

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS**



**POLIMORFISMO DE PARTES VARIABLES DE LOS MINICÍRCULOS DEL  
kDNA EN CEPAS DE LEISHMANIA: MARCADOR GENÉTICO PROPUESTO  
PARA IDENTIFICAR RESERVORIOS.**

**TESIS REALIZADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**POR**

**NELLY LILIAN ROSIO BUITRAGO ROMERO**

**ASESOR: Dra. FRÉDÉRIQUE BRENIÈRE**

**INSTITUTO BOLIVIANO DE BIOLOGÍA DE ALTURA**

**LA PAZ- BOLIVIA**

*A mis hijos  
Marianela, Pamela  
Jorge y Nathalie*

Resumen.....	II
Introducción.....	1

## **CAPITULO I ANTECEDENTES**

Historia de la enfermedad.....	4
2. Taxonomía.....	5
2.1. Criterios extrínsecos.....	5
2.1.1. La morfología.....	5
2.1.2. La clínica.....	6
2.1.3. Comportamiento en cultivo.....	6
2.1.4. Ciclo intravectorial.....	7
2.1.5. Patogenicidad.....	7
2.2. Criterios intrínsecos.....	8
2.2.1. Criterios inmunológicos.....	8
2.2.2. Anticuerpos monoclonales.....	8
2.2.3. Criterios bioquímicos.....	8
2.2.4. Criterios genéticos.....	9
3. Marcador genético.....	10
4. Clonalidad y Leishmaniasis.....	11
5. Clasificación Actual.....	13
6. Morfología y Ultraestructura.....	14
7. DNA de kinetoplasto.....	15
7.1. kADN de minicírculos.....	15
7.2. kADN de maxicírculos.....	16
8. Ciclo de vida.....	17
8.1. En el huésped invertebrado.....	17
8.2. En el huésped vertebrado.....	17
9. Vector.....	18
10. Reservorio.....	20
11. Formas Clínicas.....	22
11.1. Leishmaniasis visceral.....	22
11.2. Leishmaniasis cutánea.....	23
11.3. Leishmaniasis muco-cutánea.....	25
12. Diagnóstico.....	26
13. Tratamiento.....	28
14. Vacuna.....	31
15. Técnicas utilizadas.....	32
15.1. Extracción de DNA.....	32

15.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	33
15.3. Electroforesis.....	33
15.4. Electroforesis de isoenzimas.....	35
15.5. Distancias feneticas de Jaccard.....	37
15.6. Distancias genéticas de Nei.....	37
15.7. Dendrograma.....	37
15.8. Hibridación.....	38
Justificación.....	39
Objetivos.....	40

## CAPITULO II MATERIAL Y METODOS

1. Material Biológico.....	41
1.1. Cepas de Referencia.....	41
1.2. Elección de la zona.....	43
1.3. Aislamiento de cepas autóctonas.....	44
1.4. Cepas autóctonas.....	44
1.5. Captura de animales y toma de muestra.....	45
1.6. Sangre de Paciente.....	46
2. Métodos de cultivo.....	46
2.1.4. Criopreservación.....	46
3. Extracción de DNA.....	47
3.1. A partir de sedimentos de parásitos.....	47
3.2. A partir de sangre.....	48
3.3. A partir de tejido.....	48
4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	49
4.1. Sensibilidad y Especificidad de cebadores L1 y L2 en DNA purificado de cepas de Referencia.....	52
4.2. Reproducibilidad de la técnica de PCR.....	52
4.3. Control de Inhibición de la PCR sobre muestras biológicas.....	52
5. Análisis electroforético.....	53
5.1. En gel de agarosa.....	53
5.2. En gel de acrilamida.....	53
5.2.1. Preparación del gel.....	55
5.2.2. Coloración del gel.....	56
6. Estudio Comparativo entre dos marcadores genéticos.....	58
7. Hibridación.....	58
7.1. Condiciones de hibridación y marcado de la sonda....	58
8. Electroforesis de isoenzimas.....	59
8.1. Preparación de extractos isoenzimáticos.....	59
8.2. Sistemas enzimáticos y electroforesis.....	60

8.3. Revelado de las placas.....	60
9. Análisis estadístico de la variabilidad isoenzimática y de los productos de PCR.....	61
9.1. Distancias de Jaccard.....	61
9.2. Distancias genéticas de Nei.....	61
9.3. Construcción de Dendrogramas.....	61

### **CAPITULO III RESULTADOS**

1. Análisis del polimorfismo del kADN de los minicírculos.....	62
1.1. Aplicación de la técnica de PCR sobre cepas de referencia.....	62
1.2. Análisis electroforético de los productos de PCR en gel de poliacrilamida.....	68
1.4. Análisis Fenotípico.....	69
1.5. Estudio comparativo entre dos marcadores genéticos..	69
2. Estudio del polimorfismo de Leishmania autóctonas.....	70
2.1. Prueba de inhibición de la PCR en muestras biológicas sangre y tejidos.....	70
2.2. Obtención de productos de PCR e Hibridación.....	71
2.2.1. De sangre de animales.....	71
2.2.2. Cepas aisladas de pacientes.....	74
2.2.3. Cepas aisladas de vectores.....	74
2.2.4. Sangre de pacientes.....	74
2.3. Análisis del polimorfismo de los productos PCR electroforesis en gel de acrilamida.....	76
2.4. Estudio comparativo con el análisis isoenzimático de las cepas autóctonas.....	77
Conclusiones.....	78
Discusión.....	79
Perspectivas.....	82
Bibliografía.....	83
Anexo 1.....	96
Anexo 2.....	98
Anexo 3.....	100

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 5 de los 9 Departamentos de Bolivia, que registra actualmente un comportamiento ascendente, debido a la creación de nuevas áreas de colonización en zonas tropicales y subtropicales.

A partir de la secuenciación de las partes conservadas de los minicírculos del kDNA de una cepa de *Leishmania brasiliensis* (MHOM/BR/75/M2904), realizada por de Bruijn y Barker en 1992, se escogieron cebadores que amplifican mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), partes variables de los minicírculos del kDNA de cepas de *Leishmania* pertenecientes a diferentes complejos.

Este trabajo muestra un estudio electroforético del polimorfismo de partes variables de los minicírculos de kDNA de cepas de referencia, el análisis está basado en las distancias de Jaccard que cuantifica las diferencias fenéticas por la proporción de bandas comunes entre dos cepas y fue representado en un Dendrograma.

Este marcador genético kDNA-PCR, fue comparado con un estudio isoenzimático realizado por Guerrini en 1993 sobre las mismas cepas de referencia.

Usando el marcador genético kDNA-PCR, se realizó la búsqueda de reservorios en dos zonas endémicas de Bolivia.

La caracterización de muestras positivas se realizó por hibridación con sondas específicas de tres complejos de *Leishmania* y mediante polimorfismo kDNA-PCR.

Las cepas aisladas de pacientes y vector fueron caracterizadas por hibridación con sondas específicas, polimorfismo kDNA-PCR y electroforesis de isoenzimas como técnica convencional.

El polimorfismo kDNA-PCR se constituye en una impresión digital de cada cepa, capaz de distinguir taxonómicamente hasta especie.

A través de este método fueron caracterizadas las cepas autóctonas y encontrados los reservorios más probables de *Leishmania amazonensis* en una zona endémica estudiada.

### **PALABRAS CLAVES:**

- Polimorfismo, kDNA, PCR, Leishmania, isoenzimas.

## SUMMARY

The Leishmaniasis is an endemic illness in five of the nine departments of Bolivia that registers an upward behavior at the moment, due to the creation of new colonization areas in a tropical and subtropical areas.

Starting from the sequence of the conserved parts of the minicircle of the kDNA of a strain of *Leishmania braziliensis*, carried out for de Bruijn and Barker in 1992, primers were chosen that amplify by means of the technique of the Polymerase chain reaction variable parts of the minicircles of kDNA of strain of *Leishmania* belonging to different complex.

This work shows a electrophoretic study of the polymorphism of variables parts of the minicircles of kDNA of reference strain, the analysis is based on the distances of Jaccard that it quantifies the fenetic differences between two strain for the proportion of common bands strain and it was represented in a Dendrogram.

This genetic marker kDNA-PCR, was compared with a isozymic study carried out by Guerrini in 1993 on the same reference strain.

Using the genetic marker kDNA-PCR, one carries out the reservoirs search in two endemic areas of Bolivia.

The characterization of positive samples one carries out for hibridation with specific probes of three complexes of *Leishmania* and by means of kDNA-PCR polimorphism.

The isolated of patients strain and vector was characterized by hibrydation with specific probes , kDNA-PCR polimorphism and electroforesis isoenzimes like conventional technique .

The kDNA-PCR polimorphism is constituted in a "finger printing" of each strain, able to distinguish taxonomy until species.

Through this method the autochtonous strain were characterized and the reserervoirs were found but probable of *Leishmania amazonensis* in a studied endemic area.

### KEY WORDS:

polimorphism, kDNA, PCR, Leishmania, isoenzimes.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Frédérique Brenière, por sus enseñanzas, gran paciencia y apoyo durante la elaboración de este trabajo. A la Dra. Marie France Bosseno por su constante estímulo y crítica constructiva en la revisión de mi trabajo.

Agradezco también al Dr. Francois Le Pont por realizar la captura de animales, Dr. Miguel Torrez, Dr. Eddy Martínez por su colaboración en la toma de muestras de pacientes.

Al proyecto " Leishmaniasis: Risk factors and self-protections". Financiado por World Bank / World Health Organization / TDR Grant 940902

ORSTOM Instituto Francés de investigación para el Desarrollo en Cooperación, Ministerio Francés de Asuntos Exteriores.

Al Instituto Boliviano de Biología de Altura.

Finalmente deseo expresar mi profundo agradecimiento a mi familia que me animó cuando más lo necesitaba.

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

Las leishmaniasis son histoparasitosis producidas por protozoarios del género *Leishmania* de localización intracelular caracterizada por lesiones cutáneas, mucosas, mucocutáneas y viscerales. Estas parasitosis son transmitidas por la picadura de insectos del género *Phlebotominae*. Son consideradas entre las zoonosis debido a que existe en la naturaleza reservorios domésticos y silvestres (Neghme, 1984).

Estas parasitosis tienen una distribución mundial a excepción de Australia. Afectan a una población de 79 países a razón de 400.000 nuevos casos por año. La Organización Mundial de la Salud estima que tres millones de humanos sufren la enfermedad, doce millones están infectados y trescientos cincuenta millones viven en áreas de riesgo (Shaw *et al.*, 1996).

La caracterización temprana del parásito es clínicamente importante (Marsden *et al.*, 1985), para determinar el tipo de tratamiento a seguir y evitar problemas posteriores, por ejemplo: la lesión cutánea causada por la *Leishmania brasiliensis* puede sanar por sí misma, o producir una metástasis resultando en severas desfiguraciones (Hommel, 1978).

Debido a la escasez de estos parásitos en las lesiones es difícil su aislamiento y cultivo *in vitro* para realizar su caracterización isoenzimática (de Bruijn and Baker, 1993).

Buscar los reservorios tanto salvajes como domésticos, dará lugar a posibles medidas apropiadas de control de la enfermedad. Muchos reservorios no presentan lesiones que indiquen que están infectados. Así, es necesario buscar otros métodos de identificación y caracterización de los parásitos, sensibles y específicos e identificar directamente el agente en muestras biológicas, como biopsias humanas de lesiones, sangre, piel sana y tejidos profundos de mamíferos reservorios.

En Bolivia se ha ido realizando trabajos de investigación en algunas

Instituciones.

Dedet *et al.*, (1993) en un estudio retrospectivo del número de casos presentados en Bolivia entre los años 1975 y 1991, reporta un número total de casos encontrados de 4.058.739, y una incidencia anual de 200 nuevos casos, 40 de los cuales incluye afectación a mucosas.

Son reportadas también 3 zonas de diferente endemicidad en Bolivia que involucra a 5 de los 9 departamentos. La región con más alta incidencia se encuentra en los valles de los Yungas y Alto Beni de La Paz (3,2%). Los departamentos de Beni y Pando presentan una moderada endemicidad (0.6% a 0.5%) respectivamente. En los departamentos de Santa Cruz y Cochabamba (Chapare) existen zonas de baja endemicidad (0.06% - 0,05%) respectivamente.

Dedet *et al.*, (1991) en 221 pacientes bolivianos, reportan 136 pacientes con lesiones cutáneas y 85 casos de lesiones muco-cutáneas; en ambos casos, las cepas aisladas y caracterizadas por isoenzimas, fueron identificadas como *Leishmania brasiliensis*.

El primer caso de leishmaniasis visceral en Bolivia fue reportado por Desjeux, (1983) en un niño de 2 años de edad, nacido en la provincia de Sud-Yungas del departamento de La Paz. En 1991 fue reportado un nuevo caso de Leishmaniasis visceral por Dedet *et al.*,(1991) en un paciente de 11 años de edad originario de villa Calizaya situada al nor-oeste del departamento de La Paz en la zona de Sud-Yungas. El parásito fue identificado como *Leishmania chagasi*.

Le Pont y Desjeux (1992) revisaron 1.550 historias clínicas del Servicio de Parasitología del Instituto Boliviano de Biología de Altura. De 74 niños 53 (71,6 %) tenían lesiones cutáneas puras, 17 (22,4 %) con lesiones cutáneo-mucosas y 4 (5,4 %) con leishmaniasis visceral. Aunque se considera que los pocos casos detectados de leishmaniasis visceral dan una imagen falsa de la endemia, por tanto debe realizarse nuevos estudios.

Recientemente, (1996) un equipo de investigadores del Instituto Boliviano de Biología de Altura, reportaron el primer foco de *Leishmania amazonensis* en el departamento de La Paz, zona de Cajuata de los Yungas (datos no publicados).

De acuerdo a información actual proporcionada a un periódico local por la Secretaría Nacional de Salud y el Programa de Vigilancia y control de la leishmaniasis, se indicó que en Bolivia se puede considerar que la endemia tiene un comportamiento ascendente, ya que se reporta en 1989 125 nuevos casos, en 1992 1.004 casos y en 1996 1.493 casos. También se estima que alrededor de 760 mil personas están en riesgo de contraer la enfermedad (PRESENCIA enero 5, 1997).

# CAPITULO I

## ANTECEDENTES

### 1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

Los agentes patógenos fueron descritos por primera vez por Borowsky en 1900 de la Leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo. En 1903 simultáneamente Leishman y Donovan describieron el agente del Kala-azar.

En América Latina las leishmaniasis son conocidas desde tiempos antiguos. Una variedad de la forma cutánea era llamada, desde épocas preincásicas, como espundia o uta (del quechua ut=roer). Los ceramistas representaron formas de uta en piezas de cerámica cocida llamadas "huacos antropomórficos", (Neghme, 1984) donde se representan de manera característica las lesiones mutilantes de la cara, destrucción de la nariz y de los labios (Brucker, 1989).

Las primeras descripciones clínicas datan de la invasión española. Fernando Oviedo en 1535 y Fernando Pizarro en 1571, describen una "enfermedad que afecta a los indígenas en la ladera Este de la Cordillera de los Andes, en los valles calientes y húmedos, donde cultivan la coca: enfermedad que les destruye la nariz y las cavidades nasales".

Al inicio del siglo XX (1909) Underberg, Carini y Paranhos descubren los parásitos en lesiones de pacientes en el Brasil. En 1911 Vianna describe la especie *Leishmania brasiliensis*. En 1913 Migone describe el primer caso de Kala-azar en América Latina. En 1920 Cerqueira demuestra el rol de los flebótomos (Brucker, 1989).

Biagi estudió la epidemiología de la úlcera de los chicleros en Yucatán, y en 1953 define al agente responsable como *L. trópica*.

Floch H (1954) definió como *L. guyanensis* al agente del Pian bosque.

En años recientes Lainson y Shaw (1972) identificaron al agente de la forma cutánea difusa como *L. amazonensis*, también precisaron el papel de *L. panamensis*.

## 2. TAXONOMIA.

Desde el descubrimiento de la *Leishmania*, los investigadores enfrentaron problemas para su identificación, debido principalmente a la homogeneidad en la morfología de estos parásitos. Esta también fue la causa para que estos parásitos fueran nombrados por sus caracteres extrínsecos. Así clasificaron las *Leishmania* por diferentes criterios: clínicos, morfológicos, distribución geográfica, la epidemiología, el poder patógeno y el ciclo intravectorial.

Sin embargo, estos criterios han sido insuficientes para la clasificación y en años recientes se han usado caracteres intrínsecos, inmunológicos, bioquímicos y genéticos (Lumsden, 1974).

### 2.1. CRITERIOS EXTRINSECOS

#### 2.1.1. LA MORFOLOGIA

La morfología del parásito fue uno de los primeros criterios usados para clasificar a la *Leishmania*.

Yakimof y Schokhor (1914) diferenciaron 2 variedades del Viejo Mundo: *Leishmania trópica* variedad menor y *Leishmania trópica* variedad mayor (Yakimoff, 1915; Yakimoff, 1914).

En el Nuevo Mundo, Muniz y Medina (1948) se basan en el mismo criterio para diferenciar a la *Leishmania enriettii* de otras especies.

Posteriormente Lainson y Shaw (1987) usaron la morfología como criterio para diferenciar *Leishmania brasiliensis* de *Leishmania amazonensis*.

Hommel (1978) usando morfometría en microscopio electrónico, estudió la morfología de los amastigotes de diferentes especies y llegó a la conclusión de que *Leishmania major* y *Leishmania mexicana* tiene tallas similares.

Al no obtener resultados satisfactorios los investigadores abandonaron la morfología como medio de identificación y clasificación.

### **2.1.2. LA CLINICA**

Tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, fue usada la clínica como criterio de clasificación. Por ejemplo en el Viejo Mundo se relacionó con la forma visceral a la *Leishmania donovani* (Donovan, 1903; Gardener, 1977), con la forma cutánea, a la *L. trópica* variedad menor y cutánea húmeda *L. trópica* variedad mayor (Yakimoff, 1915; Yakimoff, 1914). Con la forma tegumentaria se relacionó la *L. brasiliensis* (Vianna 1911) y *L. chagasi* con la forma visceral americana en el Nuevo Mundo (Biagi, 1965).

Actualmente se sabe bajo datos isoenzimáticos, que usando como criterio la clínica se pueden cometer muchos errores, debido a que cada patología se atribuye a más de un agente causal: la leishmaniasis cutáneo-mucosa puede ser causada por *L. brasiliensis* (Marsden, 1986), *L. panamensis* (Arias, 1988), *L. guyanensis* (Naiff *et al.*, 1988) y *L. amazonensis* (Sampaio, 1985).

### **2.1.3. COMPORTAMIENTO EN CULTIVO**

El medio NNN fue adaptado para el cultivo de la *Leishmania* por Novy Mac Neal y revisado por Nicolle en 1908.

