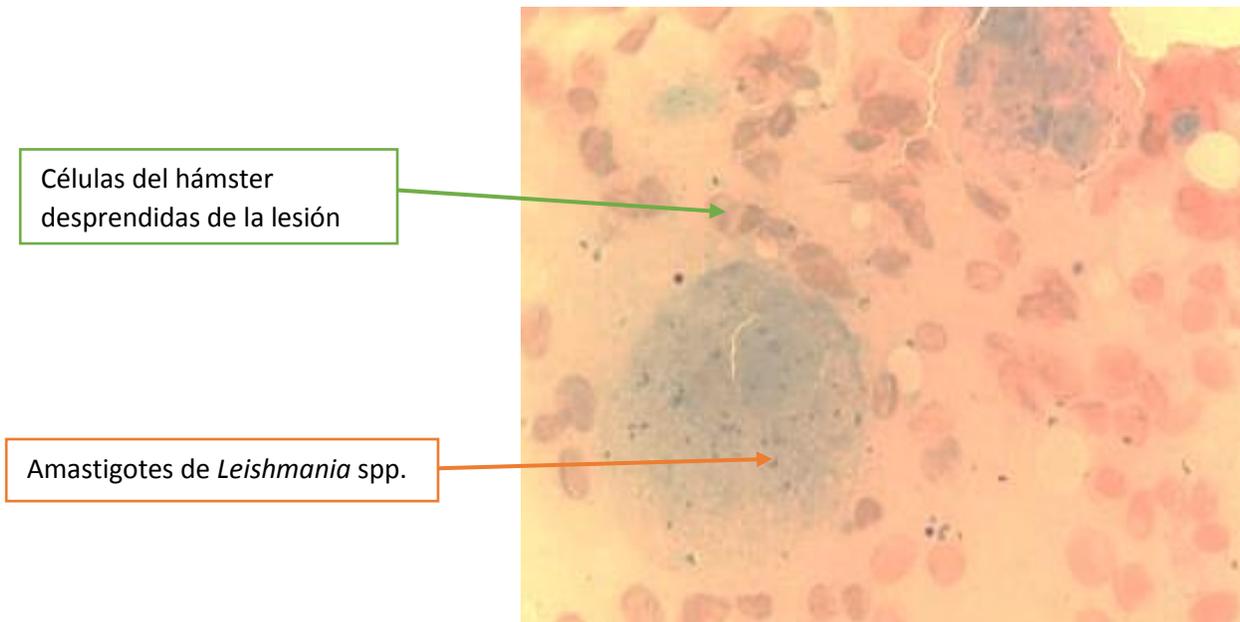


Ilustración 18 Amastigotes de *Leishmania* spp. Provenientes de la lesión del Hámster 2 Tinción tipo Romanowsky (Giemsa) 100X aceite de inmersión Soto/Mariño 2019.

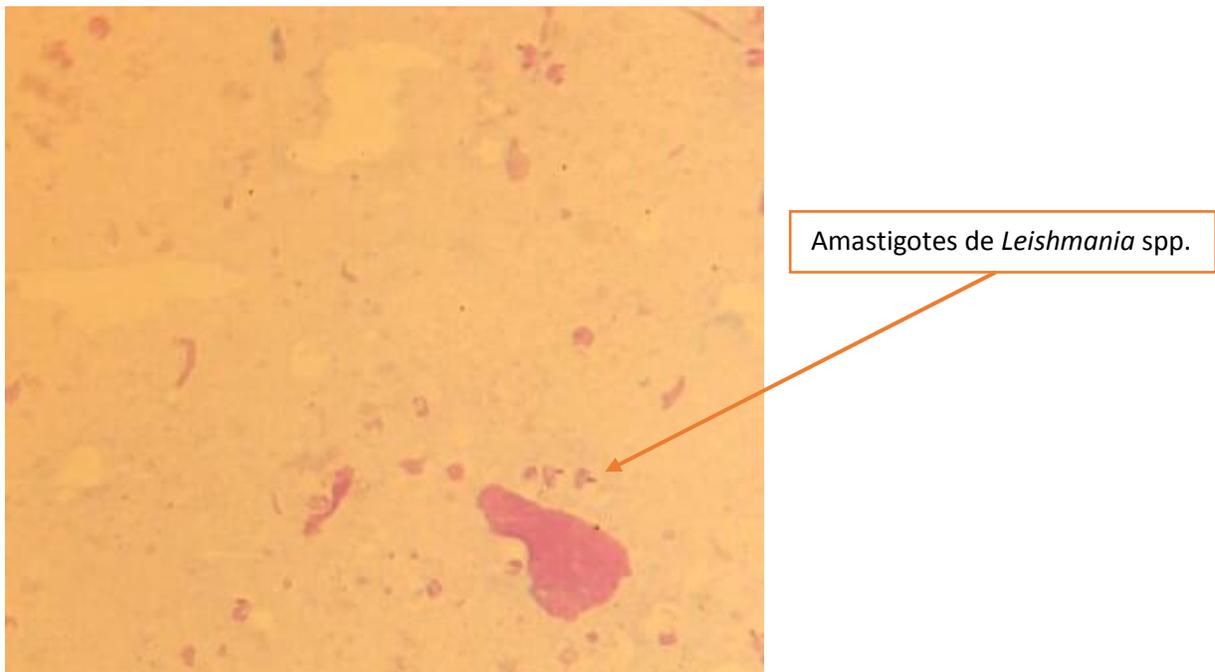
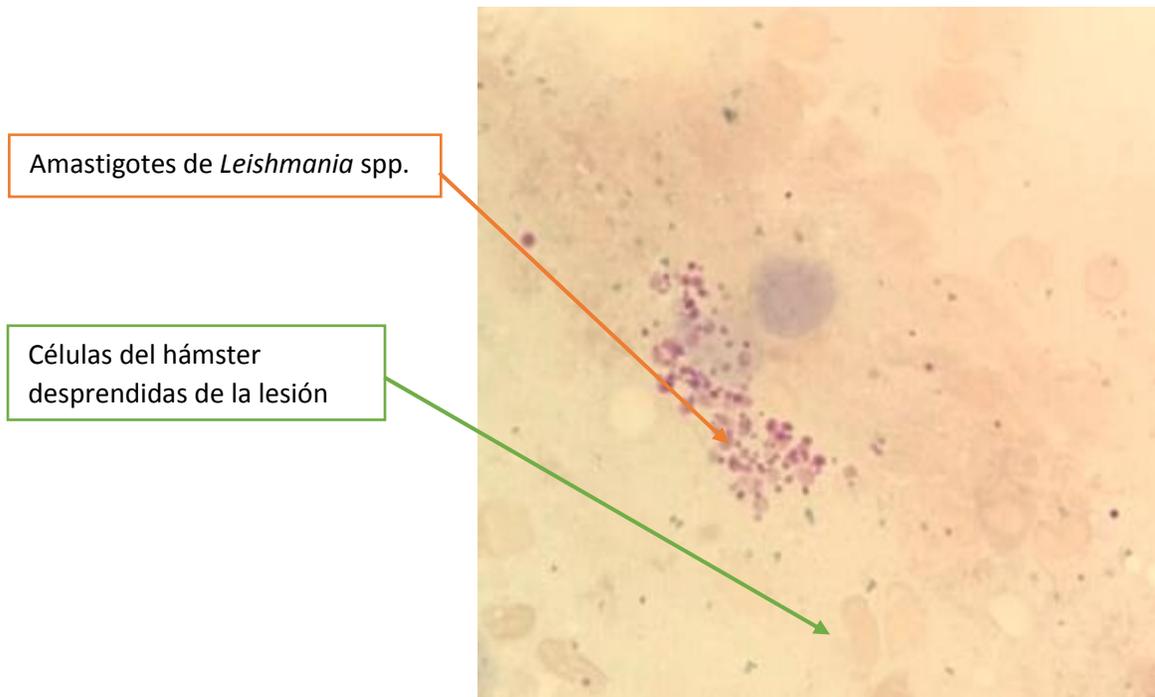