En 1931, Adler y Theodor demostraron que *L. trópica* y *L. major* tienen diferente crecimiento en medio de cultivo (Adler y Theodor, 1931).

Mediante este método Lainson y Shaw (1972) llegaron a diferenciar dos especies simpátricas en el norte del Brasil, una forma lenta y una forma rápida.

Posteriormente vieron que en el cultivo, según la cepa, se necesita un tiempo de adaptación al medio y también influye su metabolismo de modo que se consideró un método poco fiable.

#### 2.1.4. CICLO INTRAVECTORIAL

Adler y Theodor (1927) observaron por primera vez la diferencia del comportamiento del parásito dentro del vector. Propusieron usar como criterio para clasificar *L. brasiliensis*, *L. trópica* y *L. infantum* el comportamiento dentro del intestino del *Phlebotomus papatasi*.

En 1963 Herting y Mc Connel observaron que *L. brasiliensis* se multiplica en la porción posterior del intestino medio del insecto. Después Lainson y Shaw (1987) propusieron clasificar de acuerdo a la distribución de los parásitos en el intestino del vector. Los parásitos de *Leishmania* cuyos promastigotes se desarrollan en el intestino medio y anterior del vector (sección suprapylaria) y el subgénero *Viannia*, parásitos restringidos al intestino posterior (Sección perypilaria).

El primero que agrupó a las Leishmaniasis del Nuevo mundo en dos complejos: *brasiliensis* y *pifanoi* fue Pifano (1960) basándose en la descripción hecha por Medina y Romero (1957).

Posteriormente otra vez Lainson y Shaw (1972,1973), categorizaron a estos parásitos en complejos *mexicana* y *brasiliensis*, basándose en el comportamiento del parásito en el intestino del vector.

#### 2.1.5. PATOGENICIDAD

Muchos autores usaron la patogenicidad o la evolución del parásito en animales de laboratorio.

Stauber (1958) vio que estos métodos debían ser estandarizados tomando en cuenta los factores que intervienen en los resultados, tales como la cantidad del inóculo, el punto de inoculación, la virulencia de la cepa, la respuesta inmunitaria etc.

Lainson y Shaw (1979) proponen la clasificación de las *Leishmania* mediante su poder patógeno y su tropismo en animales de laboratorio.

## **2.2. CRITERIOS INTRINSECOS**

### **2.2.1. CRITERIOS INMUNOLOGICOS**

Dentro de los criterios intrínsecos se encuentran los criterios inmunológicos. Se refiere a un factor excretado por el parásito durante la fase exponencial en el medio de cultivo, estos se van acumulando. El cultivo con los factores acumulados se inocula a animales de laboratorio, los que producen anticuerpos, que se pueden usar como marcadores en técnicas de inmunodifusión con suero homólogo o heterólogo, debido a que diferentes *Leishmania* producen diferentes factores. Esta técnica fue introducida por Schnur *et al.* (1981,1982).

### **2.2.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Desde la década de los 80, los anticuerpos monoclonales fueron usados con mucho éxito por McMahon-Pratt y David (1981).

La existencia de determinantes antigénicos especie-específicos en las *Leishmania* que son reconocidos por suero inmune policlonal, dio como resultado posteriormente el desarrollo de la tecnología del hibridoma, anticuerpos monoclonales que fueron producidos contra todas las especies de *Leishmania* a partir de glycoproteínas de membrana del parásito (MacMahon-Pratt, 1984).

Muchos de los trabajos publicados, indican que los anticuerpos monoclonales distinguen taxonómicamente hasta especies de *Leishmania* con una especificidad bastante alta hasta del 80%. Además, MacMahon-Pratt (1982) produjo anticuerpos monoclonales que distinguieron entre subespecies dentro del complejo *brasiliensis*.

### **2.2.3. CRITERIOS BIOQUIMICOS**

Los criterios bioquímicos por ejemplo: la radiorespirometría, basada en el consumo de sustratos por los promastigotes en cultivo tales como azúcares o aminoácidos Decker y col. (1977) indican que este método es muy sensible

(Bowman 1976, 1978).

Con el avance de la ciencia se realizó la identificación isoenzimática.

Primero se hicieron fenogramas basándose en la semejanza sin considerar la filogenética. Fue Henning (1965) quien condujo a la elaboración de árboles filogenéticos, dándose ya una etapa evolucionista.

El método isoenzimático se basa en el estudio de la movilidad de las proteínas enzimáticas por electroforesis (Kilgour y Godfrey, 1973).

#### **2.2.4. CRITERIOS GENETICOS**

Existen varios métodos basados en el estudio del genoma además del análisis isoenzimático, entre estos están la densidad de flotación del DNA que se basa en la medida de la densidad del DNA que varía según la cantidad de guaninas y citocinas que tenga. La precisión de esta técnica fue demostrada por Chance quien adaptó este método a la *Leishmania* (Chance, 1972).

Actualmente la biología molecular ha proporcionado potenciales herramientas que nos permiten acceder a información genética mediante el análisis de los ácidos nucleicos, el DNA y el RNA (Dossier, 1990).

Entre otros, son la hibridación mediante sondas marcadas de DNA y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR permite detectar DNA del orden del fenograma (de Bruijn and Barker, 1992) y de ser utilizados directamente sobre muestras biológicas de pacientes o reservorios (de Bruinj y Barker, 1993).

La PCR es muy útil para un mejor conocimiento de la genética de los parásitos, la filogenia, variabilidad genética, genética de poblaciones, monitoreo de nuevos tratamientos y diagnóstico más efectivo.

Ravel *et al* (1995), mediante la PCR sobre DNA de kinetoplasto, desarrolló un procedimiento rápido y directo para la detección de *L. Infantum*, dentro de

células mononucleares, logrando detectar un parásito en un millón de células humanas, realizando posteriormente la hibridación, paso que confirmó el diagnóstico específico.

Desarrollando cebadores de análisis del kDNA del minicírculo y a través de la PCR, Barker *et al.* (1992), identificaron *L. donovani* en aspirados esplénicos y muestras de sangre tomadas de pacientes con Kala-azar, y propusieron este método como altamente sensitivo para el diagnóstico del Kala-azar.

El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea, realizado por Rodríguez *et al.* (1994), empleando cebadores que amplifican partes conservadas de minicírculos del kinetoplasto y posterior hibridación con sondas específicas de kDNA obtuvieron una sensibilidad el 98% en pacientes positivos para el test de Montenegro y demuestran que la PCR junto con la hibridación no solo puede ser usada para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea, sino también para discriminación taxonómica esencial, para epidemiología y terapia.

de Bruijn y Barker (1993) desarrollaron un par de cebadores que amplifican kDNA de minicírculos de cepas pertenecientes al complejo brasiliensis en muestras biológicas de pacientes, mamíferos y vectores, mostrando que este método es muy útil para la detección de vectores y reservorios.

Todos estos investigadores usaron cebadores que amplifican sobre kDNA de minicírculos, obteniendo alta sensibilidad dada por el número de DNA blanco, ya que se considera que existe  $5 \cdot 10^3$ - $10^4$  minicírculos por parásito.

### **3. MARCADOR GENETICO.**

Marcador genético: Características genotípicas o fenotípicas, que permiten localizar una célula, un cromosoma, algunos permiten seleccionar clones particulares.

La búsqueda de nuevos marcadores genéticos que discriminen en la taxonomía de la *Leishmania* se realiza constantemente.

Así, en la actualidad se usan como marcadores genéticos la electrofóresis de isoenzimas que proporciona importante información taxonómica por el análisis numérico de las bandas electroforéticas, que pueden variar de acuerdo a diferentes alelos o frecuencias genotípicas de loci que están presentes en distintas cepas del parásito (Shaw, 1996).

Morel *et al.*(1980) propusieron el término "schizodeme" para describir subpoblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentando un mismo perfil de restricción del kDNA.

Para la *Leishmania* se usó también este método con mucho éxito, por ejemplo fue usado para discriminar subespecies de *L. brasiliensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. trópica* (Borst *et al.*, 1982).

El RAPD (random amplified polymorphic DNA) es otro método usado para la obtención de marcadores genéticos, a través de identificar polimorfismo de fragmentos de DNA que discriminen unas cepas de otras (Williams *et al.*,1990).

También se han usado secuencias repetitivas de DNA genómico ( Piarroux *et al.*,1995), secuencias de subunidades pequeñas del gen de rRNA (Mathis and Deplazes, 1995), sondas a partir de unidades repetitivas de espaciadores ribosómicos intergénicos que no se transcriben (da Silveira *et al.*, 1992), DNA de kinetoplasto (de Bruijn and Barker, 1992) etc.

#### **4. CLONALIDAD Y LEISHMANIA**

Ultimamente la clonalidad en *Leishmania* a sido un punto de debate. Tibayrenc *et al.*,(1995) propusieron varios criterios de clonalidad basados en test estadísticos evaluando los dos fenómenos, segregación en un locus y recombinación entre loci, que son consecuencias de la reproducción mendeliana. Siendo los resultados de estos test no compatibles con una reproducción mendeliana, los autores proponen la clonalidad como modo de reproducción principal. En el caso particular de la *Leishmania*, una revista general de los datos de la literatura (principalmente caracterización por isoenzimas) argumenta ampliamente para una estructura clonal de las especies de *Leishmania* (Tibayrenc,

1995).

Una de las críticas hecha en contra de esta hipótesis, es el análisis de muestreos de cepas no siempre simpátricas. Tibayrenc refuta este argumento por la existencia de genotipo multiloci dominantes que se encuentran en zonas extensas y alejadas. Pero el impacto de posibles intercambios sobre la evolución de estos parásitos merece más estudios. En efecto *in vitro* se observó bajo microscopia fusión celular en *Leishmania infantum* (Lanotte y Rioux, 1990). Este fenómeno podría ocurrir en la naturaleza, pero no parece ser suficientemente frecuente para romper la importancia de la propagación clonal.

En consecuencia cada genotipo identificado representa una categoría estable la cual puede ser usada como marcador epidemiológico.

## 5 CLASIFICACION ACTUAL

---

Reino	Protista
SubReino	Protozoa
SubPhylum	Sarcomastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
SubOrden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae

### Géneros

*Critidia Herpetomonas Saureleishmania Trypanosoma Edotrypanum*  
*Leptomonas Blastocrithidia Leishmania Phytomonas*

### Subgéneros

*Leishmania*

*Viannia*

### Complejos\*

*L.donovani L.tropica L.mexicana L. Hertigi L. brasiliensis*

### Especies

*L.donovani L.tropica L.mexicana L. Hertigi L. brasiliensis*  
*L.infantum L.aethiopica L.amazonensis L. Deanei L. peruviana*  
*L.chagasi L. Major L.pifanoi L. panamensis*  
*L.archibaldi L. gerbilli\*\* L.garnhami L. guyanensis*  
*L. venezuelensis L. Lainsoni*  
*L.aristidesi\*\* L. naiffi*  
*L.enriettii\*\* L. shawi*  
*L. equatorensis\*\**  
*L. colombiensis*

---

La posición sistemática y clasificación del género *Leishmania* fue usado en el Reporte Técnico de la Organización Mundial de la Salud (1990).

\* Término fuera de status taxonómico

\*\* No encontradas en el hombre

## 6.- MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

Desde el inicio de los estudios sobre este parásito se pensaba que la *Leishmania* presentaba solo dos estadios, actualmente se indica que estos parásitos existen en tres formas morfológicas, las formas son nombradas de acuerdo a la disposición del flagelo (Molineux, 1987).

El estado de promastigote es un organismo alargado midiendo aproximadamente de 15 a 20 micrones de longitud. En la extremidad anterior se encuentra el flagelo libre y en la extremidad posterior se encuentra el núcleo aproximadamente central. El kinetoplasto está situado en posición anterior.

El estado amastigote es un pequeño corpúsculo oval o redondeado de 2 a 6 micrones. El microscopio óptico muestra un núcleo y un kinetoplasto, pero al microscopio electrónico muestra un bosquejo de flagelo.

Los paramastigotes, llamados también promastigotes metacíclicos se caracterizan por tener una forma oval de menos de 12 micrones de tamaño con un kinetoplasto paranuclear y un flagelo que emerge del extremo anterior. Los promastigotes metacíclicos han sido asociados con infectividad y cambios estructurales de glicolípidos de superficie (LPG) (Da Silva, 1987).

El núcleo se encuentra envuelto por dos membranas. La membrana externa está tachonada por ribosomas, es decir el retículo endoplasmático rugoso, tiene un endosoma prominente y una cromatina periférica.

En el citoplasma por debajo de la membrana plasmática se presenta una capa de microtúbulos de 20 nm de diámetro en empalizada, cuya función se presume que es de citoesqueleto.

El flagelo proviene de un cuerpo basal introducido en el paquete flagelar y existe un segundo cuerpo basal aflagelar cerrado y ambos tienen una estructura centriolar, 9 pares de túbulos periféricos y un par central.

El kinetoplasto está situado en la base del flagelo a una considerable

distancia del cuerpo basal de donde sale el flagelo.

El retículo endoplasmático rugoso frecuentemente se encuentra introducido en invaginaciones de la mitocondria (kinetoplasto) en el citoplasma.

Cerca del paquete flagelar se encuentran, sáculos y túbulos de una conformación vesicular que es el aparato de Golgi. También presenta una vacuola pulsátil o contráctil en la región del paquete flagelar. Organelos de una sola membrana han sido designados como lisosomas y peroxisomas (Vickerman 1974).

La estructura mitocondrial del kinetoplasto es un corpúsculo de doble pared donde la parte central esta ocupada por una masa fibrilar de ácido desoxiribonucleico (DNA).

El kinetoplasto tiene continuidad genética, incluso éste se divide antes del núcleo en dos organelos hijos (Vickerman 1974).

## **7. DNA DE KINETOPLASTO (kDNA)**

El DNA del kinetoplasto contiene dos especies moleculares: minicírculos y maxicírculos (doble cadena de DNA) encadenados juntos para formar una gran red de DNA. Según Simpson (1987), aproximadamente son:  $5 \cdot 10^3 - 10^4$  minicírculos y 20 a 50 maxicírculos por red.

El kDNA representa del 10 al 20 % del DNA total (Englund *et al.*, 1995; Simpson y Shaw, 1987) y los minicírculos representan el 95% del kDNA (Ray, 1987).

### **7.1. kDNA DE MINICIRCULOS**

Los minicírculos están organizados de la siguiente manera: tienen una pequeña región conservada y una extensa región variable. Simpson (1987) estudiando a *L.tarentolae* indica que minicírculos de 870 pares de bases contienen una región conservada de 160-270 pares de bases.

Dentro de la región conservada se ha encontrado un dodecamer cuya secuencia es universal en todos los *Tripanosomatidae* examinados hasta ahora. Ntambi y Englund (1985) demostraron que estas secuencias representan un origen de replicación.

Las secuencias de la región conservada muestran una similitud dentro de los minicírculos, lo cual indica evolutivamente que los cambios en la secuencias de la región conservada están limitados, lo cual se esperaba, ya que estas secuencias dan origen a la replicación. En la región variable los cambios son inciertos, podría ser una combinación de sustituciones y rearrreglos, otra posibilidad es que exista recombinación entre minicírculos .

La región variable es muy heterogénea, es decir, que existen múltiples clases de secuencias de minicírculos en una misma célula. También existen altas diferencias de secuencias entre especies y en diferentes cepas de la misma especie. Así estas moléculas pueden ser usadas como marcadores para diferenciar cepas, especies pertenecientes a diferentes complejos de *Leishmania*, (Simpson, 1987).

## **7.2. kDNA DE MAXICIRCULOS**

Todas las especies de *Kinetoplastidae* tienen una misma organización en los maxicírculos, consiste en una región altamente activa que contiene genes que transcriben para RNA ribosomal y genes estructurales, también una región variable que no transcribe y contiene una variedad de secuencias repetitivas cuya función es desconocida.

Las secuencias que transcriben son conocidas en parte. En *L. tarentolae* se ha identificado genes que codifican: citocromo oxidasa subunidad I, II y III; citocromo b y NAD deshidrogenasa (Simpson, 1987).

## **8. CICLO DE VIDA**

### **8.1. EN EL HUESPED INVERTEBRADO**

El mosquito vector al picar a un huésped mamífero infectado ingiere *Leishmanias* en forma amastigotes. Estas formas son destruidas durante la primera hora y los amastigotes que sobreviven se transforman en promastigotes rápidamente.

Los promastigotes permanecen en el tracto digestivo del vector, donde se multiplican. Después de pocos días, un gran número de promastigotes atacan el epitelio del intestino medio insertando sus largos flagelos entre las microvelosidades. Luego migran a la válvula cardíaca, donde se transforman en promastigotes cortos ovals, que no se dividen y que atacan la superficie cuticular de la válvula con un flagelo modificado. Estos flagelos son liberados y penetran a la faringe o probocida como promastigotes metacíclicos llamados también paramastigotes que se caracterizan por un kinetoplasto postnuclear (Janovi *et al.*, 1974).

De la probocida los promastigotes son introducidos en un nuevo huésped mamífero mediante la picadura (Molineux y Killick-Kendrick, 1987).

### **8.2. EN EL HUESPED VERTEBRADO**

El vector infectado en cada picadura puede introducir en la dermis del huésped mamífero de 10-200 promastigotes, los que van a activar al complemento, también a la proteína CR3 que tiene una función opsonizante.

Los promastigotes libres son destruidos por leucocitos, polimorfonucleares y eosinófilos. Sin embargo, algunos atacan los receptores de los macrófagos y son fagocitados.

Dentro del macrófago el promastigote rápidamente se transforma en amastigote que es capaz de resistir el ataque de los fagolisosomas y se multiplican fácilmente. Los macrófagos llenos de amastigotes explotan y los parásitos

reinfectan otras células (Mauel, 1990), entre ellas macrófagos vecinos, células de Langerhans etc. (Blanck *et al.*, 1993). Estas células dendríticas son presentadoras de antígeno de la piel que migran a los ganglios linfáticos donde estimulan a las células T memoria (van Wilsem *et al.*, 1994). Las células dendríticas albergan al parásito por períodos largos contribuyendo así a la inmunidad.

Los macrófagos infectados con amastigotes son ingeridos por el vector del torrente sanguíneo.

## 9. VECTOR

La *Leishmania* es transmitida por insectos del Orden Diptera, Familia Psychodidae, Subfamilia Phlebotominae. (Shaw, 1996). Estos pequeños mosquitos de 1.5 a 4 mm. de longitud tienen el cuerpo y las alas cubiertas de pelos. Existen más de 800 especies en el mundo de las cuales solo 70 son vectores demostrados o sospechosos (Brucker, 1990; OMS, 1990).