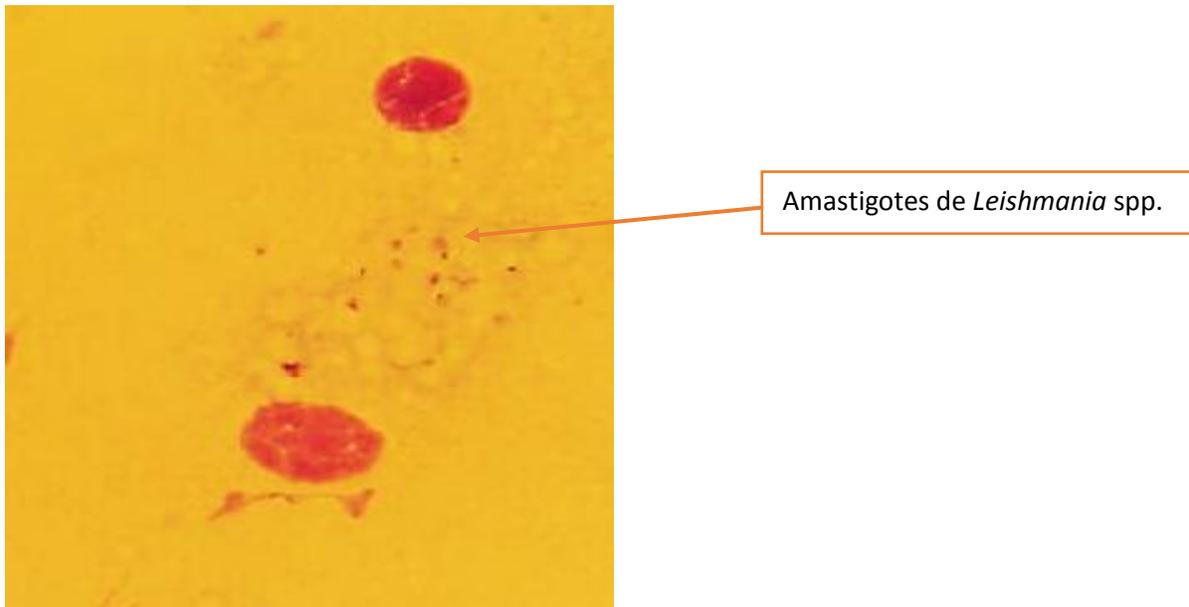
Ilustración 19 Amastigotes de *Leishmania* spp. Provenientes de la lesión del Hámster 3 Tinción tipo Romanowsky (Giemsa) 100X aceite de inmersión Soto/Mariño 2019.



Amastigotes de *Leishmania* spp.

Células del hámster desprendidas de la lesión

Ilustración 20 Amastigotes de *Leishmania* spp. Provenientes de la lesión del Hámster 4 Tinción tipo Romanowsky (Giemsa) 100X aceite de inmersión Soto/Mariño 2019.

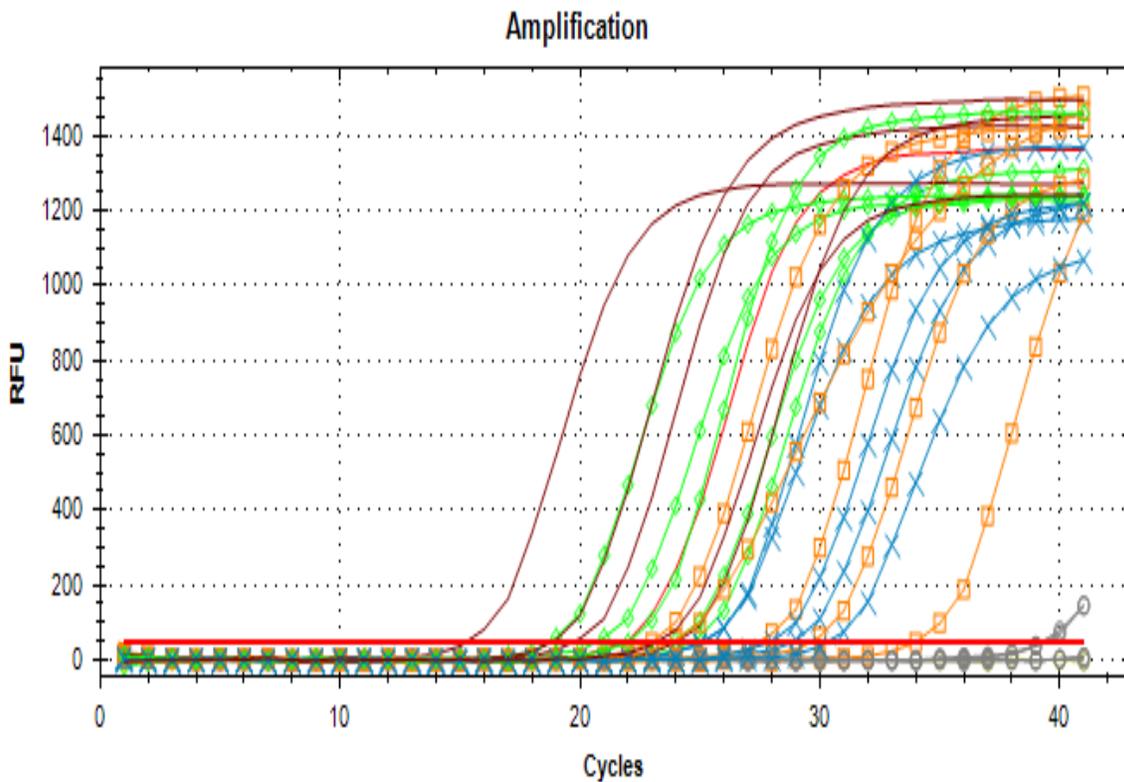


Amastigotes de *Leishmania* spp.

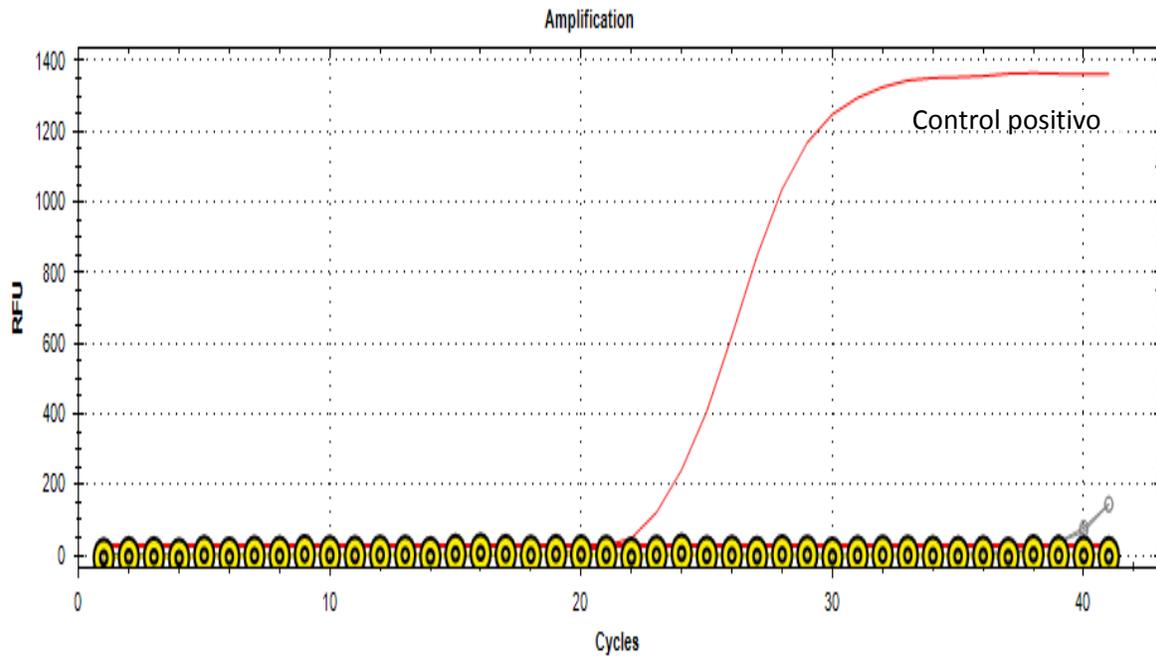
Ilustración 21 Amastigotes de *Leishmania* spp. Provenientes de la lesión del Hámster 5 Tinción tipo Romanowsky (Giemsa) 100X aceite de inmersión Soto/Mariño 2019

## 8.2 Resultados de PCR

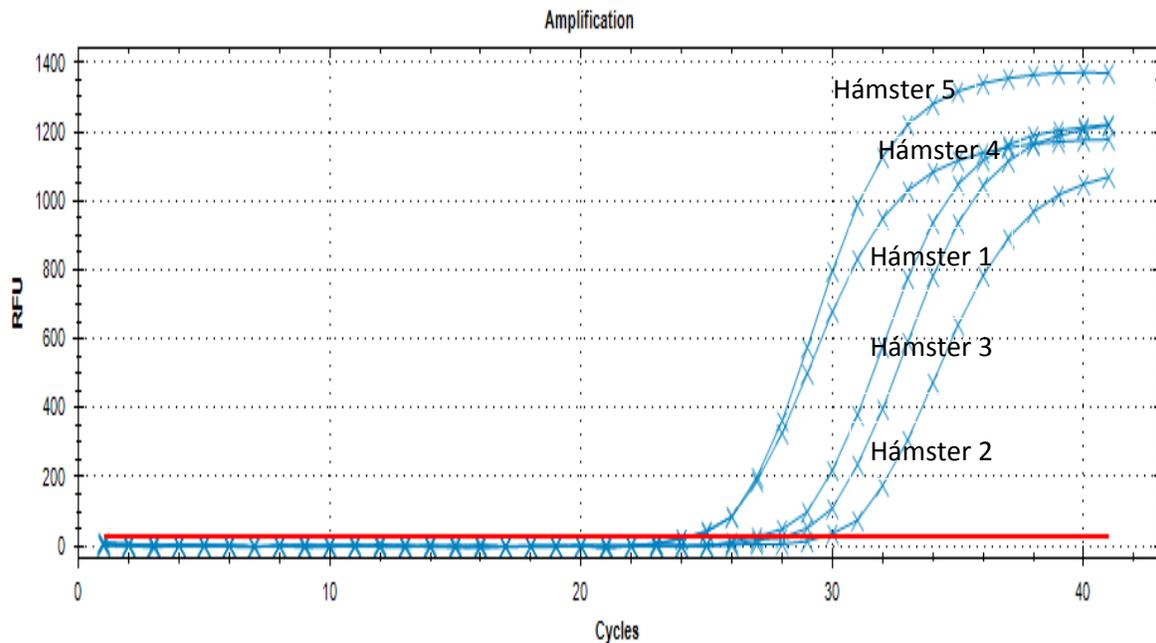
En la siguiente imagen podemos observar las gráficas obtenidas por el software CFX Manager Versión 3.1.1517.0823 de Bio-Rad del termociclador el cual nos permite comparar los diferentes pozos y sus resultados al mismo tiempo, además de mostrarnos el umbral para poder discernir si es positiva o no y el CP (ciclo en el cual la muestra rebaso el umbral), el que entre menor sea mejor es la calidad del DNA utilizado.