Actualmente se acepta que los géneros son seis: *Lutzomyia*, *Brumptomya* y *Warileya* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus*, *Sergentomya* y *Chinius* en el Viejo Mundo. Solo se han demostrado como vectores algunas especies dentro de los *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (OMS, 1990).

Estos insectos normalmente descansan durante el día en los rincones de los muros y troncos, y están activos al atardecer y por la noche, aunque hay especies que pican durante el día cuando el hombre ingresa a su medio ambiente.

Algunas especies como *Lutzomyia nuneztovari* y *Lutzomyia anglesi* en los Yungas entran a las casas después de la diez de la noche y salen antes de la madrugada, siendo desapercibido el contacto del hombre con el vector (Desjeux P.; Le Pont F., 1987).

El flebótomo hembra pone de 40 a 70 huevos en cada ovoposición. Una vez que se abren los huevos hay 4 estadios larvarios antes de que se formen las pupas de donde salen los adultos. La duración del ciclo varía según la especie, la temperatura y otros factores, por lo general es inferior a 45 días (OMS, 1990;

1984).

Sólo las hembras son hematófagas, necesitan una ingestión de sangre para producir huevos, sin embargo, un pequeño número de vectores muestran un comportamiento autógeno que es la capacidad de producir huevos sin la ingestión de sangre.

- Las hembras infectadas tienen dificultad para alimentarse, y esto es un factor de multiplicación de las picaduras y aumento del riesgo de transmisión de la enfermedad (Brucker, 1990).

La preferencia de los vectores en cuanto a huéspedes varía según la especie y disponibilidad de estos.

El insecto durante su alimentación introduce saliva en el huésped. En la saliva de *Lutzomyia longipalpis* se ha encontrado un péptido que se considera uno de los vasodilatadores más potentes que se conocen.

La ingestión de azúcar para los flebótomos es una fuente de energía importante para el desarrollo de los parásitos en el intestino (OMS, 1990).

Es importante estudiar la capacidad vectorial de los flebótomos para identificar a los vectores. Para actuar como vectores deben ser antropófilos y capaces de soportar el desarrollo completo del parásito hasta que este invade la faringe y la boca de la hembra (OMS, 1984).

Según la OMS (1990) los criterios más importantes para la identificación de vectores son:

- 1- El vector tiene que picar al ser humano
- 2- El vector tiene que picar al huésped o huéspedes reservorios.
- 3- El vector debe ser infectado por la misma *Leishmania* que la del hombre.
- 4- El parásito transmitido debe poder desarrollarse en el vector.
- 5- El vector debe poder transmitir el parásito por la picadura.
- 6- La distribución geográfica del parásito en el hombre debe ser compatible con la

del vector.

## 10. RESERVORIO

Existen dos tipos de leishmaniasis: 1- las leishmaniasis zoonóticas que tienen como reservorios mamíferos salvajes o domésticos. 2- las leishmaniasis antroponóticas cuyo reservorio es el ser humano.

- Las leishmaniasis de tipo zoonótico se mantienen en un sistema ecológico compuesto por especies de vectores y reservorios mamíferos. Se considera que en cada foco existe un reservorio principal, sin embargo, pueden también estar infectados otros mamíferos siendo los reservorios secundarios, llamados también accidentales que desarrollan un papel débil en el mantenimiento del sistema.

Los huéspedes reservorios pueden o no mostrar signos de la infección. El perro que es el reservorio de la leishmaniasis visceral muestra varios síntomas clínicos de la infección y al final mueren.

En el caso de la *L. guyanensis* cuyo reservorio es el perezoso, los parásitos son poco encontrados en la piel al contrario de las visceras. En el hombre este parásito causa lesiones cutáneas, de modo que la localización de la *Leishmania* en el reservorio no siempre es la misma en el hombre.

Existen también especies de *Leishmania* específicas de algunos mamíferos (Tatú, cobayo), los cuales nunca infectan al hombre.

Según la OMS, (1990) se debe tomar en cuenta varios aspectos para tener la seguridad de que un determinado mamífero es un reservorio. Tiene que demostrarse que la especie reservorio es indispensable para que el parásito cumpla su ciclo de desarrollo.

Los siguientes criterios son propuestos:

- 1- El reservorio debe ser lo bastante abundante y longevo para constituir una fuente apreciable de alimento para los flebótomos.
- 2- Es necesario un intenso contacto entre el huésped y el flebótomo.

- 3- La proporción de animales que resultan infectados debe superar el 20%.
- 4- El curso de la infección en el reservorio debe ser largo y la infección relativamente no patógena, los parásitos deben estar presentes en la piel o en la sangre en número suficiente para ser ingeridos por el flebótomo.
- 5- Los parásitos que infectan reservorios deben ser indiferenciables de los del hombre, siendo necesaria la identificación formal de los parásitos.

Es indispensable la identificación exacta de los reservorios con el asesoramiento de especialistas zoólogos.

En el Viejo Mundo mediante investigaciones realizadas, han sido encontrados infectados entre animales domésticos principalmente el perro (*Canis familiaris*), con *Leishmania infantum* siendo el reservorio secundario, ya que el zorro es el reservorio principal. Los perros también han sido encontrados con otras especies de *Leishmania*, pero se considera que en estos casos juega un papel secundario.

Entre los reservorios salvajes se encuentran (roedores, meriones, hyráceos etc.

En el Nuevo Mundo se desarrollaron investigaciones, sobre el reservorio mamífero principalmente en Brasil. Entre animales domésticos se encontraron infectados perros, caballos mulas y asnos por *Leishmania brasiliensis* (Hooman *et al.*, 1987; Tasso Aires de Alencar, 1986). Rossane y Macau *et al.*, (1987) reportan infectado a un puerco (*Sus icrofa*) cuya cepa no se identificó. El perro se considera el reservorio de la *Leishmania chagasi* agente causal de la leishmaniasis visceral (Garnham, 1965). Lainson y Shaw en 1982 encontraron *Leishmania chagasi* en un (*Cerdocon thous*) en el estado de Pará Brasil. Ellos indican que la infección no aparente en este animal sugiere que este podría ser el reservorio natural primario de *L. chagasi*.

Entre los reservorios salvajes se mencionan para *L. amazonensis* un roedor (*Proechimys iheringi denugratus*), que fue encontrado cerca a Tres Bracos en la región de Bahía Brasil (Barreto *et al.*, 1985). También se mencionan (*Didelphis Marsupialis philanderopossum*) (Dedet *et al.*, 1989) como reservorio de *Leishmania*

*guyanensis* agente causal del Pian Bosque (Miles y Souza, 1981; Lainson y Shaw 1981, Dedet *et al.*, 1985).

Para algunas *Leishmania* no se ha precisado aún al reservorio (Dedet, 1986).

## **11. FORMAS CLINICAS**

### **11.1. LEISHMANIASIS VISCERAL.**

En el Viejo Mundo la leishmaniasis visceral o Kala-azar (enfermedad negra) es causada por parásitos pertenecientes al complejo *donovani*. Afecta con mas frecuencia a niños de 1 a 4 años, aunque en zonas endémica puede afectar a personas de toda edad. Se observa también que los varones son mas afectados que las mujeres con una proporción de 3:4. El período de incubación oscila entre 10 días y más de 1 año.

Los síntomas habituales son: fiebre, malestar, escalofríos, pérdida de peso, anorexia, molestia en el hipocondrio izquierdo, algunas veces tos y diarrea.

Los signos clínicos son esplenomegalia indolora a la presión con o sin hepatomegalia, palidez de la mucosas, linfadenopatía, hiperpigmentación cutánea, puede haber con frecuencia en Sudán y rara vez en Africa Oriental una úlcera o nódulo cutáneo.

*L. donovani* en la India puede causar una leishmaniasis dérmica post kala-azar. Puede presentarse junto con el Kala-azar, o después de 6 meses siguiendo la cura aparente del Kala-azar. Primero se presentan unas máculas hipopigmentadas, que más adelante se hacen nodulares o papulares especialmente en la cara, también puede afectar a la lengua y a los labios causando úlceras.

En el Nuevo Mundo la Leishmaniasis visceral es endémica o esporádica y es causada por *L. chagasi*. Sintomatologicamente y clínicamente es semejante a la leishmaniasis visceral del Viejo Mundo, la leishmaniasis dérmica postkala-azar es extremadamente rara.

Otra característica de la leishmaniasis visceral es que son frecuentes las infecciones asintomáticas y formas subclínicas, uno de los factores de riesgo más importantes es la mala nutrición (OMS, 1990).

### **11.2. - LEISHMANIASIS CUTANEA**

· En el Viejo Mundo la leishmaniasis cutánea es causada por tres especies de *Leishmania*: *L. trópica*, *L. major* y *L. aethiopica*.

Sus manifestaciones clínicas difieren según las regiones dependiendo del parásito, del ciclo zoonótico y de la respuesta del paciente determinada por factores genéticos.

La leishmaniasis cutánea presenta en general una lesión inicial en forma de nódulo, en el lugar de la inoculación, con una costra en el centro que al desprenderse expone una úlcera que deja espontáneamente una cicatriz ligeramente hundida. Presenta también corrientemente nódulos secundarios al borde de la lesión.

*L. trópica* es el agente causal de la leishmaniasis cutánea antroponótica o urbana, que produce una ulceración indolora en la piel dejando cicatrices desfigurantes.

La leishmaniasis recidivante responde poco al tratamiento y puede durar años. Generalmente la lesión se produce en la cara, es de progresión lenta y cicatriza con actividad periférica, si no se trata es destructiva y desfigurante.

*L. major* causa la leishmaniasis cutánea zoonótica, cuyas lesiones se inflaman intensamente, acaban confluyendo y con infecciones secundarias.

*L. aethiopica* produce lesiones cutáneas simples de evolución lenta, la ulceración es tardía o inexistente. Rara vez puede causar leishmaniasis oronasal y leishmaniasis cutánea difusa, que se caracteriza por un engrosamiento diseminado de la piel en placas, pápulas o nódulos múltiples, no hay ulceración ni son

afectadas las mucosas.

En el Nuevo Mundo la leishmaniasis cutánea tiene una gran diversidad de manifestaciones clínicas que han sido llamadas de diferentes formas por los residentes de las zonas endémicas (OMS, 1990).

La úlcera de los chicleros implica el cartílago de la oreja y es causada por la *L. mexicana* y su nombre se debe a que se la consideraba una enfermedad profesional de los recolectores de caucho. Sin embargo, no se tiene una evidencia del tropismo real del parásito. Se atribuye al hábito que tiene el vector de picar en el lóbulo de la oreja. Habitualmente se manifiesta como un solo nódulo, pápula o úlcera benigna que remite espontáneamente (OMS, 1990).

La uta es causada por *L. peruviana* cuyo nombre fue propuesto por Velez en 1913. *L. peruviana* tiene características particulares que no se asocia con la foresta, esta restringida a los valles altos y áridos del oeste de los Andes, altitud entre 900 y 3000 metros (Bryce y Walton, 1987). Los perros y el hombre son infectados y diversos marsupiales y roedores serían reservorios. Clínicamente se caracteriza por lesiones cutáneas típicas que afectan preferentemente a niños en edad preescolar. La lesión se presenta principalmente en la cara y en miembros inferiores, se extiende también al sistema linfático. La lesión tiene una evolución espontánea y es relativamente corta entre 4 y 10 meses.

*L. guyanensis* produce el "pian bosque" que presenta lesiones únicas o múltiples con metástasis al sistema linfático en un 30% de los casos. La lesión desaparece con terapéutica específica, sin embargo, tiende a producirse recaídas.

La leishmaniasis cutánea difusa diseminada es una forma clínica rara. La lesión inicial es un nódulo, suave, firme y azulado no ulcerado rico en parásitos. Después las lesiones son escamosas y ásperas. Las infiltraciones en las cejas, la nariz y las orejas produce una facies leonina que clínicamente no se distingue de la lepra lepromatosa, no se produce lesiones mucosas y no se cura espontáneamente, es muy resistente a todas las formas de tratamiento (OMS 1990). Es el resultado del parasitismo de individuos inmunodeprimidos y se debe a *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. garnhami* y *L. venezuelensis* (Dedet, 1986, Bryce,

1987).

*L. brasiliensis* es el agente etiológico de leishmaniasis cutánea que presenta lesiones únicas o múltiples que se difunden a lo largo del sistema linfático y afecta a los ganglios linfáticos. La curación espontánea es rara (OMS, 1990).

### **11.3. LEISHMANIASIS MUCO-CUTANEA**

• La leishmaniasis muco-cutánea o espundia es causada también por *L. brasiliensis* y *L. panamensis*.

La lesión cutánea primaria no difiere de las lesiones cutáneas debido a otras especies de *Leishmania* dermatrópicas. La aparición de la lesión mucosa es extremadamente variable. De acuerdo a estudios varía entre 3,8 años en provincias del Cuzco Madre de Dios en el Perú (Arias *et al.*, 1985), 4,9 años en el Estado de Bahía en Brasil (Llanos-Cuentas, 1984), 5,7 años en el Oriente boliviano (Arias *et al.*, 1987; De Mynck, *et al.*, 1978), 10,6 años en los Yungas (Arias *et al.*, 1985; Desjeux, 1974), e incluso se reportan intervalos de tiempo extremadamente largos, 24 años en Bolivia (Arias, 1981), y entre 30 y 50 años también en Bolivia (Arias, 1981; Dedet, 1985).

Los primeros signos de la espundia usualmente ocurre en la nasofaringe, se presenta congestión nasal, dificultad para dormir, epistaxis. La lesión nasal se produce como un granuloma inflamatorio pequeño en el tabique cartilaginoso nasal, luego se obstruyen las ventanas nasales y la nariz se perfora con hundimiento y ensanchamiento. El estado de destrucción de la nariz produce la clásica nariz de tapir.

La mucosa bucal es afectada por contigüidad a partir de las lesiones nasales, también la faringe, el paladar y la laringe. A nivel del paladar las lesiones son granulomatosas y extensivas produciendo destrucción tisular, comunicándose así las fosas nasales y la cavidad bucal.

La extensión a la laringe es consecuencia de la localización rino-buco-faringe del parásito, se traduce en un estado de disfonía y de tono metálico, pudiendo el

granuloma producir una obstrucción fatal de las vías respiratorias (Dedet, 1986).

Las mutilaciones y destrucción del tejido en presencia de muy pocos parásitos se debe también a una exagerada respuesta inmune (Bryce, 1987).

Debido a las lesiones desfigurantes los pacientes sufren afección socio-psicológica severa (Dedet, 1986).

La leishmaniasis muco-cutánea nunca cura espontáneamente y son frecuentes las infecciones bacterianas secundarias, de manera que la muerte se produce por infecciones del tracto-respiratorio debido al paso de secreciones infectadas (OMS, 1990).

## 12. DIAGNOSTICO

El diagnóstico biológico de estas parasitosis se realiza hallando al parásito e identificándolo, teniendo así un criterio de certeza. Con este objetivo la toma de muestra debe ser de acuerdo al tipo de leishmaniasis. Para la leishmaniasis visceral los parásitos se buscan en aspirado de médula ósea. En leishmaniasis cutánea o muco-cutánea se buscan en la periferie de la lesión realizando un aspirado.

Cuando las lesiones son múltiples la muestra se toma de las lesiones más nuevas, aún en estado de pápula. Se realiza un frotis tiñendolo con Giemsa al 10% y con ayuda de un microscopio se busca al parásito (Brucker, 1990). Los parásitos aparecen en forma de amastigotes dentro de los monocitos. Con el aspirado también se hace cultivo generalmente en medio NNN (Novi, Mac Neal, Nicolle), y de acuerdo al tipo de especie de que se trate desarrolla entre 3 o 4 días los pertenecientes al complejo *mexicana* y de 8 a 15 días para los de los complejos *donovani* y *brasiliensis*. Una vez que se positiviza el cultivo el parásito se ve en forma de promastigotes, flagelados y móviles (OMS, 1990).

Este tipo de diagnóstico se dificulta cuando se trata del complejo *brasiliensis*, ya que presenta escasez de parásitos en sus lesiones ( de Bruijn and Barker, 1992; 1993).

Otra técnica muy usada es la inoculación en Hamster del aspirado de la lesión.

Estos métodos de diagnóstico son simples y baratos, sin embargo, no son lo suficientemente sensibles y el cultivo de parásitos requiere mucho tiempo.

La leishmaniasis visceral se acompaña de una respuesta humoral elevada con anticuerpos específicos y el diagnóstico inmunológico es el más usado. Las reacciones que se utilizan son: fijación de complemento, aglutinación directa, aglutinación pasiva, hemaglutinación, electrosinéresis, inmunofluorescencia y prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA).

Las reacciones inmunológicas son test que no distinguen entre reacciones presentes y pasadas, igualmente pueden dar un falso positivo produciéndose reacciones cruzadas con anticuerpos de otros patógenos (de Bruijn and Barker, 1993).

En la leishmaniasis cutánea, no hay una respuesta humoral, mas bien la respuesta es de tipo celular, de manera que la técnica adecuada es la prueba de la leishmanina puesta a punto por Montenegro en Brasil (Montenegro,1926) o test de hipersensibilidad retardada. Es una suspensión de  $10^6$  promastigotes lavados de *Leishmania* con fenol y solución salina. Se inyecta 0,1 ml en la superficie flexora del antebrazo y pasado 48 o 72 horas se mide la induración. Cuando ésta es mayor a 5 mm se considera el test positivo (OMS, 1984).

Las isoenzimas son usadas con el propósito de identificar las cepas aisladas en cultivo. La técnica es relativamente simple y no necesita mas que el manejo de electrofóresis (Brucker, 1990). Este método actualmente se considera el mas fiable para caracterizar cepas, sin embargo, es necesario aislar las cepas y cultivarlas lo cual no es siempre posible.

En recientes años se han creado métodos moleculares basados en sondas de DNA. La reacción en cadena de la polimerasa fue aplicada por de Bruijn (1992). Fue comparada con métodos clásicos de diagnóstico demostrando elevada sensibilidad 84,6% y una especificidad del 60%. Debido al costo este método es

usado mas en investigación que en diagnóstico. Es un método potencial para estudios de epidemiología de la leishmaniasis.

### **13. TRATAMIENTO**

Desde 1913 el tratamiento de las leishmaniasis se hizo con sales minerales de antimonio, pero fueron rápidamente abandonadas debido a su toxicidad y reemplazadas por sales orgánicas mas tolerables. Sin embargo, la cardiotoxicidad que produce es conocida, los cambios eléctricos debido a antimoniales son variables y dependen de la dosis y del tiempo del tratamiento (Dedet, 1992).

Actualmente 3 tipos de medicamentos pueden ser usados en el tratamiento: los derivados del antimonio, las diamidinas y la anfotericina B.