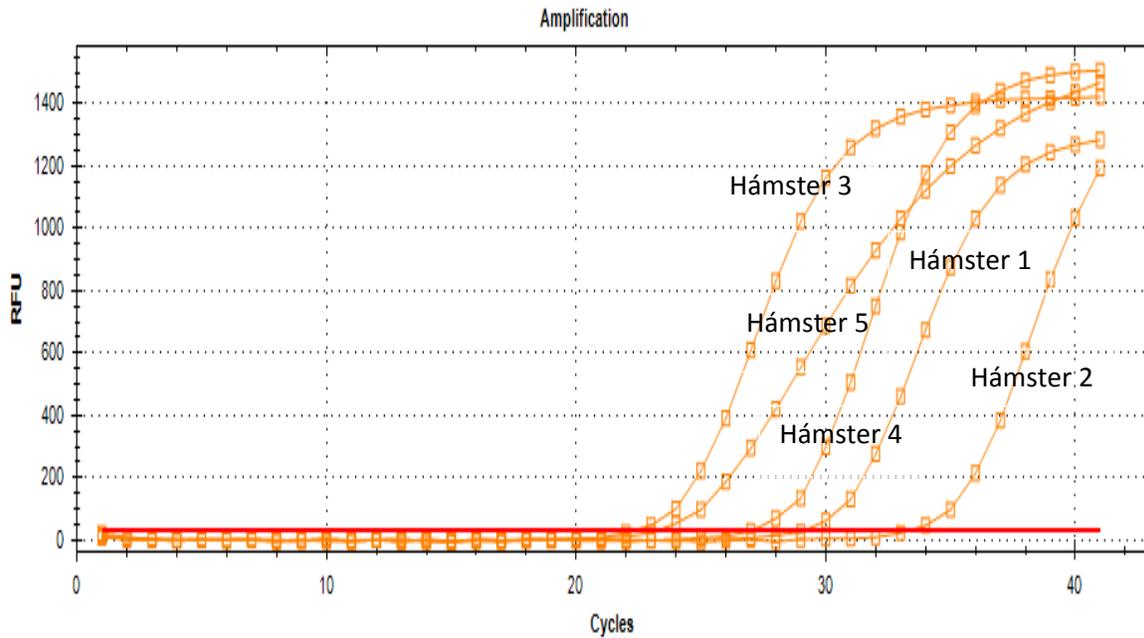
Gráfica 1 Gráfica de amplificación para detectar el género *Leishmania* spp. En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas la fluorescencia. En la gráfica se observan las curvas de amplificación, de color gris podemos observar los blancos de extracción, de amarillo el NTC, de rojo el control positivo, de color las muestras donde el DNA fue extraído a partir de laminillas previamente teñidas con Giemsa, de color naranja las muestras que no recibieron ningún tipo de tratamiento y se mantuvo almacenada a 20°C durante 5 semanas, de color verde las muestras que fueron tratadas de con la mezcla de Guanidina EDTA y almacenada a 20°C durante 5 semanas y de color morado se observan las curvas de las muestras extraídas justo después de la Eutanasia del Hámster.



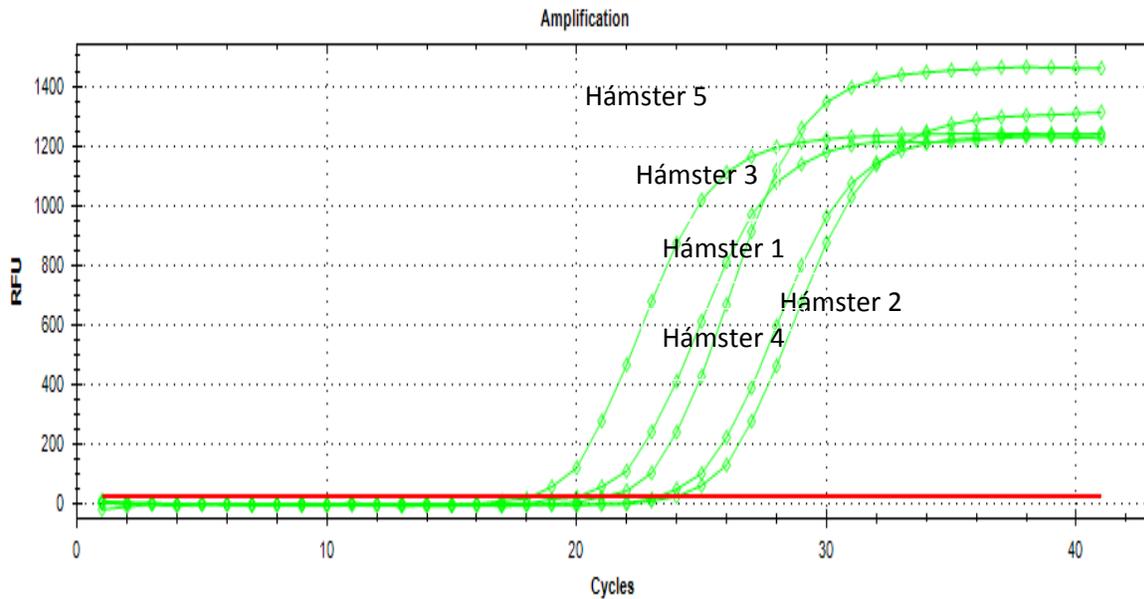
Gráfica 2 Grafica de amplificación para detectar el género *Leishmania* spp. En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas la fluorescencia. En la gráfica se observan de color gris los blancos de extracción, de amarillo el NTC y de rojo el control positivo.



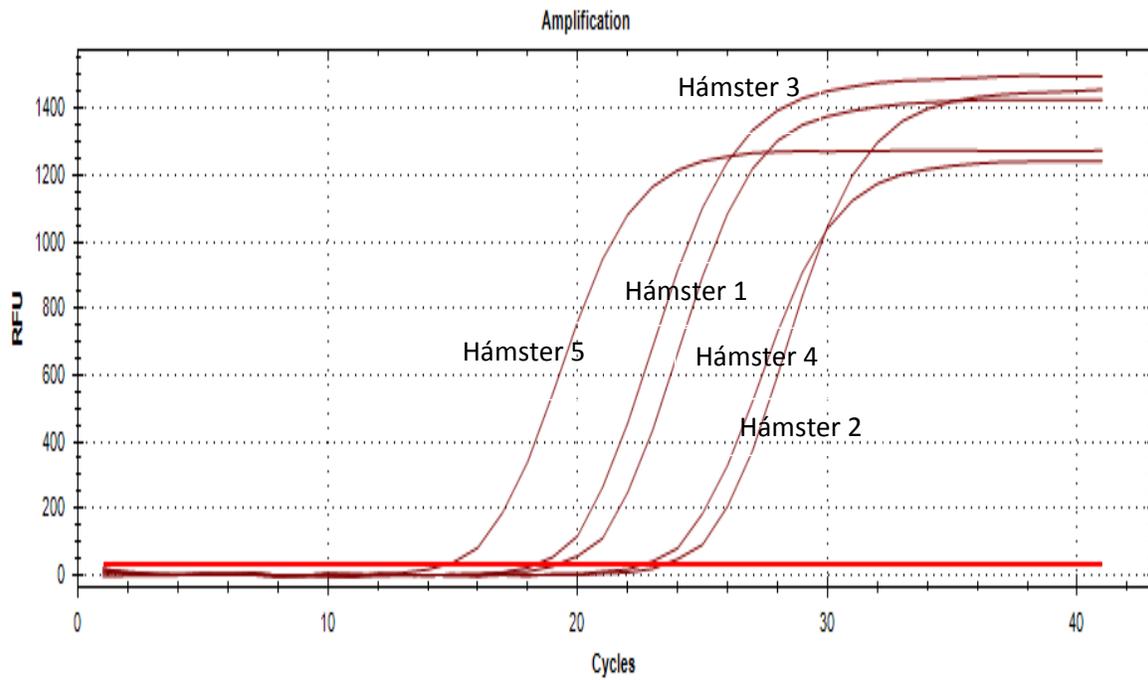
Gráfica 3 Grafica de amplificación para detectar el género *Leishmania* spp. En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas la fluorescencia. En la gráfica se observan de color azul las curvas de amplificación de las muestras donde el DNA fue extraído a partir de laminillas previamente teñidas con Giemsa.



Gráfica 4 Grafica de amplificación para detectar el género *Leishmania spp.* En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas la fluorescencia. En la gráfica se observan de color naranja las curvas de amplificación de las muestras que no recibieron ningún tratamiento y se mantuvo almacenada a 20°C durante 5 semanas.



Gráfica 5 Grafica de amplificación para detectar el género *Leishmania spp.* En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas la fluorescencia. En la gráfica se observan de color verde las curvas de las muestras que fueron tratadas de con la mezcla de Guanidina EDTA y almacenada a 20°C durante 5 semanas.



Gráfica 6 Gráfica de amplificación para detectar el género *Leishmania* spp. En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas la fluorescencia. En la gráfica se observan de color morado las curvas de las muestras extraídas justo después de la Eutanasia del Hámster.



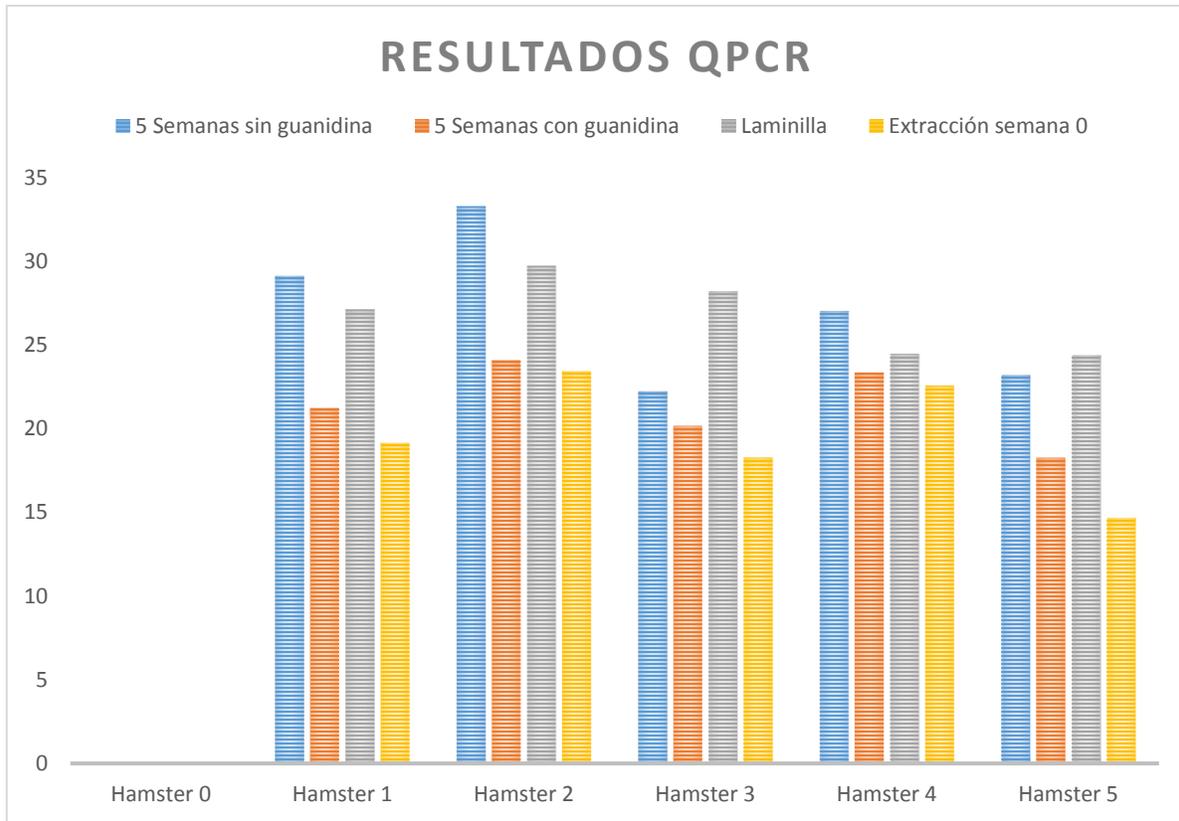
En el cuadro número 2 se agruparon los resultados obtenidos en las corridas de PCR. En la primera columna se enlistan los Tratamientos dados a las muestras siendo estos 1) Los que no fueron tratados con Guanidina y almacenados durante 5 semanas, 2) Los que sí fueron tratados con Guanidina y almacenados durante 5 semanas, 3) Los extraídos de las laminillas previamente teñidas como se mencionó en la metodología y 4) Los que fueron extraídos justo después de la eutanasia del hámster.

Tratamiento	Hámster 0	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5
5 Semanas sin Guanidina	NA	29.11	33.28	22.24	27.03	23.21
5 Semanas con Guanidina	NA	21.24	24.1	20.16	23.36	18.26
Laminilla	NA	27.12	29.72	28.2	24.46	24.38
Extracción semana 0	NA	19.14	23.41	18.27	22.56	14.68

Cuadro 2 Resultados qPCR, se muestran los CP a los cuales amplificaron las muestras (NA no amplifica).

En la gráfica siguiente podemos comparar la diferencia entre resultados provenientes del mismo Hámster dependiendo del tratamiento obtenido antes de la extracción de DNA.

Las muestras que no recibieron tratamiento alguno y fueron almacenadas durante 5 semanas son las que tienen un CP más alto, seguidas de las obtenidas de laminilla, en el siguiente lugar se encuentran las muestras con el tratamiento de Guanidina EDTA y por último las que fueron extraídas justo después de la eutanasia del Hámster.