Dos derivados del antimonio pentavalente son usados principalmente: el antimonio de meglumina (Glucantime) y el stibogluconato de sodio (Pentostan) conteniendo 100 mg de Sb/ml.

La ventaja de este medicamento es que su excreción renal es rápida, cerca del 60% al 80% de la dosis inyectada es excretada en 6 horas, esto evita una toxicidad aguda, pero produce una toxicidad acumulativa por la producción de un metabolito trivalente excretado muy lentamente. Comúnmente estos efectos no son serios, pero pueden causar la suspensión del tratamiento.

Normalmente el tratamiento se realiza a una dosis de 20 mg Sb/kg/ día (MKD), por 20-28 días. El 83% de los pacientes sufren mialgia o artralgia y un 30% sufren anorexia. También puede producir disturbios a nivel de enzimas en el hígado. Cerca del 40% de los pacientes desarrollan cambios electrocardiográficos, pero estos no se consideran serios. En dosis altas puede causar una arritmia fatal.

Datos experimentales sugieren que la resistencia a los antimoniales que presenta el parásito se produce como resultado de droga discontinuada o tratamiento con dosis inadecuada. Ante la resistencia, se usa combinación de antimonio pentavalente con allopurinol o aminosidine, y a sido útil.

Las diamidinas son sales de pentamidinas, pueden usarse el mesilato de pentamidina (Iomidine) o el isotianato de pentamidina.

La pentamidina es excretada lentamente por el hígado y el riñón, cerca del 50% de la dosis se excreta en 5 días, por lo tanto su uso está limitado por las reacciones adversas que produce, tempranamente hipotensión y más tarde hipoglycemia, diabetes, nefrotoxicidad, formación de absceso y muerte. Está restringido solo a pacientes con enfermedad severa que no responde al antimonio. Esta aprobada como una droga de segunda línea en India y Kenia.

La anfotericina B (Fungizone) es un antibiótico polyeno. Es muy activa mata formas parasitarias intra y extracelulares de *Leishmania in vitro* a una concentración de 1mg/ml de medio. Su utilidad es limitada por las reacciones adversas que produce: anafilaxis, trombocitopenia, convulsiones, fiebre, flebitis, anemia, anorexia, daño renal tubular y glomerular, hipokalemia, en uno de cada tres pacientes tratados, así no puede ser considerada droga de primera línea. Sin embargo, en la India se ha usado ante el problema de resistencia a los antimoniales, se administró a bajas dosis 0,5 mg/kg en días alternos por 14 dosis y fueron curados el 100% de los pacientes con un efecto tóxico muy leve (Mishra *et al.*,1992). El modo de acción de la Anfotericina B es considerado interesante, ya que une los esteroides de la membrana plasmática formando poros por donde salen iones y causan la muerte del agente. Preferentemente actúa sobre el ergosterol que es uno de los mayores componentes de la membrana leishmanial y fúngica, pero no de la membrana de células de mamíferos. Sin embargo puede actuar sobre el colesterol de las células de los mamíferos, produciendo una acción tóxica sobre el huésped. Para evitarla los investigadores unieron la Anfotericina B con lípidos como: liposomas de fosfatidil colina, colesterol y diesteroil fosfatidilglicerol. El propósito de realizar esta asociación es lograr que los lípidos encuentren receptores solo a nivel de determinadas células, especialmente macrófagos y la droga sea secuestrada al interior del macrófago, dejando más droga que interactúe con el ergosterol del parásito y no con el colesterol del huésped. La relativa eficacia y toxicidad de esta droga no ha sido aún determinada (Bryceson, 1993).

El Allopurinol es un análogo de la hypoxantina y es hidrolizado a allopurinol riboside, un análogo de la inosina. Este nucleósido aberrante es incorporado en vez

de ATP en los ácidos ribonucleicos donde interfiere en la síntesis de proteínas y mata al parásito. Los resultados de las pruebas de esta droga son controversiales y se necesita más estudios.

Durante los últimos años la búsqueda de nuevas drogas antileishmaniales más efectivas y menos tóxicas a sido preocupación permanente de los investigadores.

• Un mejor entendimiento de la bioquímica del parásito es necesario para investigar productos naturales con actividad en contra de protozoarios. Proponen encontrar un sistema de enzimas que este presente en el parásito, pero que este ausente o sea significativamente diferente en el huésped. Así una droga puede actuar sobre un lugar específico en el parásito.

El otro camino es dilucidar el modo de acción de la droga sobre el parásito y comparar con los efectos bioquímicos en el huésped lo cual demostraría que si el modo de acción en el parásito no es el mismo mecanismo de toxicidad en el huésped se podría separar la actividad antiparasitaria y los efectos tóxicos mediante modificaciones semisintéticas (Wright y Phillipson, 1996).

Recientemente Vicendeau *et al.*, (1997), realizaron un estudio sobre la inhibición que produce el óxido nítrico (NO) sobre el crecimiento de formas amastigotes extracelulares en un medio de cultivo establecido por ellos y formas promastigotes, sobre tres especies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*).

Esta droga no produce efectos líticos sobre ambos estadio (promastigotes y amastigotes) pero inhibe la conversión de amastigote en promastigote, diferenciación que es esencial para la sobrevivencia del parásito.

Fournet *et al.*,(1988) demostró que el bisbesylisoquinolines gynocarpine daphnandrine yobaberini tienen alta actividad en contra de promastigotes de *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani*.

En 1995 Fournet *et al.*(1995) publicaron un trabajo realizado en Beni Bolivia

donde aislaron dos moléculas eficaces *in vitro* y en el modelo animal, de un arbusto selvático del bosque Chimán (Beni, Bolivia). Estas moléculas son quinoleínas, nombradas chimaninas. Posteriores estudios indicaron la efectividad de estas nuevas drogas aún en estudio.

#### **14- VACUNA**

La leishmaniasis cutánea es la única que ha respondido con éxito a la inmunización, debido a que una exposición primaria al agente causal provoca un alto nivel de inmunidad adquirida.

Los investigadores probaron diferentes tipos de vacunas, como organismos vivos virulentos, promastigotes muertos y moléculas. Antiguamente se usaba en el Viejo Mundo principalmente en Medio Oriente y la Antigua Unión Soviética, la leishmanización, contra brotes epidémicos explosivos de leishmaniasis cutánea. Se basa en la inmunidad que se adquiere después de la inducción de una lesión en un sitio específico, mediante la administración de una pequeña dosis de una cepa cutánea. En años recientes (1982), la leishmanización fue usada en Irán y se demostró que puede proteger en un 90% o más de la población expuesta. Sin embargo, presenta una serie de problemas que incluye el desarrollo de lesiones grandes que curan lentamente y se sobre infectan con bacterias. En consecuencia se restringe esta práctica.

Se usó también cepas atenuadas de promastigotes cuya protección alcanzó al 58%. Cuando usaron *L. donovani*, agente causal de leishmaniasis visceral, vieron que no había diferencia en la incidencia natural de la enfermedad.

Se hizo también una vacuna con un glicoconjugado llamado glicofosfoglican y se ha demostrado que es capaz de proteger en pruebas con ratones BALB/c, experimentalmente infectados, este glicoconjugado se encuentra en la membrana del promastigote.

Se ha probado también vacunas con proteínas constitutivas de *L. major* y son buenos agentes inmunogénicos en ratones C57BL/10.

La metaloproteasa una proteína de 63.000 de PM, presente en la superficie de la *Leishmania* es capaz de proteger a ratones contra parásitos virulentos pertenecientes al complejo mexicana. Se usó GP63 incorporado en lisosomas sin éxito.

Finalmente se demostró que la vacuna realizada con una proteína de superficie de *L. donovani*, la GP72, protege a ratones contra amastigotes virulentos de *L. donovani* (Sacks, 1990).

En el Brasil Mayrink y col. (1979) realizaron estudios sobre una vacuna a partir de promastigotes muertos de 5 diferentes cepas de *Leishmania*, con objetivo de que sirva para inmunizar en diferentes áreas endémicas del Brasil. Para el primer ensayo utilizaron ratones C57BL/10, evidenciando una protección del 50 % de los animales vacunados. Luego realizaron estudios en humanos y los promastigotes muertos fueron capaces de positivizar en las personas vacunadas el test de hipersensibilidad, lo que muestra que es capaz de producir respuesta inmune celular en un 78,2 %, después de un año en un 73,2% y a los dos años en un 54,1%. Realizaron 3 estudios más demostrando una protección hasta del 80%, sin embargo en virtud de la ausencia de nuevos casos de leishmaniasis cutánea no se pudo evidenciar la eficacia de esta vacuna. Actualmente se están llevando a cabo otros estudios (Mayrink, 1995).

## **15. TECNICAS UTILIZADAS**

### **15.1. EXTRACCION DE DNA**

La extracción del DNA consiste en remover contaminantes proteicos, purificar y concentrarlo.

Para remover contaminantes se puede usar la proteinasa K que tiene actividad proteolítica, sodio dodecyl sulfato(SDS) que es un detergente ionico que denatura proteínas y el tampón TE que incluye EDTA para inhibir las DNAsas.

La purificación del DNA se puede realizar por extracciones consecutivas con fenol, cloroformo e isoamilalcohol.

El fenol es un agente que denatura eficientemente proteínas. El fenol/cloroformo mezclados reducen la fase acuosa retenida en la fase orgánica y el isoamilalcohol ayuda en la separación de ambas fases.

La precipitación del DNA se realiza con acetato de sodio y etanol puro frío.

El etanol en presencia de concentraciones relativamente altas de cationes monovalentes induce a una transición estructural en los ácidos nucleicos causando que se agreguen y precipiten en la solución.

### **15.2. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en sintetizar hasta miles de veces *in vitro* un fragmento de DNA que se quiere estudiar. Esto es posible por la acción de la Taq polimerasa capaz de polimerizar a 72 °C y resistir hasta 96 °C. Se usa como molde una cadena de DNA y se forman nuevas hebras de nucleótidos complementarios. Después de la desnaturalización de la doble cadena de DNA, los cebadores escogidos, se alinean a los extremos de cada cadena de DNA blanco, que permiten el inicio de la síntesis de las cadenas complementarias.

La PCR tiene 3 etapas:

- Denaturación del DNA a una temperatura que va de 90-96° C.
- Alineamiento de los cebadores a temperatura de 50-58° C.
- Elongación de la cadena complementaria a 72 °C temperatura óptima de acción de la Taq. polimerasa (Dossier, 1990; Serrano y García, 1990).

La técnica de PCR es muy sensible, se deben tomar muchas precauciones para evitar falsos positivos.

### **15.3. ELECTROFORESIS**

La electrofóresis es la migración de moléculas en un campo eléctrico.

La dirección del movimiento depende del signo de la carga, pero la velocidad del desplazamiento depende de la magnitud de la carga. (Serrano y García, 1990).

#### - GEL DE AGAROSA

La agarosa es un polisacárido natural purificado de agar-agar obtenido de algas marinas, consiste en D-galactosa y 3,6-anhidro galactosa, que forman mallas de agregados de agarosa y canales (Karcher S.J.,1995).

La agarosa forma geles con rigidez suficiente para ser manipulados desde una concentración de 0.2% por lo que es la mas utilizada en técnicas de biología molecular para visualizar fragmentos de DNA teñidos con bromuro de etidio. Además, jugando sobre la concentración del gel la resolución en la separación de las bandas puede ser mejorada. Para formar los geles la agarosa sólida es disuelta por calentamiento en un tampón, generalmente (tris-borato). El punto de fusión de la agarosa es cerca a los 80 °C, pero no gelifica hasta por debajo de los 45 °C. La movilidad de las moléculas de DNA depende de la carga global de la molécula y del efecto tamiz de las fibras del gel. El tamaño de la malla depende de la concentración de agarosa (Maniatis, 1989; Serrano y García, 1990).

#### - GEL DE ACRILAMIDA

La acrilamida es un monómero capaz de formar largas cadenas en presencia de radicales libres, como el persulfato de amonio (APS) y para estabilizar TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylene diamino). Este agente bifuncional produce la polimerización entre las cadenas por entrecruzamiento. La porosidad del gel está determinada por la concentración de acrilamida (Maniatis, 1989).

#### - TINCIÓN DEL GEL

Los geles de agarosa y poliacrilamida pueden ser teñidos con bromuro de etidio para visualizar las bandas electroforéticas.

En geles de agarosa el bromuro de etidio se puede añadir directamente al

gel en el momento de su preparación a una concentración del 10% del volumen del gel. Sin embargo, cuando hay bromuro de etidio presente durante la electrofóresis, el rango de migración de los fragmentos de DNA se reduce en un 10 a 15 %.

Alternativamente el gel se puede teñir después de la corrida electroforética con la misma concentración de bromuro de etidio disuelto en tampón TAE por 15 a 20 minutos.

Las moléculas de bromuro de etidio se intercalan entre las bases de la doble cadena de DNA y emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta.

La sensibilidad reportada es de 2 ng de DNA detectado por fotografía en un gel teñido con bromuro de etidio (Karcher JS, 1995).

El gel de acrilamida puede ser teñido con bromuro de etidio disuelto en tampón TBE 1x. Además la tinción con nitrato de plata es muy efectiva, ya que puede detectar hasta 1 picogramo de DNA (Karcher, 1995).

#### **15.4. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS**

Las isoenzimas son proteínas que tienen la misma actividad catalítica, pero presentan cargas eléctricas diferentes. Son usadas en el campo de la genética de poblaciones para caracterizar y establecer filogenia entre cepas (Murray, 1994).

Cuando estas moléculas son sometidas a un campo eléctrico su migración depende de su carga eléctrica global, lo cual está determinado por las cargas eléctricas de cada uno de los aminoácidos que las constituyen. Por consecuencia, dos proteínas que no migran de la misma manera presenta por lo menos una diferencia en la secuencia de sus aminoácidos.

Esta técnica permitió a los genetistas resolver por primera vez ciertas discrepancias acerca de la amplitud de la variación genética, medida como la proporción de locus heterocigotas (locus donde surgió por lo menos una mutación puntual). Su éxito radica en su alto rendimiento en relación costo-efectividad. Su

relación con el genoma radica en la co-linearidad entre las secuencias de aminoácidos de una proteína y la secuencia de codones del gen responsable de esta proteína. Las diferencias de migración sobre un gel informan sobre las diferencias genéticas entre los individuos.

La visualización de los enzimas sobre el gel, después de la electrofóresis, se efectúa por procesos fisicoquímico permitiendo obtener un precipitado coloreado, utilizando las propiedades catalíticas específicas de cada enzima.

#### - LECTURA DE LAS BANDAS.

En una migración electroforética se visualizan bandas nítidas color azul violeta que son productos de la actividad enzimática y tienen que ser reproducibles. También se observa bandas difusas del mismo color llamadas artefactos, que no se toman en cuenta en la lectura de bandas. Para descartar estas bandas se realiza una migración electroforética con las mismas muestras revelando la placa con un gel de revelado, sin sustrato específico del enzima.

El revelado sin sustrato para cada sistema enzimático se realiza una sola vez al principio del estudio.

Las bandas se interpretan de acuerdo a la velocidad de migración, asignándole el valor de 1 a la más rápida, 2 a la siguiente y así sucesivamente en orden descendente.

Las bandas se enumeran para cada muestra y cada sistema enzimático, definiendo así el fenotipo y el conjunto de fenotipos establece el zimodema de la cepa.

Para algunos sistemas enzimáticos se observa dos series de bandas bien separadas y se considera que corresponden a la actividad de dos loci para la misma enzima.

La interpretación alélica se realiza para un estudio genético y está basado en el conocimiento de la estructura de las proteínas, además del conocimiento del

grado de la ploidia del organismo.

En una interpretación alélica los perfiles establecen el genotipo de cada muestra para cada locus y el conjunto define el zimodema para cada cepa.

### 15.5. DISTANCIAS FENÉTICAS DE JACCARD

La distancia de Jaccard cuantifica las diferencias fenéticas entre dos perfiles por la proporción de bandas comunes sobre el total de bandas entre dos cepas. No necesita el conocimiento de la ploidia ni la lectura alélica de los perfiles.

$$D_j = 1 - C/(2N - C)$$

C = Número de bandas en común entre dos cepas.

N = Número de banda total en ambas cepas.

### 15.6. DISTANCIAS GENÉTICAS DE NEI

Las distancias genéticas de Nei son una estimación del número medio de codones diferentes por gen entre dos taxones.

Las distancias de Nei necesita conocimiento de la ploidia del organismo, considerandose a la *Leishmania* un organismo diploide.

$$D_{Nei} = -\log I$$

I = Identidad genética

D = Distancia genética

$$I = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$

$X_i$  y  $Y_i$  = frecuencias del alelo  $i$  entre las poblaciones  $X$  y  $Y$

### 15.7. DENDROGRAMA

El dendrograma es una de las representaciones posibles de la matriz de las

distancias, ayudando a explicar las relaciones taxonómicas entre las cepas (Tibayrenc, 1992).

### **15.8 HIBRIDACION**

La hibridación es el proceso por el cual, dos cadenas de DNA o RNA sencillas se unen mediante formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, la doble cadena se denomina híbrido.

Para que se realice la hibridación es necesario que entre las cadenas simples exista complementariedad de bases. El híbrido es más estable cuando hay mayor proporción de bases complementarias.

Uno de los métodos de hibridación se realiza fijando el DNA estudiado en membrana de nitrocelulosa o nylon, e hibridándolo con la sonda marcada por ejemplo con isótopos radiactivos. El revelado se realiza mediante autoradiografía (Serrano y García, 1990). Otra forma de revelado es usando el método de quimioluminiscencia: la peroxidasa cataliza la oxidación del luminol. El luminol oxidado se encuentra en estado excitado que puede emitir luz a 428 nm, cerca de 1 pg de DNA puede ser detectado en menos de 1 hora (Karcher S. 1995).

## JUSTIFICACION

El estudio de la leishmaniasis en Bolivia es prioritario, ya que representa un problema importante de salud pública.

Bolivia es un País que presenta endemidad para la leishmaniasis en cinco de sus nueve Departamentos, mostrando actualmente un comportamiento ascendente.

En el Nuevo Mundo aún no se ha identificado reservorios de algunas especies de *Leishmania*, en nuestro País no hay muchos trabajos orientados a su búsqueda.

Una de las formas posibles de establecer medidas apropiadas para el control de la enfermedad es identificando los reservorios tanto salvajes como domésticos, muchos de los cuales no presentan lesiones que indiquen que están infectados.

La identificación de las cepas de *Leishmania* y la discriminación no solamente a nivel de complejo, es muy importante cuando se quiere confirmar la presencia de un mismo agente patógeno en reservorios, vectores y pacientes.