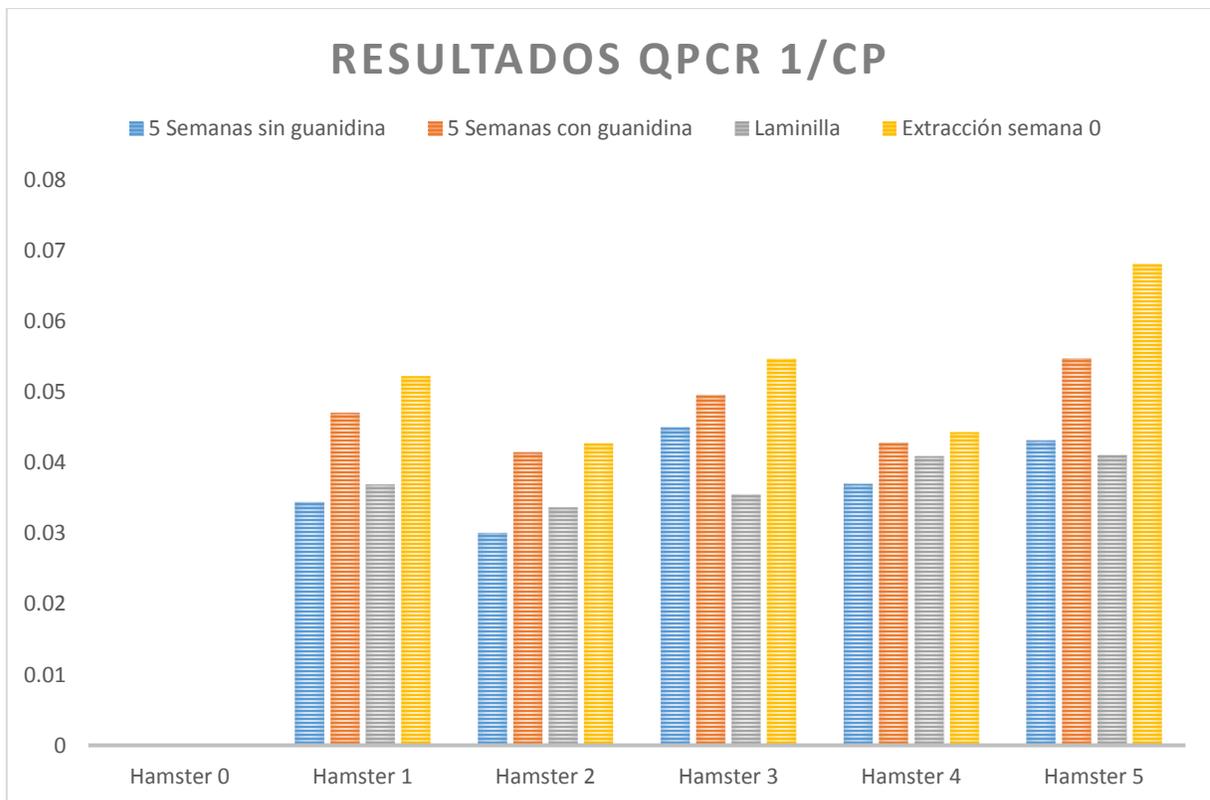


Gráfica 7 Resultados de PCR agrupadas por Origen de muestra y comparación de tratamientos.

Para una mejor visualización de los resultados se tomó la decisión de obtener el inverso de los mismos, para que de esta manera se observen las muestras con mejor calidad de DNA en posiciones más altas en la gráfica.

Tratamiento	Hámster 0	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5
5 Semanas sin Guanidina	NA	0.0343524	0.0300480	0.0449640	0.036995	0.043084
5 Semanas con Guanidina	NA	0.0470809	0.0414937	0.0496031	0.0428082	0.0547645
Laminilla	NA	0.0368731	0.0336473	0.0354609	0.0408830	0.0410172
Extracción semana 0	NA	0.0522466	0.0427167	0.0547345	0.0443262	0.0681198

Cuadro 3 se muestran los CP inversos a los cuales amplificaron las muestras (NA no amplifica).



Gráfica 8 Resultados de PCR inversos agrupadas por Origen de muestra y comparación de tratamientos.



## 9 Discusión

La Leishmaniasis de acuerdo con la OMS es una de las 10 enfermedades tropicales más importantes a nivel mundial, sin embargo, también es una enfermedad desatendida (World Health Organization , 2016).

Como sabemos el diagnóstico de LCL se basa en el cuadro clínico y antecedentes de residencia o procedencia de áreas endémicas con transmisión de la enfermedad, demostración directa al microscopio e indirectamente por inmunología, serología y PCR. (NOM-032-SSA2-2014, 2014)

El diagnóstico por microscopia es relativamente sencillo, pero depende en gran medida de la toma de muestra, de la experiencia del analista y tiene la desventaja de que no nos brinda la especie causante de la Leishmaniasis.

La qPCR ha demostrado tener una mayor sensibilidad y especificidad con respecto a la PCR punto final y nos permite tener resultados en una menor cantidad de tiempo (1 hora aproximadamente), no requiere del uso de otras técnicas como electroforesis, debido a las sondas o marcadores fluorescentes que utiliza y es menos susceptible a contaminaciones. Al ser un método altamente específico ha sido utilizada para el diagnóstico de diversas enfermedades como Malaria y Chagas. (Wortmann, 2005)

El método actual para el diagnóstico de LCL por qPCR en el laboratorio de Leishmania del InDRE, consiste en obtener el material genético a partir de una laminilla previamente fijada con etanol y teñida con Giemsa.



Como mencionamos en el punto 5.3.6 para la visualización del amastigote es necesario hacer una incisión en el borde de la lesión, raspar con un bisturí y el material obtenido distribuirlo en un portaobjetos para después fijarlo con etanol y teñirlo con Giemsa. Por lo cual se decidió utilizar un hisopo de rayón para la obtención de las muestras, debido a que en lesiones viejas y secas es difícil encontrar amastigotes ya que la carga parasitaria disminuye con el tiempo. De esta manera el hisopo puede ser pasado por toda la lesión sin causar un daño mayor al paciente y ya que la prueba es altamente sensible y específica ya que con un amastigote que quede atrapado entre los filamentos del hisopo es más que suficiente para que la prueba detecte al parásito.

Se decidió utilizar una solución de Guanidina con EDTA, la cual evita que se degrade la muestra esto debido a su efecto caotrópico y quelante, manteniendo las muestras en dicha solución por 5 semanas para observar su efecto, esto mediante la desnaturalización de proteínas que pueden degradar el DNA (Endonucleasas) o interferir con la extracción del mismo (Hemoglobina), también atrapando iones como calcio y magnesio entre otros que pudieran funcionar como cofactores en reacciones enzimáticas. (Cornejo, 2013)

Para el experimento se utilizaron 6 hámsteres, inoculando 5 con el parásito y dejando uno como control negativo denominado como hámster 0, los cuales se mantuvieron bajo el cuidado del personal del bioterio del InDRE.



Los hámsteres se observaron semanalmente y a partir del mes 3 post-inoculación empezaron a presentar inflamación en la extremidad donde se les inyectó el parásito, excepto en el control. Con lo cual esperamos un par de semanas más, hasta que la inflamación se observara como la que vemos en la Ilustración 22.

Cuando las lesiones alcanzaron las condiciones descritas en el punto 7.1, con ayuda del personal a cargo del bioterio se sacrificaron a los animales y se les cortó la extremidad infectada a la altura de la rótula. En el caso del hámster 0 se decidió cortar la pata trasera derecha.

Se realizó la toma de las muestras para extracción como se menciona en el punto 5.3.7 para simular el tiempo que puede tardar en llegar una muestra que se encuentre en una región muy alejada del centro de salud donde se pueda dar atención al paciente.