Con el avance de técnicas moleculares y desde la amplificación in vitro del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en 1988, se tiene una herramienta potencialmente capaz de detectar parásitos directamente en muestras biológicas y solucionar muchos problemas en el diagnóstico de la leishmaniasis. Enfermedad cuyo tratamiento y pronóstico parece depender del tipo de parásito que esta infectando (Marsden, 1985).

Las implicaciones socioeconómicas de la leishmaniasis, radica principalmente en el hecho de que se han creado nuevas áreas de colonización, donde fueron migrando poblaciones altiplánicas, generalmente ex-mineros en busca de nuevas zonas de explotación agrícola, apertura de vías de comunicación etc. quienes tienen un alto riesgo de contraer la enfermedad (Dejeux et al., 1992).

## OBJETIVOS

### - OBJETIVO GENERAL

Determinar el polimorfismo genético de cepas de *Leishmania* mediante nuevos métodos moleculares, basado en el análisis de partes variables del minicírculo del DNA del kinetoplasto.

### - OBJETIVOS ESPECIFICOS

Definir la relación del polimorfismo de las partes variables de los minicírculos en la caracterización de cepas de *Leishmania*.

Definir la discriminación taxonómica del marcador genético kDNA-PCR.

Identificar los reservorios mas probables de cepas de *Leishmania* en dos zonas de alta endemicidad en Bolivia, Cajuata zona de los Yungas del departamento de La Paz y Yucumo departamento de Beni

Caracterizar cepas autóctonas provenientes de las zonas de estudio.

# CAPITULO II

## MATERIAL Y METODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en este estudio consiste en cepas de referencia, muestras de animales (sangre, tejido), sangre de paciente y cepas autóctonas aisladas en dos zonas de Bolivia.

#### 1.1. CEPAS DE REFERENCIA.

El análisis del polimorfismo de las partes variables de los minicírculos del kDNA, esta basado en el estudio de cepas de referencia previamente analizadas por electrofóresis de enzimas para varios loci ("Multilocus enzyme electrophoresis" MLEE) y técnicas de hibridación con sondas específicas de complejo de *Leishmania*.

Las cepas de referencia disponibles para el presente trabajo son las siguientes:

TABLA No 1

CEPA	ESPECIE	ABREVIACION	Z*
MHOM/IN/61/L13	<i>L. donovani</i>	L13	Z01
MHOM/BR/79/L101	<i>L. chagasi</i>	L101	Z04
MHOM/BR/74/PP 75	<i>L. chagasi</i>	PP75	Z07
MHOM/VE/76/JAP78	<i>L. garnhami</i>	JAP78	Z11
IFLA/BR/67/PH 8	<i>L. amazonensis</i>	PH8	Z12
MHOM/BR/76/LTB 012	<i>L. amazonensis</i>	LTB012	Z15
MNYC/BZ/62/M 379	<i>L. mexicana</i>	M 379	Z20
MHOM/VE/57/LV 135	<i>L. pifanoi</i>	LV135	Z21
MORY/PA/68/GML 3	<i>L. aristidesi</i>	GML 3	Z23
RTAR/SN/67/G 10	<i>L. tarentolae</i>	G 10	Z27
MHOM/SU/73/5 Askh	<i>L. major</i>	5Askh	Z29
MHOM/CO/83/REST 417	<i>L. panamensis</i>	REST 417	Z43
MHOM/GF/85/Lem 668	<i>L. guyanensis</i>	Lem 669	Z50
MHOM/BR/78/M 5378	<i>L. guyanensis</i>	M 5378	Z51
MHOM/BR/84/LTB300	<i>L. brasiliensis</i>	LTB 300	Z56
MHOM/BO/90/CG(Sus6)	<i>L. brasiliensis</i>	CG	Z60
MHOM/BO/90/JP(Sus4)	<i>L. brasiliensis</i>	JP	Z60
MHOM/BO/90/JM(Sus12)	<i>L. brasiliensis</i>	JM	Z60
MHOM/BO/90/AM(Sus5)	<i>L. brasiliensis</i>	AM	Z60
MHOM/BO/90/EL(Sus9)	<i>L. brasiliensis</i>	EL	Z60
MHOM/BO/90/CS(Sus14)	<i>L. brasiliensis</i>	CS	Z60
MHOM/BR/75/M 2904	<i>L. brasiliensis</i>	M 2904	Z62
MHOM/PE/90/LH 1016	<i>L. brasiliensis</i>	LH 1016	Z64
MHOM/BO/84/LPZ 595	<i>L. brasiliensis</i>	LPZ 595	Z66
MHOM/PE/90/HB 44	<i>L. peruviana</i>	HB 44	Z78
MHOM/BR/81/M 6426	<i>L. lansoni</i>	M 6426	Z81
MHOM/SU/74/K 27	<i>L. trópica</i>	K 27	NH

\* Numeración de zimodemas según Guerrini (1993)

NH= no hecho

Las 27 cepas seleccionadas se reparten en los siguientes complejos y especies:

Complejo donovani

<i>L. donovani</i>	1 cepa
<i>L. chagasi</i>	2 cepas

Complejo mexicana

<i>L. mexicana</i>	1 cepa
<i>L. amazonensis</i>	2 cepas
<i>L. garnhami</i>	1 cepa
<i>L. pifanoi</i>	1 cepa
<i>L. aristidesi</i>	1 cepa

Complejo trópica

<i>L. major</i>	1 cepa
<i>L. trópica</i>	1 cepa

Complejo brasiliensis

<i>L. brasiliensis</i>	10 cepas
<i>L. guyanensis</i>	2 cepas
<i>L. panamensis</i>	1 cepa
<i>L. peruviana</i>	1 cepa
<i>L. Lansonii</i>	1 cepa

*L. tarentolae*

## 1.2 ELECCION DE LA ZONA.

Dos zonas de alta endemicidad en Bolivia fueron escogidas para realizar el presente estudio.

La región de Cajuata (Latitud 16° 30', Longitud 68° 50') provincia Inquisivi del Departamento de La Paz, zona que es el primer foco de *Leishmania mexicana* recientemente descrita en el departamento de La Paz, por un grupo de

investigadores del Instituto Boliviano de Biología de Altura (datos no publicados).

La región de Yucumo (Latitud 15° 20', Longitud 67° 5') Departamento de Beni. En esta zona se reportado la presencia de *Leishmania brasiliensis* que puede causar leishmaniasis cutánea y mucocutánea

### 1.3. AISLAMIENTO DE CEPAS AUTOCTONAS

El aislamiento de cepas autóctonas, se logró a partir de aspirado de lesiones de pacientes sembrado directamente en medio de cultivo y a partir de lesiones de hamster, infectados con aspirados de lesiones de pacientes, también en medio de cultivo NNN. Los cultivos fueron vigilados diariamente hasta observar parásitos en el tubo

### 1.4. CEPAS AUTOCTONAS

TABLA No 2 Cepas autóctonas

CEPA	ABREVIACION
MHOH/BO/96/CJ5	CJ5
MHOM/BO/96/CJ10	CJ10
MHOM/BO/96/CJ11	CJ11
MHOM/BO/96/CJ27	CJ27
MHOM/BO/96/CJ18	CJ18
MHOM/BO/96/CJA	CJA
MHOM/BO/96/EQZ	EQZ
MHOM/BO/96/CB	CB
MHOM/BO/96/EN	EN

### **1.5. CAPTURA DE ANIMALES Y TOMA DE MUESTRA.**

La captura de animales y toma de muestra estuvo a cargo de un grupo de investigadores del Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA) y ORSTOM.

Los animales fueron capturados con trampas instaladas en el monte y cerca a casas y huertas.

Toma de muestra: Se tomó de cada animal capturado una muestra de sangre (sin anticoagulante) conservada en tampón guanidina v/v (Guanidina 6M, EDTA 200 mM pH= 8).

También fueron tomadas muestras de tejidos (pedazos de bazo, hígado y piel) y colocados para su conservación en tampón guanidina.

A partir de una mezcla de hígado, piel y bazo triturado de cada animal se realizó inyecciones a hamster, con el fin de aislar cepas de los mamíferos capturados.

## **1.6. SANGRE DE PACIENTE.**

Una persona proveniente de Cajuata de ocupación minero se presentó con una lesión típica crateriforme en el brazo de 1 cm de diámetro.

Este paciente presentó resistencia al tratamiento. Después de 5 meses de tratamiento se presenta nuevamente con 13 úlceras ubicadas principalmente en brazos y piernas. Se hizo estudios directamente sobre sangre y caracterización del parásito además de aislar la cepa mediante cultivo.

## **2. METODOS DE CULTIVO.**

Diez cepas de referencia se cultivaron en medio NNN (Novi Mac Neal Nicolle) enriquecido con suero fetal bovino hasta un 40%. Es un medio de cultivo bifásico (Anexo 1) utilizado para aislar y descongelar cepas de diferentes especies de Kinetoplastidae.

Para realizar el cultivo masivo de las cepas y una vez constatada su adaptación al medio NNN, se hizo el traspaso a medio Schneider (Anexo 1). Este medio monofásico, fue enriquecido con concentraciones variables de suero fetal bovino desde 10% a 40%, según el desarrollo inicial de los parásitos hasta obtener su adaptación y lograr el cultivo.

### **2.1. CRIOPRESERVACION.**

Los parásitos bajo la forma de promastigotes en fase exponencial fueron conservados por criopreservación en criotubos de 2 ml. congelados en nitrógeno líquido a -196 °C.

Todo el procedimiento se realizo bajo condiciones estériles.

El medio de congelación tiene los siguientes componentes: medio de cultivo Schneider (7ml), suero fetal bovino (3 ml); dimetil sulfoxido (DMSO 1.5 ml estéril).

Una vez preparado el medio de congelación se colocó en tubos de

crioconservación (NUNC), en proporción v/v; primero se puso el volumen de la cepa a congelar y luego el medio de congelación gota a gota mezclando bien. Una vez llenos los tubos se colocaron a -20 °C por una hora, luego a -70 °C por 24 horas, finalmente se introdujo en nitrógeno líquido a -196 °C.

### **3. EXTRACCION DE DNA**

El DNA de diecisiete cepas de referencia fue proporcionado por el laboratorio de ORSTOM Montpellier Francia.

#### **3.1. A PARTIR DE SEDIMENTOS DE PARASITOS.**

La extracción de DNA de diez cepas de referencia se realizó a partir de sedimentos de parásitos obtenidos por cultivo masivo.

La manipulación se hizo en microtubos con un máximo de 50 mg de parásitos resuspendidos en 400 ul de tampón TE (10 mM Tris-Cl pH= 7,4; 1mM EDTA pH=8), cuando el peso del sedimento era menor se mantuvo el volumen del tampón.

La desproteización del DNA se hizo con proteinasa K (10mgPK/100mg parásitos), combinada con la denaturación producida por el detergente iónico sodio dodecyl sulfato (SDS concentración final 1%), y tampón TE. El lisado se incubo toda la noche a 56 °C.

La purificación del DNA se hizo por extracciones consecutivas con fenol v/v y cloroformo/isoamilalcohol v/v, siempre recuperando la fase acuosa. La precipitación del DNA se realizó con solución salina (acetato de sodio 0,3 M) concentración final y etanol puro frío (dos veces el volumen obtenido).

Después de una centrifugación (15 minutos a 12000 rpm) y deshechando el etanol puro, se lavó con etanol al 70% (100 ul) frío para eliminar las sales residuales, nuevamente se centrifugó (15 minutos 12000 rpm) y deshechando el etanol se dejo evaporar por 24 horas a medio ambiente.

Luego el DNA se resuspendió en agua destilada de acuerdo al peso del

sedimento inicial (75mg parásitos en 50ul de agua destilada).

El DNA fue dosificado mediante diluciones consecutivamente menores (2x) y electrofóresis en gel de agarosa 1.5%, considerandose que la menor concentración en la que se ve una banda nítida es 30 ng.

### **3.2 .A PARTIR DE SANGRE.**

El volumen de sangre extraído de animales fue de 0,5 ml mezclado con tampón guanidina 0,5 ml en microtubos.

Previamente a la extracción el volumen total fue sometido a hervido en baño maria por 10 minutos, logrando el lisado de los parásitos liberando los minicírculos del kDNA.

De la muestra hervida se extrajo 100 ul, volumen a partir del que se realizó la extracción por duplicado

Se purificó el DNA por extracciones consecutivas con fenol v/v, una mezcla de fenol cloroformo v/v y cloroformo v/v, luego se precipitó en presencia de acetato de sodio (0,3M concentración final) y etanol puro frío(2 veces el volumen).

Se centrifugo (15 minutos a 12000 rpm) lavando luego con etanol al 70% y dejando evaporar el alcohol por 24 horas a medio ambiente, para resuspender en 30 ul de agua destilada.

### **3.3. A PARTIR DE TEJIDO.**

Las muestras de tejido conservadas en tampón guanidina fueron cortadas con sacabocados, obteniendose una muestra de 4 mm<sup>3</sup>.

Luego la muestra fue incubada toda la noche con el tampón de digestión (Na Cl 100 mM, Tris-Cl 10mM pH 8, EDTA 25mM pH 8, Sodio dodecyl sulfato 0,5% proteinasa K 0,1 mg/ml).

Posteriormente la purificación del DNA se hizo con extracciones consecutivas de fenol/cloroformo v/v y cloroformo v/v, recuperando siempre la fase acuosa.

La precipitación del DNA se hizo con acetato de sodio 0.3 M (concentración final) en presencia de etanol puro frío (2 veces el volumen).

Las sales residuales se eliminaron por lavado con etanol al 70%. Se resuspendió el DNA en 30  $\mu$ l de agua destilada.

#### **MODIFICACION:**

Las muestras ( $4\text{mm}^3$ ) fueron congeladas en nitrógeno líquido por 5 minutos y luego trituradas e incubadas con el tampón de digestión toda la noche.

La extracción de DNA se hizo con fenol v/v, fenol/cloroformo v/v y cloroformo/isoamilalcohol v/v.

Los pasos de precipitación y resuspensión del DNA se hizo como indica el anterior protocolo.

En cada protocolo de extracción de DNA a partir de muestras biológicas se procesó bajo las mismas condiciones que las muestras, un testigo negativo, agua destilada y un testigo positivo, sangre o tejido infectado.

Estos protocolos fueron estandarizados por otro investigador del Instituto Boliviano de Biología de Altura para una Tesis de Maestría (Tesis inédita).

#### **4. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

Previamente en el Laboratorio se escogieron cebadores a partir de la secuencia de las partes conservadas de los minicírculos de una cepa de *Leishmania brasiliensis* (MHOM/BR/75/M2904) establecida por de Bruijn and Barker (1992).

La estandarización de la técnica fue realizada por otro investigador del IBBA para una Tesis de Maestría (Tesis inédita).

Los cebadores fueron denominados L1 y L2 cuyas secuencias son:

L1= 5' CCT ACC CAG AGG CCT GTC GGG 3' (21 bases)

L2= 5' TAA TAT AGT GGG CCG CGC AC 3' (20 bases)

Estos cebadores se alinean sobre la parte conservada del minicírculo y amplifican la parte variable.

### **- AMPLIFICACION *IN VITRO*.**

La repartición y almacenamiento de los componentes reactivos de PCR se realizo en un ambiente libre de DNA, todo el material empleado fue decontaminado con solución al 10% de hipoclorito de sodio que denatura el DNA, se trabajó con tips con filtro para evitar los aérosoles.

Un segundo ambiente se usó para el cargado de las muestras donde también todo el material fue decontaminado con luz ultravioleta. Es importante no llevar el material del segundo ambiente al primer ambiente evitando así fuentes de contaminación.

En cada protocolo se cargó en microtubos de PCR los testigos positivo y negativo de la extracción y agua destilada proveniente de la repartición para el control de contaminación.

Las condiciones de amplificación son:

PRODUCTO VOL/TUBO	CONCENTRACION	CONCENTRACION FINAL POR TUBO	
Tampón (Promega)	10x	1X	10 ul
dNTP	25 mM	0.2mM	0.8 ul
Mg Cl <sub>2</sub>	25 mM	2mM	8 ul
L1	100 pmoles/ul	100pm/ul	1 ul
L2	100 pmoles/ul	100pm/ul	1 ul

Taq Polimerasa (Promega) 5 U/ul	0.025 U/ul	0.5 ul
Agua destilada		68,7 ul
Aceite mineral		50 ul
ADN	100ng	10ul
volumen total de reacción		100 ul

Según el número de tubos necesarios, se preparó una solución homogénea mezclando estos productos. Luego se repartió en cada tubo de reacción un volumen de 89,5 ul, cubriendo con 50 ul de aceite mineral que evita la evaporación de la mezcla durante el proceso de la amplificación.

Una repartición de los productos sin añadir Taq polimerasa puede ser congelada a -20 °C. Para usar esta repartición se descongela la solución y se añade Taq polimerasa.

En el segundo ambiente se cargó a cada tubo de reacción 10 ul. de DNA (100ng/10ul). Estos tubos de reacción se colocaron en un termociclador que cumple los siguientes ciclos:

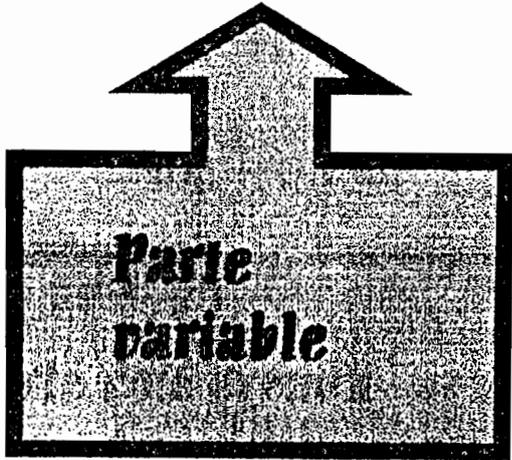
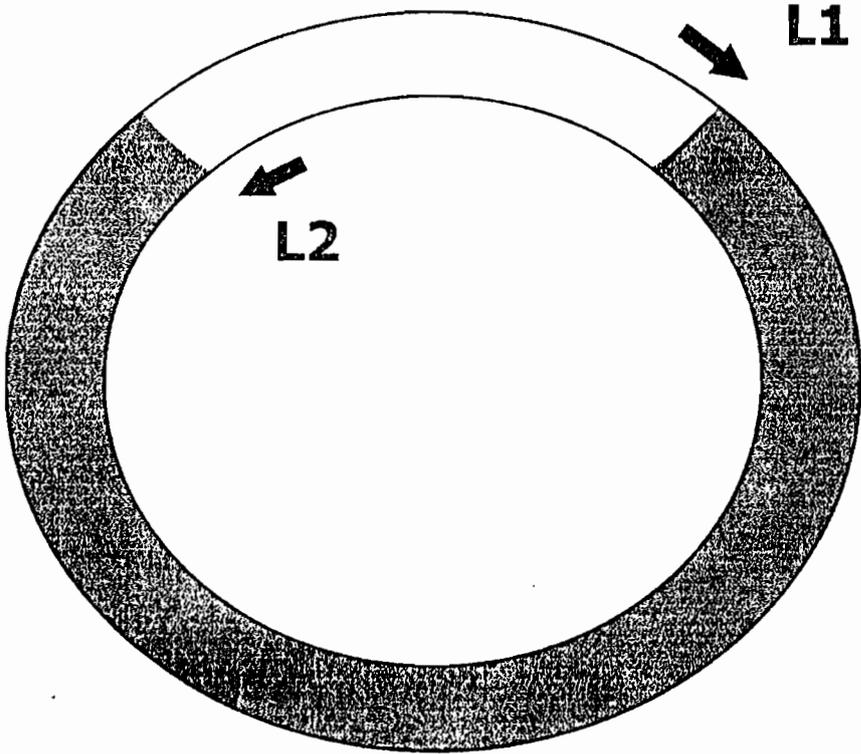
1er. ciclo:

Denaturación	96 °C	6 minutos
Alineamiento	58 °C	1 minuto
Elongación	72 °C	1 minuto

2do. hasta 40 ciclos:

Denaturación	93 °C	0,5 minutos
Alineamiento	58 °C	1 minuto
Elongación	72 °C	1 minuto

3ro. 4 °C por tiempo indefinido



#### **4.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CEBADORES L1 y L2 EN DNA PURIFICADO DE CEPAS DE REFERENCIA**

La sensibilidad de la técnica de PCR con los cebadores L1 y L2 fue determinada mediante diluciones seriadas de DNA (10ng a 10fg), seguidas de su amplificación, de cepas de referencia pertenecientes a diferentes complejos de *Leishmania*.