Con el bisturí se hicieron frotis e improntas como se explica en el anexo .11.3 Estos fueron fijados con metanol y después teñidos con Giemsa. Con microscopia de campo claro se observaron los amastigotes con el objetivo 100x que se muestran en las Ilustraciones 23, 24, 25, 26 y 27, donde se aprecia el núcleo de color azulado ligero y el cinetoplasto de color morado o azul intenso de los amastigotes, confirmando que la inflamación fue causada por *Leishmania* spp.



Para la extracción de DNA, se tomó uno de los tubos Eppendorf que no tenían la solución de Guanidina con EDTA (siendo estas las muestras que se tomaron justo después de la eutanasia del hámster) y una de las laminillas que ya hubiera sido utilizada en microscopia de cada uno de los hámsteres. El DNA se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se tuvieran las otras muestras.

Una vez que pasaran las 5 semanas se hicieron las extracciones de las muestras faltantes.

Con todas las muestras listas, se corrió la qPCR obteniendo como resultados las curvas de amplificación de todas las muestras y controles las cuales se observan en la Gráfica 1. Se separaron las curvas con ayuda del software para poder observar de mejor manera la tendencia de los datos. En la Gráfica 2 se muestran los controles negativos y el control positivo, en la Gráfica 3 las muestras de la extracción de la laminilla, en la Gráfica 4 las muestras que no recibieron tratamiento, en la Gráfica 5 las muestras que recibieron el tratamiento de la solución de Guanidina con EDTA y en la Gráfica 6 las muestras que se tomaron después de la eutanasia de los hámsteres.

Comparando los resultados obtenidos por qPCR, se observa que las muestras que recibieron el tratamiento de la solución de Guanidina con EDTA amplifican 9 ciclos antes que las que no recibieron el tratamiento. Con respecto al método de la laminilla, hubo una diferencia de 6 ciclos donde amplifica primero las muestras que, si recibieron el tratamiento, por ultimo las muestras que se extrajeron después de la eutanasia de los hámsteres amplificaron 2 ciclos antes que las muestras con el tratamiento de Guanidina como se observa en el Cuadro 2.



Las muestras que no recibieron el tratamiento amplificaron 2 ciclos después que las muestras que se obtuvieron de las laminillas y 10 ciclos después de las muestras que se extrajeron al momento de la eutanasia de los hámsteres

A todos los resultados de CP se les realizó un inverso y se agruparon en el Cuadro 3 para que al ser observados se entienda que entre más arriba se encuentre en la gráfica resultado, mayor es la concentración de DNA en la muestra

Los resultados de la amplificación obtenidos por qPCR, indican que las muestras que recibieron el tratamiento con la solución de Guanidina EDTA se conservaron mejor que las que no recibieron tratamiento, y que tienen un mejor CP que las muestras extraídas de las laminillas, aunque en este caso no es debido a la conservación si no a la concentración de amastigotes que se encuentra en la laminilla la cual es menor a la que se encuentra en los hisopos.

Con todos estos resultados obtenidos podemos afirmar que lo ideal para realizar esta técnica es tomar la muestra e inmediatamente realizar la extracción del material genético para poder obtener una muestra de mejor calidad y dar un resultado más confiable.

Al no poder ser esto posible en la mayoría de los casos debido a que las zonas endémicas se encuentran alejadas de las ciudades, el mantener la muestra dentro de una solución de Guanidina con EDTA es una muy buena manera de conservar el material genético, en especial cuando las muestras provienen de lesiones muy viejas y secas las cuales muchas veces son dadas como negativas al no encontrarse amastigotes en las tinciones ya sea por una baja carga parasitaria o por una mala toma de muestra comprometiendo así la salud del paciente



Cotejando nuestros resultados con los de otros investigadores que confrontaron el uso de diferentes técnicas y tratamientos para evitar la degradación del material genético en sus muestras, como (Wadl, 2018), que menciona que “No se encontró diferencia entre los valores del DNA entre las muestras almacenadas en etanol al 70% y el almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .” o por (Hildonen, 2019) el cual declara, “Nuestros descubrimientos concluyen que el etanol al 96% supera los otros métodos de almacenamiento (Congelamiento inmediato con hielo seco, RNAlater y DNA/RNA SHIELD) considerando la cantidad y calidad del DNA, costo y trabajo, con esto concluimos que es necesario realizar un estudio para cada técnica ya que los resultados varían dependiendo de la muestra y condiciones de almacenamiento.

Lo trascendental de este trabajo es que se podría proveer de hisopos de Rayón y de la solución de Guanidina con EDTA a la Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) para que cuando se presente un paciente con lesiones muy viejas o de difícil localización puedan realizar una mejor toma de muestra y así tener la certeza que el material que ahí se encuentra llegara en las condiciones óptimas para ser analizado.



## 10 Conclusiones

- a) Se logró evaluar la efectividad de la solución de Guanidina con EDTA en un lapso de 5 semanas como conservador de material biológico de *Leishmania* spp. para su determinación por PCR en tiempo real.
- b) Se logró inocular amastigotes de *Leishmania* spp. en hámster dorado para provocar una infección.
- c) Se logró sacrificar al animal y tomar muestras de las lesiones con hisopos de Rayon para conservar el material genético.
- d) Se logró verificar que el proceso inflamatorio sea causado por *Leishmania* spp. utilizando microscopia de campo claro.
- e) Se logró extraer DNA de los hisopos para poder realizar PCR en tiempo real.



## 11 Referencias

- Alam, M. (2012). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (Vol. 3). McGraw-Hill.
- Beltrán, S. D. (1988). Comportamiento de Flagelados de la Familia Trypanosomatidae en dos Medios de Cultivo Modificados. *Biomedica*, 8, 21-27.
- Bermúdez, H. S. (2005). DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS UTILIZANDO MEDIO DE CULTIVO TSTB EN PACIENTES DE TROPICO DE COCHABAMBA. *Gaceta Medica Boliviana*, 31-35.
- Berrueta, T. (13 de marzo de 2017). *Facultad de medicina departamento de microbiología y parasitología*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- Cáceres, A. G. (2002). Manual de Procedimientos de Identificación de Vectores de Leishmaniosis y Enfermedad de Carrion.
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. (2015). *Manual para el Diagnostico, Tratamiento y Control de las Leishmaniasis*. Ciudad de Mexico.
- Cornejo, R. A. (2013). Extracción y Purificación de ADN. En *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología* (pág. 25).
- D., A. (2013). A comprehensive review about DNA extraction and purification kits cited in literature. *MATER METHODS*, 191.
- Hailu, A. M. (2005). Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PLoS Medicine*, 2(7), 211.
- Hildonen, M. K. (2019). A comparison of storage methods for gut microbiome studies in teleosts: Insights from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of microbiological methods*.
- Mans, D. R. (2017). Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname. *Journal of Clinical y Experimental Dermatology Resaerch*, 8(2), 1-16.
- Montalvo, A. M. (Oct./Dec. de 2008). PCR-RFLP y RAPD para la tipificación de Leishmania neotropical. *Biomédica vol.28*.
- NOM-032-SSA2-2014. (2014).
- OMS. (2010). Control de las Leishmaniasis. *Informe de una reunión del comite de expertos de la OMS*, 200.
- PROYMA GANADERA S.L. (s.f.). *PROYMA Nutricion y Salud Animal*. Obtenido de <https://proymaganadera.com/content/gluquantime-5-ampollas-5-ml>
- Restrepo Isaza, M. (1980). La Reaccion de Montenegro en la Epidemiología de la Leishmaniasis Sudamericana. *Bol Of Sanit Panam*, 2(89), 130-138.
- Rivera, I. O. (2012). *Leishmaniasis cutánea intermedia. Reto terapéutico*. Instituto de Biomedicina, Caracas: piel latinoamerican.