En búsqueda de la especificidad de los cebadores L1 y L2 se aplicó la técnica a DNAs purificados de otros kinetoplastidae usando 100 ng de DNA en cada ensayo: *Trypanosoma cruzi* (5 cepas), *Trypanosoma brucei sp.*(3 cepas), *Trypanosoma rangeli* (4 cepas).

Con objetivo de encontrar una mayor especificidad se realizó la amplificación con dos diferentes temperaturas de alineamiento: 61 °C y 64 °C, con DNAs de cepas pertenecientes a *Leishmania*, *T. cruzi* y *T. rangeli*.

#### **4.2. REPRODUCIBILIDAD DE LA TECNICA PCR**

La reproducibilidad de la técnica se realizó mediante ensayos independientes sobre un mismo DNA de cepas de referencia.

Los productos obtenidos previamente controlados por electrofóresis en gel de agarosa, fueron sometidos a electrofóresis en gel de acrilamida para verificar si todos los ensayos presentaban las mismas bandas de amplificación.

#### **4.3. CONTROL DE INHIBICIÓN DE LA PCR SOBRE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Para realizar la prueba de inhibición de la PCR en extracciones de DNA de sangre conservada en tampón guanidina, extraímos DNA de animales no infectados con *Leishmania*. En este extracto se añadió DNA purificado de *L. brasiliensis* en concentraciones de 10ng a 10fg y luego se realizó la amplificación.

Para evaluar inhibición sobre de la PCR en tejidos se procesó de manera

similar extrayendo DNA de pedazos de tejidos conservados en tampón guanidina de animales no infectados.

## **5. ANALISIS ELECTROFORETICO.**

Para visualizar los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de PCR se realizó electrofóresis en dos tipos de geles, agarosa y poliacrilamida.

### **5.1. EN GEL DE AGAROSA.**

Mediante electrofóresis en gel de agarosa se separó los fragmentos de DNA obtenidos por la técnica de PCR bajo las siguientes condiciones:

Concentración del gel	1,5%
Tampón de disolución	TAE 1x (Anexo 2)
Tampón de corrida	TAE 0,5x
Voltaje de corrida	100 v.
Tinción del gel por bromuro de etidio (10mg/ml).	

Visualización iluminación luz ultravioleta

### **- TINCION CON BROMURO DE ETIDIO.**

Para la visualización de los productos de PCR, el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio, preparado en una concentración de 10mg/ml de agua.

### **5.2. EN GEL DE ACRILAMIDA.**

La electrofóresis en gel de acrilamida fue escogida para realizar el análisis del polimorfismo de los productos de PCR por presentar una mayor resolución en la separación de los fragmentos, facilitando la comparación de bandas entre las cepas.

Condiciones de realización:	
Concentración del gel	7,5%
Tamaño del gel	10x10 cm.
Tampón de disolución	TBE 1x (Anexo 2)

Tampón de corrida	TBE 0,5x
Voltaje	100 v
Amperaje	10A
Tiempo de corrida	1 hora 30 minutos
Cubeta de electrofóresis (Bioblock Scientific)	

\* Después de realizada la electrofóresis Los perfiles fueron comparados dos a dos y el número de bandas comunes entre cada par de cepas fue calculado.

Para realizar este análisis se hizo varias corridas electroforéticas, cambiando la posición relativa de las cepas en los geles.

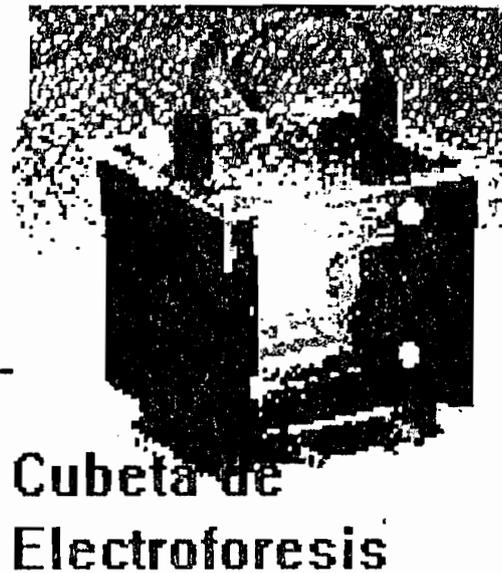
En cada gel hemos introducido una cepa patrón escogida (JP) que presentaba un perfil de bandas complejo con fines de numerar todas las bandas de las cepas comparativamente a este perfil.

Todas las bandas fueron numeradas según su posición electroforética relativa: 1 para la banda más lenta (mayor peso molecular) y 2, 3... sucesivamente.

Los productos de amplificación de las cepas aisladas de pacientes, de un vector (CJA), de la muestra de sangre humana (CJ28) y de la sangre del *Conepatus chinga rex* han sido comparados por electrofóresis en gel de acrilamida a 3 cepas pertenecientes al complejo mexicana : (MNYC/BZ/62/ M379 *L. mexicana*, IFLA/BR/67/pH 8 *L. amazonensis*, MHOM/VE/57/LV 135 *L. pifanoi*), dos cepas pertenecientes a los complejos donovani y braziliensis (MHOM/BR/74/Pp 75 *L. chagasi* y MHOM/BO/90/JP *L. brasiliensis*).

### 5.2.1. PREPARACION DEL GEL

La acrilamida es un neurotóxico potente que debe ser manipulado con precaución, usando guantes y barbijo.



El gel se preparó a una concentración de 7,5% , a partir de una solución de bis-acrilamida y acrilamida al 30%. Para 35 ml de volumen total se puso un volumen de 8.75 ml de bis-acrilamida y acrilamida; Tampón TBE a partir de 5x (7ml) para una concentración final de 1X; APS (persulfato de amonio poner concentración) 240 ul; TEMED 10,5 ul y agua destilada 19 ml.

Estos componentes se mezclaron bien y la solución se vació entre las láminas de vidrio que sirve de molde, evitando que entre burbujas, usando un peine de 0.75 mm.

La polimerización se produce generalmente en aproximadamente 20 minutos, para controlar la polimerización, se vació en un tubo de ensayo 2 ml de solución y cuando polimerizó en el tubo se consideró que el gel estaba polimerizado.

Luego el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TBE a 1x, se cargó las muestras y la corrida electroforética se realizó a 100v y 10 A por una hora y 30 minutos.

### **5.2.2. COLORACION DEL GEL**

El gel de acrilamida fue teñido con bromuro de etidio y nitrato de plata.

#### **- TINCION CON BROMURO DE ETIDIO**

Una vez realizada la corrida electroforética, el gel de acrilamida fue teñido con bromuro de etidio disuelto en tampón TBE 1x a una concentración de 1ug/ml por 15 minutos, para la visualización de los fragmentos de DNA.

#### **- TINCION CON NITRATO DE PLATA**

Con objeto de obtener una mayor sensibilidad en la detección de los fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel de acrilamida, se realizó una tinción con nitrato de plata.

La tinción con nitrato de plata del gel de acrilamida fue realizada después de una coloración con bromuro de etidio con los siguientes pasos:

1- Después de la corrida electroforética, se lavó el gel con un tampón de lavado 1x (78,4 mM de fosfato y 21,6 mM citrato, pH 3) por 30 minutos en agitación. La solución madre 10X fue preparado mezclando 200 ml de fosfato de

sodio monobásico con 55 ml de ácido cítrico 1M)

2- Lavar el gel con 50 ml de 50% de metanol y 10 % de ácido tricloroacético por 30 minutos por agitación.

3- Lavar dos veces el gel con 50 ml de ácido acético al 5% y etanol al 10% por 20 minutos

4- Lavar dos veces el gel con 50 ml de etanol al 10% por 10 minutos.

5- Teñir el gel con una solución de nitrato de plata por 40 minutos. La solución se prepara mezclando 40 ml de hidróxido de sodio 0.1 M, 3 ml de hidróxido de amonio concentrado y un 1 g de nitrato de plata disuelto en 10 ml de agua destilada, mezclar hasta la desaparición del precipitado blanco y enrasar a 200 ml con agua.

6- Lavar el gel con 50 ml de agua destilada siempre por agitación por 5 minutos.

7- El revelado del gel se realiza con 300ml de solución preparada en el momento de su uso con ácido cítrico al 0.01% (30mg); 400 ul de formaldehído al 35 %.

8- Cuando las bandas del gel se ven nítidamente de un color marrón se para el revelado con 50 ml de etanol al 20 % y ácido acético al 5%. Esta solución aclara el fondo del gel cuando este se ha tornado amarillo durante el revelado.

9- Luego se lava el gel 3 veces ( primero 30 minutos y dos lavados de 60 minutos) con etanol al 20 %. En esta solución el gel puede guardarse por varios días a temperatura ambiente.

Para obtener un fondo claro durante la tinción, se debe preparar tanto la solución de nitrato de plata como la solución de revelado inmediatamente antes de usar en recipientes de vidrio enjuagados previamente con HCl y agua destilada. La manipulación del gel debe realizarse con guantes.

## **- SECADO DEL GEL.**

Para secar el gel es necesario incubarlo en una solución de etanol al 20 % y 1 % de glicerol por 3 horas en agitación a temperatura ambiente.

El secado se realizó entre dos pedazos de papel celofán permeable a 49 °C, al vacío por 90 minutos.

\* El gel seco se puede guardar indefinidamente.

## **6. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DOS MARCADORES GENETICOS**

Con objeto de comparar dos tipos de marcadores genéticos kDNA-PCR y electrofóresis de isoenzimas, hemos construido un dendrograma a partir de los datos del análisis isoenzimático de estas mismas cepas. Los genotipo isoenzimáticos han sido previamente establecidos por Guerrini (1993) que hizo un estudio de las relaciones filogenéticas a partir de un panel de 139 cepas de *Leishmania*. A partir de estos datos hemos calculado las distancias fenéticas de Jaccard solamente entre cada par de cepa incluidas en nuestro estudio.

## **7. HIBRIDACION**

Todas las muestras positivas a la técnica de PCR fueron sometidas a un proceso de hibridación con sondas previamente producidas en el laboratorio por otro investigador para Tesis de Maestría (Tesis inédita). Son 3 sondas de kDNA específicas de 3 complejos: *Leishmania brasiliensis*, *leishmania mexicana* y *Leishmania donovani*. Estos complejos incluyen diferentes especies de *Leishmania* presentes en los Yungas del Departamento de La Paz.

### **7.1. CONDICIONES DE HIBRIDACION Y MARCADO DE LA SONDA**

Los productos de PCR fragmentados en gel de agarosa al 1,5% fueron transferidos a membranas de nylon. El gel se incubó en una solución de transferencia (NaOH 0,5 N, Na Cl 1,5 N) para denaturar el DNA. La transferencia se hizo al vacío.

La prehibridación consiste en incubar las membranas a 42 °C en tampón de hibridación (0,12ml/cm<sup>2</sup>) por 15 minutos para impregnarlas de manera homogénea.

Se usó un kit de marcación de DNA sin radioactividad (marcación fría), basado sobre la marcación directa de la cadena de DNA por peroxidasa ( kit ECL, Amersham, UK) siguiendo las recomendaciones de la firma.

Las sondas fueron marcadas por 10 minutos a 37 °C. Diez nanogramos de sonda marcada por mililitro de tampón de hibridación fue añadido. La hibridación se realizó a 42 °C toda la noche en un horno de hibridación rotatorio.

Para remover los productos de hibridación no específicos, las membranas fueron lavadas dos veces bajo condiciones de alta astringencia (Urea 6M, 0,1 SSC a 42 °C por 20 minutos) y luego dos veces en 2x SSC a temperatura ambiente por 10 minutos. Dos exposiciones fueron realizadas (1 y 30 minutos) sobre Hyperfilm MP (Amersham Buckinghamshire, UK).

El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

## **8. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS**

Las cepas autóctonas aisladas fueron tipificadas por electrofóresis de isoenzimas con 8 loci bajo las condiciones descritas por Guerrini (1993).

### **8.1. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS**

El sedimento de parásitos obtenido mediante cultivo masivo se mezcló con una solución estabilizadora de enzimas (Ditiotrietol 2mM, Acido amino N caproico 2mM, EDTA Na 2mM), 10ul/10mg parásitos peso húmedo e incubado por 20 minutos sobre hielo, luego fue sometido a centrifugación (15000 rpm 5 minutos).

Los sobrenadantes que contienen enzimas hidrosolubles fueron alicuotados a 10 ul y conservados a -70 °C. Los sedimentos se guardaron también a -70 °C para posteriormente realizar extracción de DNA.

## **8.2. SISTEMAS ENZIMATICOS Y ELECTROFORESIS**

La electrofóresis se realizó sobre placas de acetato de celulosa de acuerdo a Guerrini (1993), con algunas modificaciones.

Ocho diferentes sistemas enzimáticos fueron analizados (8 loci): Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, E.C.1.1.1.49), Glucosa fosfato isomerasa (GPI, E.C. 5.3.1.9.), Malato deshidrogenasa (MDH, E.C. 1.1.1.37), Enzima málica (ME, E.C.1.1.1.40), Peptidasa 1 (PEP1, E.C. 3.4.11), Fosfoglucomutasa (PGM, E.C.2.7.5.1.), Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, E.C.1.1.1.44), Isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C.1.1.1.42).

El material de electrofóresis fue obtenido de los laboratorios Helena (Helena Beaumont, Texas) y los reactivos químicos del laboratorio Sigma (USA).

Previamente al depósito de las muestras sobre las placas de acetato de celulosa, éstas fueron sumergidas por 20 minutos en un tampón de imbibición (la composición del tampón de imbibición es la misma que los tampones de migración, (Anexo 3). El exceso de tampón de las placas se absorbió con papel filtro.

Las muestras se depositaron sobre las placas de acetato de celulosa con la ayuda de un aplicador especial (Helena), luego el gel se depositó en la cámara electroforética y la migración se realizó bajo condiciones específicas según el sistema enzimático Anexo 4.

## **8.3. REVELADO DE LAS PLACAS**

Las bandas se visualizaron mediante reacciones bioquímicas específicas, en presencia del sustrato específico del enzima a analizar y los cofactores (coenzimas, iones y otros compuestos químicos).

Las soluciones específicas con los colorantes se añadieron a una solución de agarosa al 1,2 % v/v y vaciaron a cajas Petri para formar un gel y guardarlo en la oscuridad hasta su uso.

Después de la migración las placas de acetato de celulosa se depositaron sobre el gel de revelado y la caja Petri se incuvó a 37 °C.

Una vez que las bandas fueron nítidas la reacción se paró por inmersión de la placa de acetato de celulosa en una solución al 5% de ácido acético.

## **9. ANALISIS ESTADISTICO DE LA VARIABILIDAD ISOENZIMATICA Y DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

### **9.1. DISTANCIAS DE JACCARD**

El análisis fenético de las cepas, se realizó basado en las distancias de Jaccard, que permite la construcción de dendrogramas.

Las matriz de distancias de Jaccard fueron calculadas a partir del análisis de los perfiles PCR-kADN e isoenzimáticos

### **9.2. DISTANCIAS GENETICAS DE NEI**

Las cepas autóctonas fueron analizadas además por las distancias genéticas de Nei.

### **9.3. CONSTRUCCION DE DENDROGRAMAS**

A partir de las matrices de distancias de Jaccard y Nei se construyó dendrogramas por jerarquización ascendente usando el Mac Dendro Software.

# CAPITULO III

## RESULTADOS

### 1. ANALISIS DEL POLIMORFISMO DEL kDNA DE LOS MINICIRCULOS

#### 1.1. APLICACION DE LA TECNICA DE PCR SOBRE CEPAS DE REFERENCIA

Los productos obtenidos mediante PCR, muestran en geles de agarosa 1,5% un perfil de bandas polimórfico para cada cepa (fig 1).

Los fragmentos obtenidos tienen un rango de 100 a 1300 pb, determinado por el marcador de peso molecular PUC 19 digerido con la enzima de restricción *Ras I*.

Para la cepas pertenecientes al complejo *L. braziliensis*, se observa un perfil característico de un paquete de bandas de alrededor de 600 pb correspondiente al tamaño de la parte variable de los minicírculos de estas cepas. Para las cepas pertenecientes a los otros complejos no se observa un perfil específico.

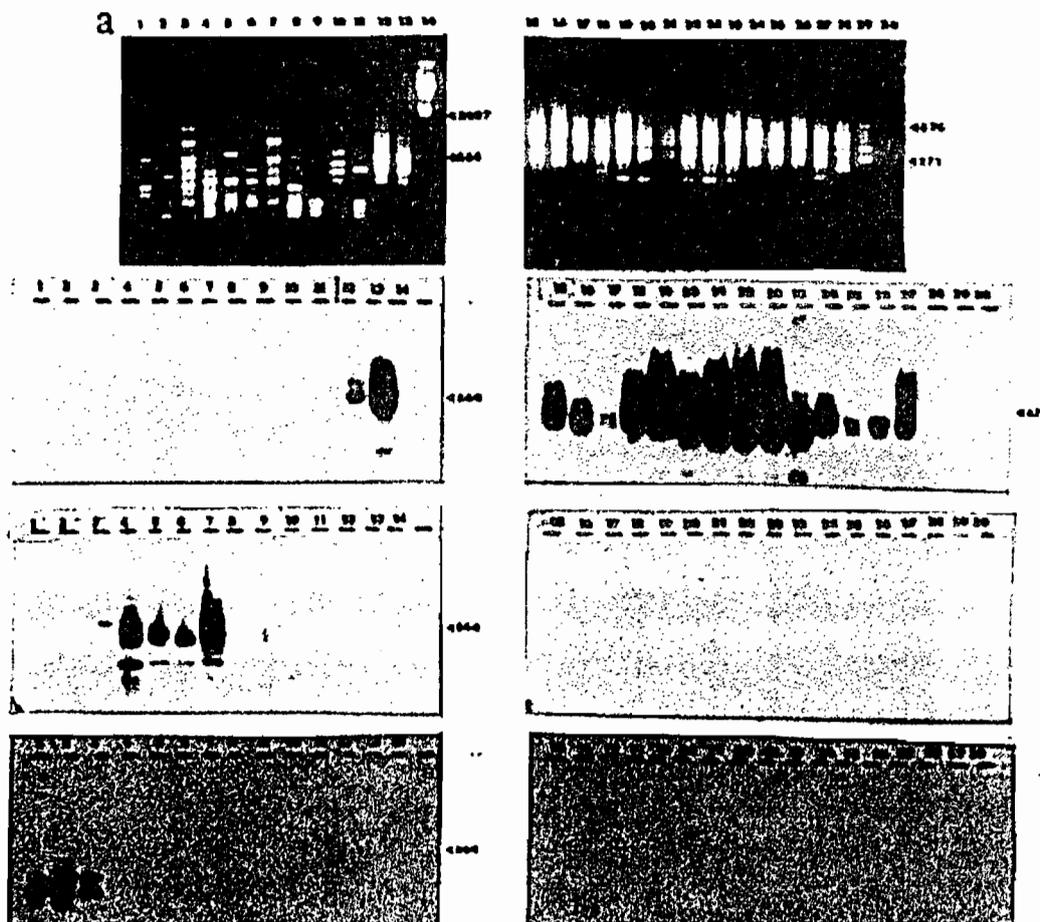


Fig. 1:a: Amplificación de partes variables del kDNA de los minicírculos por la técnica de PCR de cepas de referencia pertenecientes a diferentes complejos de *Leishmania*.

Electroforesis de estos productos de amplificación en gel de agarosa al 1,5%. visualizados por tñido con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta. b,c,d,: Hibridación con sondas específicas de complejos de *Leishmania* (CG, M379,PP75 respectivamente). Líneas 1-3: complejo *L. donovan*(L13, L101 Y PP75); líneas 4-7 y 9 complejo *L. mexicana*(JAP78, PH8, LTB012,M379 Y GML3); línea 8 *Leishmania sp.*; línea 10: *L. tarentolae* (G10); línea 11: *L. major* (5Askh); línea 12-13 y 15-27: complejo *L. brasiliensis* (REST417,CG, Lem 669, M5378, LTB300,Lem469, JP, AM,EL, JM, CS, GC, M2904, LH1016, LPZ595 Y HB44); línea 28: *L. jansoni* (M6426); línea 29: *L. trópica* (k27); líneas 14 y 30 marcador de peso molecular Lambda Hind III y Puc Ras I.

## - SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES L1 Y L2

La sensibilidad es diferente según las cepas y se presenta la última dilución para la cual se observó una amplificación en general limitada a algunas bandas y no a todas las obtenidas a concentraciones mayores. Las siguientes cepas fueron probadas:

MHOM/BR/79/L 101	<i>L. chagasi</i>	1 ng
MHOM/BR/74/PP75	<i>L. chagasi</i>	100 pg
IFLA/BR/67/PH 8	<i>L. amazonensis</i>	10 pg
MHOM/BO/90/CG	<i>L. brasiliensis</i>	0.1 pg

Se observó una mayor sensibilidad para la cepa CG perteneciente al complejo *L. brasiliensis* (figura 2).

En la prueba de especificidad todas las cepas pertenecientes a: *Trypanosoma cruzi* (5 cepas); *Trypanosoma brucei* (3 cepas); *Trypanosoma rangeli* (4 cepas), dieron productos de PCR perfil de bandas de un rango de 100 a 1000 pb, este rango incluye las cepas de *Leishmania* pero cada cepa muestra un perfil diferente. Además se observó un polimorfismo importante en el grupo de cepas pertenecientes al taxon *T. cruzi* (figura 3).

Para las temperatura de 61 y 64 °C, se obtuvo también productos de amplificación nítidos para todas las cepas, cada cepa presentando un perfil de bandas muy similar a los perfiles obtenidos a la temperatura de alineamiento de 58 °C.

Pequeñas variaciones en los perfiles se tradujieron en desaparición de bandas menores a temperaturas por encima de 60 °C

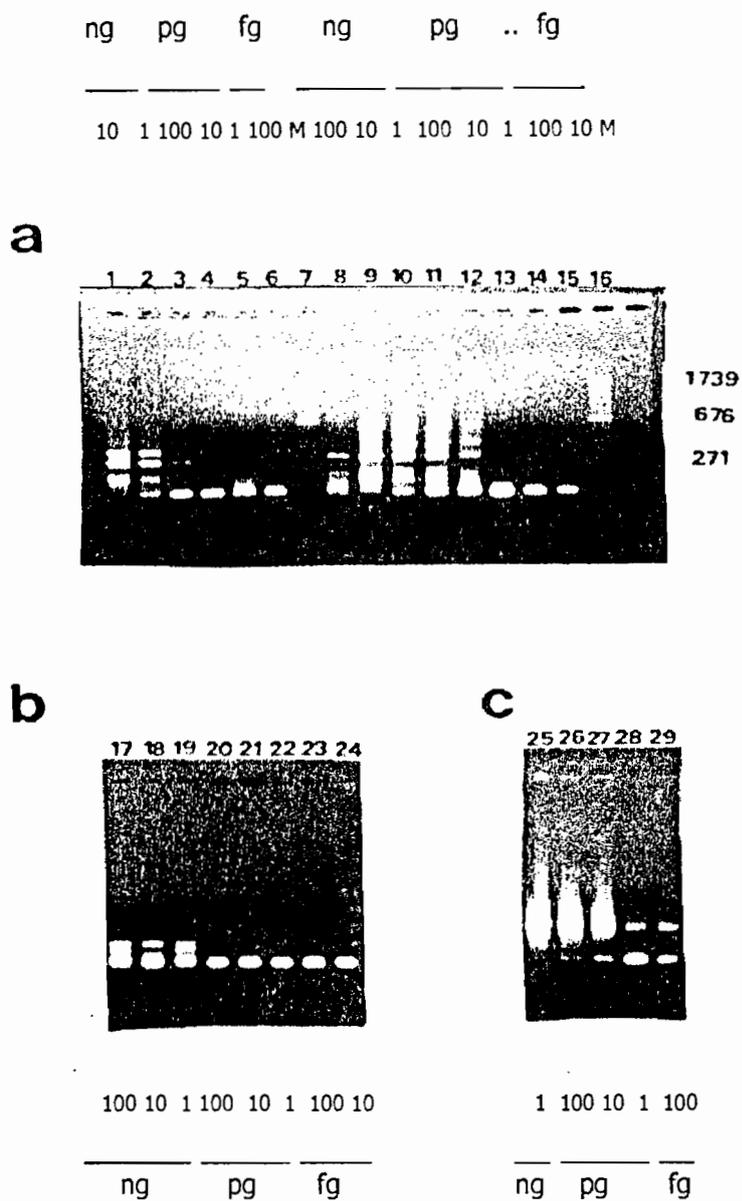


Fig.2 a) Sensibilidad de los cebadores L1 y L2 en cepas de referencia pertenecientes a diferentes complejos: a) MHOM/BR/Pp75 *L. chagasi* (complejo donovani), IFLA/BR/67/pH8 *L. amazonensis* (complejo mexicana).  
 b) MHOM/BR/79/L101 *L. chagasi* (complejo donovani).  
 c) MHOM/BO/90/CG *L. brasiliensis* (complejo brasiliensis).

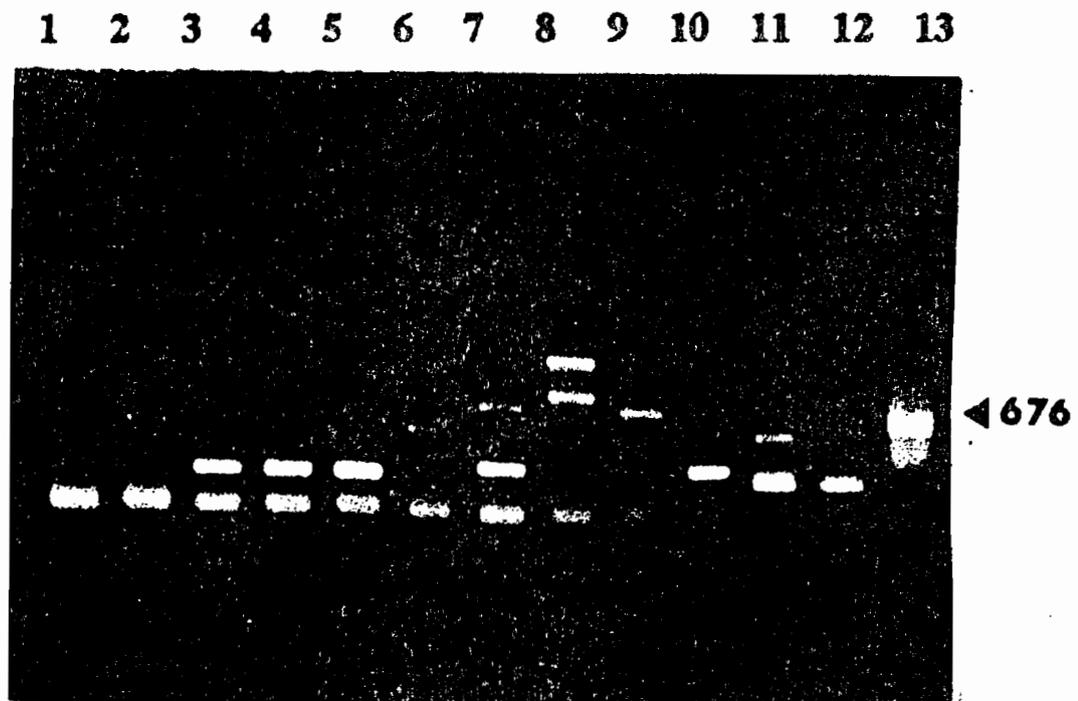


Figura 3. Especificidad de cebadores L1 y L2 en Kinetoplastidae temperatura de alineación 58 °C :  
líneas 1-5 (*T. cruzi*); líneas 6-9 (*T. rangeli*); líneas 10-12 (*T. brucei*); línea 13 (*Leishmania*).

## - REPRODUCIBILIDAD DE LA TECNICA PCR

Los productos de PCR muestran algunas variaciones de bandas menores en ensayos independientes (figura 4). Por otra parte cierta variación también fue observada sobre una misma muestra de PCR en el curso del tiempo debido a degradación del DNA. Para el análisis se tomo en cuenta estos factores, seleccionando las bandas más nítidas y constantes.

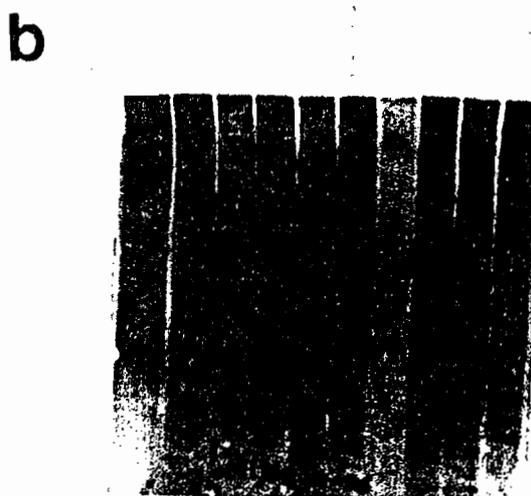
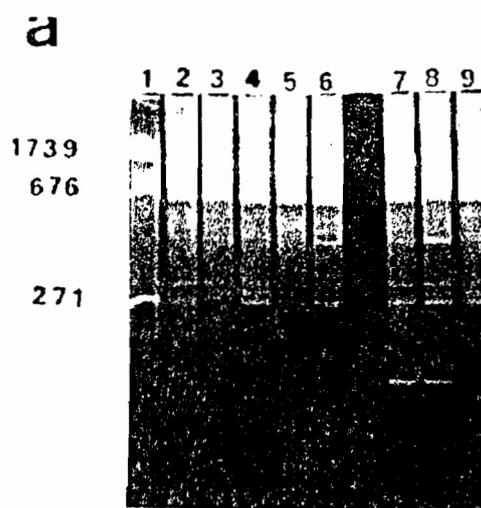


Fig. 4: Reproducibilidad de la técnica de PCR: Línea 1 (Puc 19 Ras1); Líneas 2-4 (EL); líneas 5-6 (AM); Líneas 8-10 (JP).

## 1.2 ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Este análisis fue aplicado a los productos de PCR de todas las cepas seleccionadas de *Leishmania* pertenecientes a los diferentes complejos. 55 bandas diferentes fueron numeradas en el muestreo total. El promedio de bandas por cepa es de 14,8.

Ninguna de las cepas presentaban un perfil estrictamente idéntico. Además ciertas cepas no compartían ninguna banda en común. La figura 5 a y b presenta un gel de poliacrilamida con diferentes productos de amplificación y el esquema interpretativo de las bandas obtenidas. Durante el análisis nos hemos apoyado en esquemas.

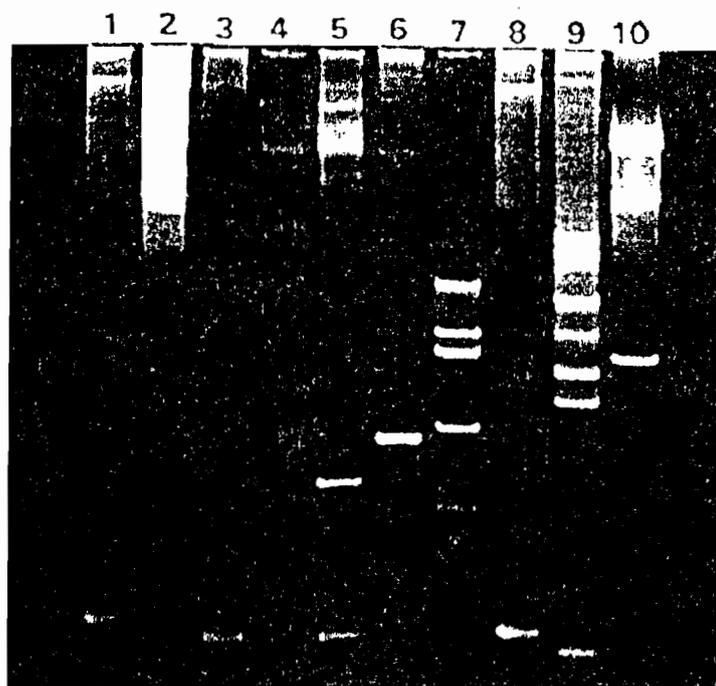


Fig. 5 Electroforesis en gel de poliacrilamida de productos de PCR de cepas de *Leishmania* especies pertenecientes a diferentes complejos. 1-3 (CG *L. brasiliensis*), 4 (Lem 669 *L. brasiliensis*), 5 (LH 1016 *L. brasiliensis*), 6 (Pp 75 *L. chagasi*), 7 (k 27 *L. trópica*), 8 (CG *L. brasiliensis*), 9 (L13 *L. donovani*); 10 (marcador de peso molecular Puc 19/Ras I).

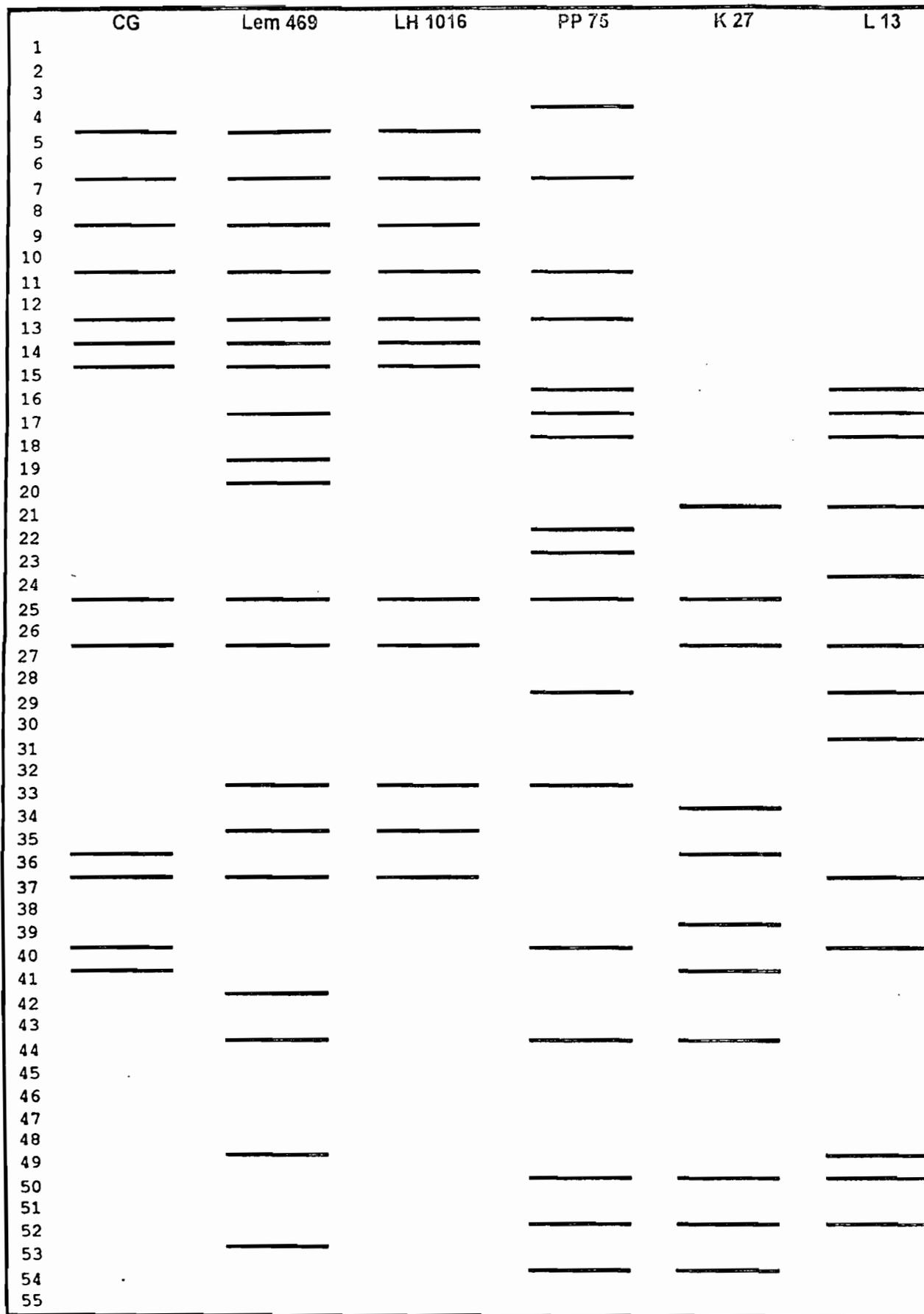


Figura 5 a: Esquema de perfiles presentados por cepas de referencia en gel de acrilamida.