- Rojas Cabrera, E. G. (2012). Utilidad de la prueba de Montenegro (IDRM) como herramienta para la vigilancia epidemiológica de Leishmaniasis cutánea en áreas de Bolivia donde coexiste la infección por *Leishmania* spp y *T. cruzi*. *Gaceta Medica de Bolivia*, 55-58.
- Sánchez, I. C. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 186-192.
- Secretaria de Salud, D. G. (febrero de 2017). *gob.mx*. Obtenido de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/195727/lineamientos\\_para\\_la\\_vigilancia\\_de\\_leishmaniasis.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/195727/lineamientos_para_la_vigilancia_de_leishmaniasis.pdf)
- Soto, L. O. (2015). Caso clínico 02-2015. Varón de 56 años con lesiones dérmicas progresivas, enfermedad pulmonar intersticial, compromiso óseo y mononeuropatía múltiple. *Revista Medica Herediana*, 256-266.
- Velasco, R. (2005). Marcadores Moleculares y la Extraccion de DNA. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*.
- Wadl, P. A.-S. (2018). Method for DNA Isolation From Sweetpotato Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Collected in Pheromone-Baited Traps. . *Journal of economic entomology*, 112(2), 1001-1003.
- Wilson, R. (s.f.). *Ray Wilson Birds and Wildlife photography*. Obtenido de <http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/>
- World Health Organization . (2016). *Informe Epidemiológico de las Américas*. OMS-OPS.
- Wortmann, G. H. (2005). Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(6), 999-1004.
- Zea, D. F. (2009). Complicación mucosa de la leishmaniasis cutánea. *Biomedica*, 9-11.
- Zerpa, O. &. (2009). Leishmaniasis Cutánea Difusa en Venezuela. *Gazeta Médica da Bahia*, 30-34.
- Zijlstra, E. E.-H. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *the lancet infectious diseases*, 87-98.



## 12 Anexos

### 12.1 Material para inoculación en Hámster

#### Materiales y reactivos

- Jeringas para insulina
- Guantes
- Etanol al 70%

#### Materiales biológicos

- 6 Hámster dorado macho
- Cepa de *Leishmania* spp.

### 12.2 Eutanasia de Hámster y Obtención de Material Biológico

#### Materiales y reactivos

- Guantes
- Equipo de disección
- Pisabental (Sol. inyectable de Pentobarbital sódico 6.9g/100mL) Reg. SAGARPA Q-7833-215
- Rompun (Sol. Inyectable de Hidrocloruro de Xilazina 20mg/mL) Reg. SAGARPA Q-0615-035

#### Material Biológico

- Hámster infectado con *Leishmania* spp.



## 12.3 Material para Examen directo (microscopia)

### Materiales y reactivos

- Guantes
- Etanol al 70%
- Solución salina estéril
- Hoja para bisturí #15 desechable
- Mango para bisturí #3
- Porta objetos nuevo y desengrasado
- Metanol absoluto
- Colorante Giemsa
- Gradilla para tinción
- Cronometro
- Toallas de papel absorbente
- Aceite de inmersión
- Papel seda

### Material Biológico

- Extremidad de Hámster

### Equipos

- Microscopio óptico



## 12.4 Material para Extracción de DNA

### Materiales y reactivos

- Guantes
- Etanol al 70%
- Hisopos de Rayon marca Puritan núm. 6 con mango de poliestireno
- Agua libre de nucleasas
- Tubos Eppendorf nuevos y estériles
- Marcador indeleble punta fina
- Kit de extracción DNeasy Blood y Tissue kit
- Etanol grado molecular (96-100%)
- Hipoclorito de sodio al 2%
- Micropipetas (1000, 200, 20 y 10  $\mu$ L) y puntas con filtro

### Material Biológico

- Extremidad del Hámster

### Equipos

- Cabina de bioseguridad
- Vortex
- Microcentrífuga
- Baño María a 56°C



## 12.5 Material para PCR Tiempo Real

### Materiales y reactivos

- Guantes
- Etanol al 70%
- Agua grado Molecular
- Micropipetas (1000, 200, 20 y 10  $\mu$ L) y puntas con filtro
- SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase

### Material Biológico

- DNA

### Equipos

- Cabina de PCR
- Cabina de bioseguridad
- Termociclador CFX96

## 12.6 Preparación de la Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS 1X) 1L

- Pesar los siguientes reactivos y diluir en agitación en 900ml de agua destilada
  - Cloruro de Sodio 8g
  - Fosfato de Sodio dibásico 1.15g
  - Fosfato de Sodio monobásico 0.20g
  - Cloruro de Potasio 0.20g
- Ajustar pH a 7.2. Utilizar, según sea el caso NaOH 1N para subir el pH o HCL 1N para bajar el pH.
- Aforar a 1000mL con agua destilada



### 12.7 Preparación del Colorante de Giemsa

- Realizar una dilución 1:20 del colorante en solución PBS 1X (1mL de colorante más 19mL de PBS)

### 12.8 Preparación de la Solución de Guanidina 6N con EDTA 0.2M 1L

- Pesar 573.18g de Guanidine Hydrochloride Invitrogen™ UltraPure™ catalogo 15502-016.
- Agregar 400ml de la solución de EDTA 0.5M pH 8.0 Promega™ grado biología molecular catalogo V4233.
- Mezclar lentamente hasta que se homogenice.
- Aforar a 1000mL con agua tridestilada del equipo Milli-Q® (Millipore-Ultrapure Water).
- Filtrar la solución con un filtro tipo pirinola de 0.22µm (No ocupar calor en ningún momento)
- Dispensar en alícuotas y almacenar a temperatura ambiente (20°C)

### 12.9 Cantidades y reactivos Master Mix

Reactivo	Volumen µL	Numero de muestras y controles	Volumen total
Agua	4	1 MUESTRA + 1 BLANCO DE EXTRACCION + 1 CONTROL POSITIVO + 1 CONTROL NEGATIVO +1 NTC= 5 MUESTRAS	20
Buffer 2X	12.5		62.5
SuperScript III	0.5		2.5
LeiD_ITSF (10 µM)	1		5
LeiD_ITSR (10 µM)	1		5
LeiD_ITSP (5 µM)	1		5
Volumen final	20		100