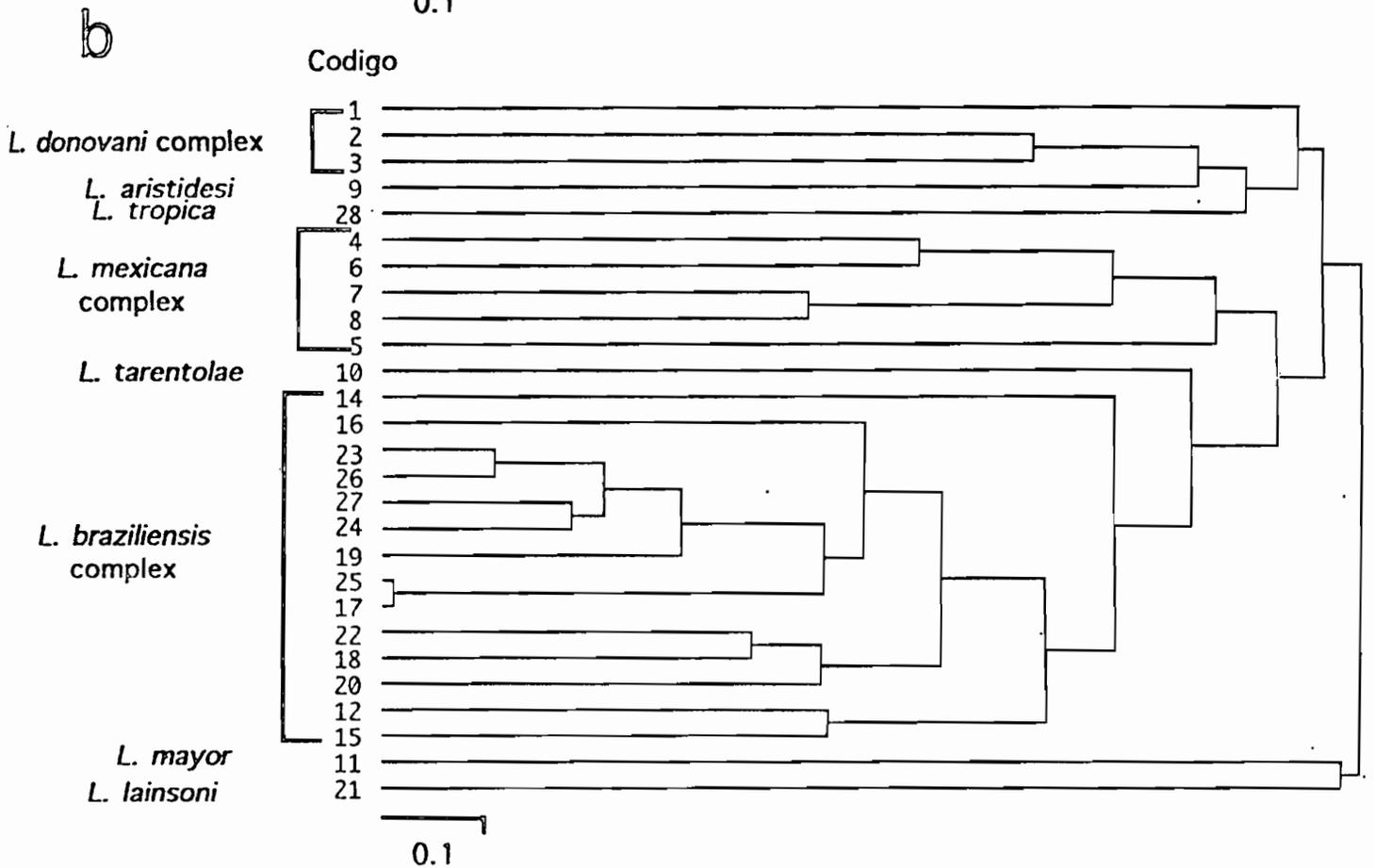
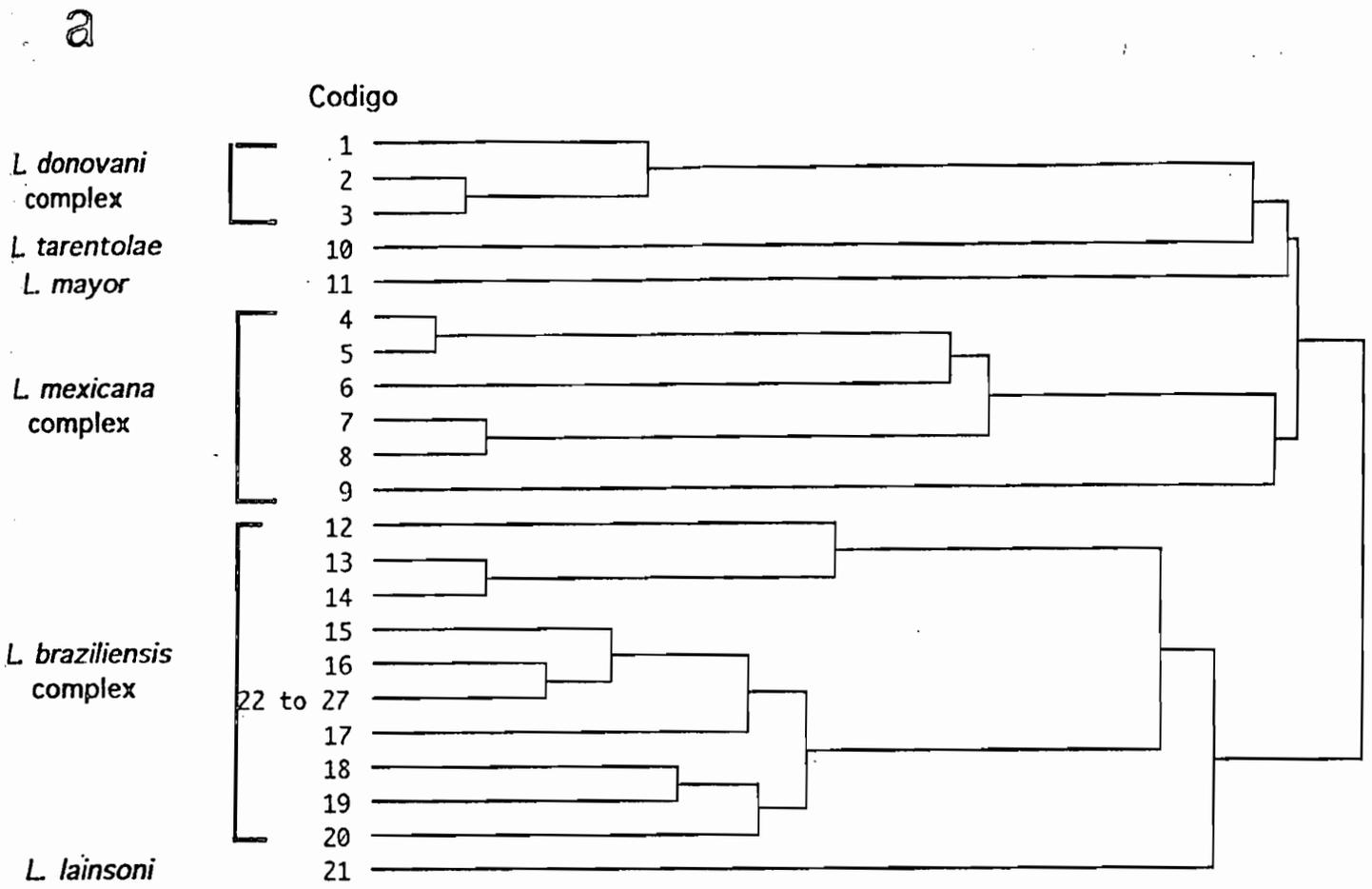


Fig. 6 a. Dendrograma isoenzimático - Distancias de Jaccard Guerrini  
 b. Dendrograma PCR-kDNA - Distancias de Jaccard (1993)

#### 1.4. ANALISIS FENOTIPICO

A partir de la numeración de las bandas se estableció el número de bandas comunes entre cada par de cepas. Luego se calculó las distancias fenéticas de Jaccard. La matriz de distancias se presenta en la tabla 1.

A partir de la matriz de distancias se construyó por aglomeración jerárquica UPGMA un dendrograma presentado en la figura 6 b.

La topología general del dendrograma confirma la alta variabilidad de los perfiles de amplificación entre cepas analizadas pero aglomera las cepas según complejos.

#### 1.5. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DOS MARCADORES GENETICOS

La matriz de distancias y el dendrograma obtenido del análisis fenotípico realizado por Guerrini (1993) están presentados en la tabla 2 y la figura 6a.

Las cepas pertenecientes a cada complejo están netamente aglomeradas en grupos distintos. Además, Las cepas del complejo *L. braziliensis* son separadas en dos grupos correspondientes a las especies *L. guyanensis* y *L. panamensis* de un lado y a las especies *L. braziliensis* y *L. peruviana* por otro lado.

Comparando ambos dendrogramas se observa en general distancias mayores entre las cepas dentro de cada complejo en el dendrograma obtenido mediante PCR-kDNA, a excepción de las cepas 17 y 25 ambas pertenecientes al complejo brasiliensis, muestran una distancia mucho menor en el dendrograma PCR-kDNA en relación al dendrograma isoenzimático.

La figura 7 muestra la diferencia en distancias dentro de cada complejo en ambos dendrogramas, observándose así mayor variabilidad entre las cepas con el marcador genético PCR-kADN.

COMPLEJO	PCR kADN	ISOENZIMAS
Donovani	0.127	0.085
Mexicana	0.24	0.16
Brasiliensis	0.30	0.24

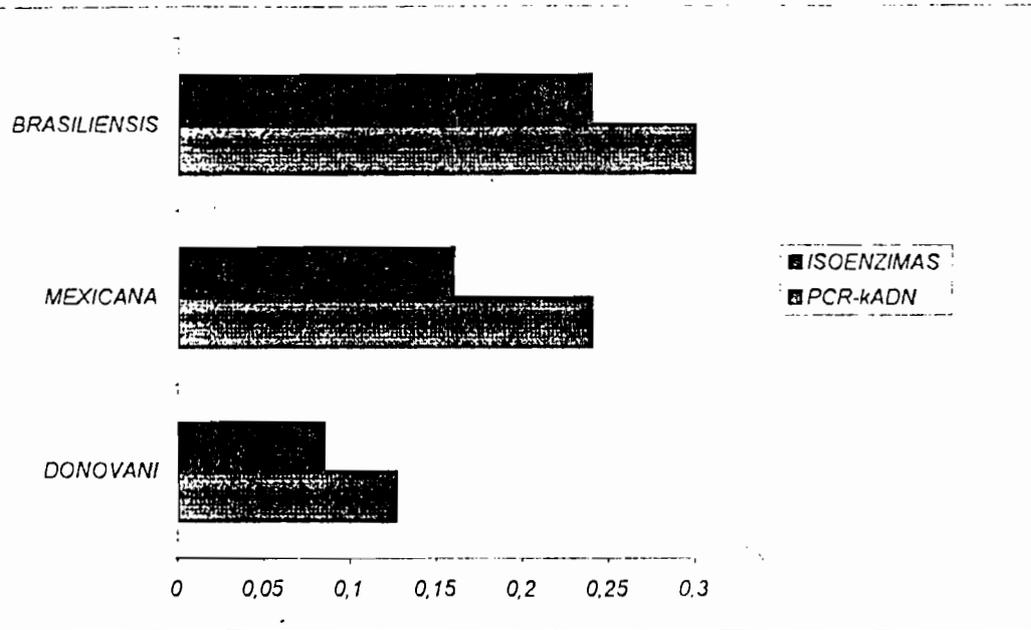


Figura 7 Grafico de distancias con dos diferentes marcadores genéticos dentro de cada complejo.

## 2. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LEISHMANIA AUTOCTONAS

### 2.1. PRUEBA DE INHIBICION DE LA PCR SOBRE MUESTRAS BIOLÓGICAS SANGRE Y TEJIDOS

En sangre se obtuvo la amplificación de hasta 100fg, constatándose la ausencia de inhibidores en la amplificación. Considerando que 1 parásito contiene alrededor de 150 fg de DNA, la prueba de PCR permite detectar en las muestras de sangre la presencia de un parásito.



Figura.8 : Sensibilidad de cebadores L1 y L2 en sangre: 1(10ng); 2(1ng); 3(100pg); 4(10pg);5(1pg); 6(100fg); 7 (10 fg), 8(testigo positivo).

En tejidos se observó una PCR positiva solamente con la adición de cantidades iguales o superiores a 1 ng de DNA de *Leishmania*. Se considera que el límite de sensibilidad es muy bajo para ser aplicado sobre muestras de tejido de animales capturados.

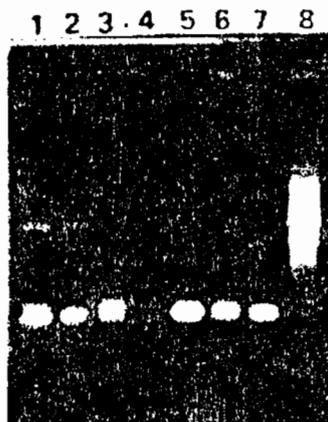


Figura. 9: Sensibilidad de cebadores L1 y L2 en tejidos: 1(10ng); 2(1ng); 3(100pg); 4(10pg); 5(1pg); 6(100fg); 7 (10 fg); 8(testigo positivo).

Esta sensibilidad es limitativa, solamente miles de parásitos pueden ser detectados en estas condiciones. La aplicación de la PCR a la búsqueda de reservorios a partir de tejidos conservados en guanidina no es actualmente posible.

## 2.2. OBTENCION DE PRODUCTOS DE PCR E HIBRIDACION

### 2.2.1. DE SANGRE DE ANIMALES

En la localidad de Yucumo se capturó 25 animales. Las muestras de sangre de cada animal fue procesada en duplicado. Todas las muestras fueron PCR negativas mientras los controles positivos y negativos fueron correctos. Después de la transferencia de las muestras PCR y su hibridación con las 3 sondas específicas de complejo se confirmó la negatividad de estas muestras fig. (10).

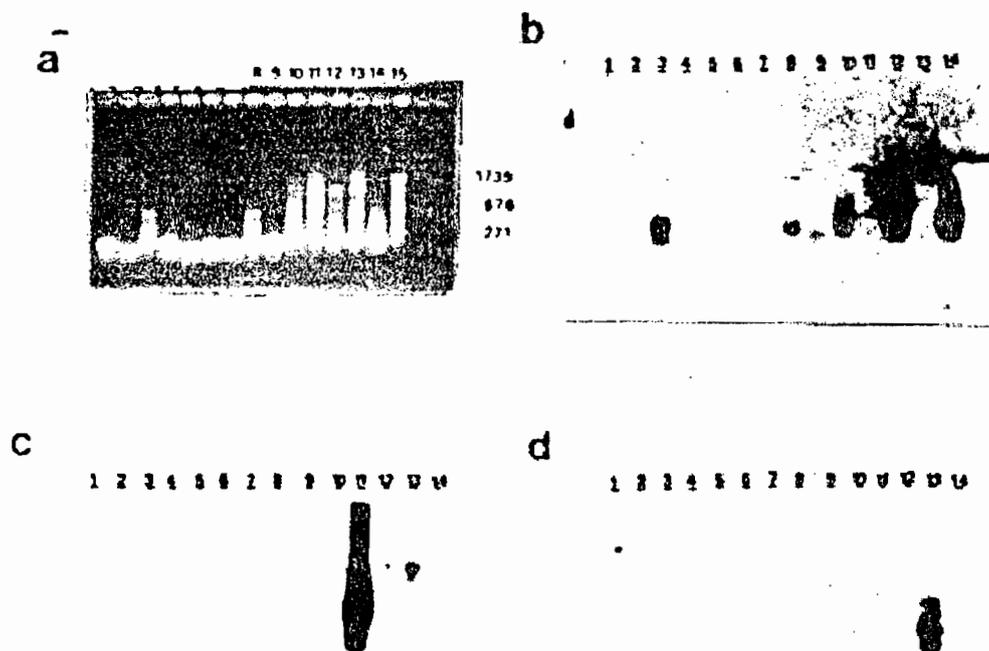


Figura 10 a): Técnica de PCR sobre animales capturados en Yucumo, incluye la muestra 1948 (*Conepatus chinga rex*); 3-8 (testigos positivos de extracción); 9 (testigo negativo) 10(1948); 11(EL *L. brasiliensis*); 12( M379 *L. mexicana*); 13 (L101 *L. chagasi*); 14 (LV135 *L. pifanoi*)  
 b): hibridación con sonda mexicana: 3-8(testigo positivo); 10(1948); 9(agua); 12(M379;13(L101); 14(LV135).  
 c): hibridación con sonda brasiliensis.  
 d): hibridación con sonda donovani

Previamente en Cajuata fueron capturados 42 animales: 12 *Didelphis marsupialis*, 2 *Micoureus cf. Cinerea*, 14 *Akadon spp.*, 2 *Olygorizomys spp.*, 1 *Oryzomys spp.*, 2 *Rhipidomys cf. leucodactylus* 2 *Conepatus chinga rex* y 1 *Histiotus velatus*.  
 (fig. 11).

El 35% fue positivo a la técnica de PCR y solamente 4 muestras fueron reconocidas por la sonda del complejo *L.mexicana*:(fig.11b) 1 *Akadon spp.*, 2 *Olygorizomys spp.* y 1 *Conepatus chinga rex* .

Adicionalmente hemos realizado la hibridación de todos los productos de amplificación con una sonda conteniendo el producto PCR de una cepa aislada de paciente de Cajuata previamente caracterizada como *Leishmania amazonensis*

(Martinez E. *et al.* submitted ). Esta sonda solo reconoció 3 de los 4 productos PCR previamente reconocidos por la sonda *L. mexicana* (a excepción de *Conepatus chinga rex*) (fig. 12b).

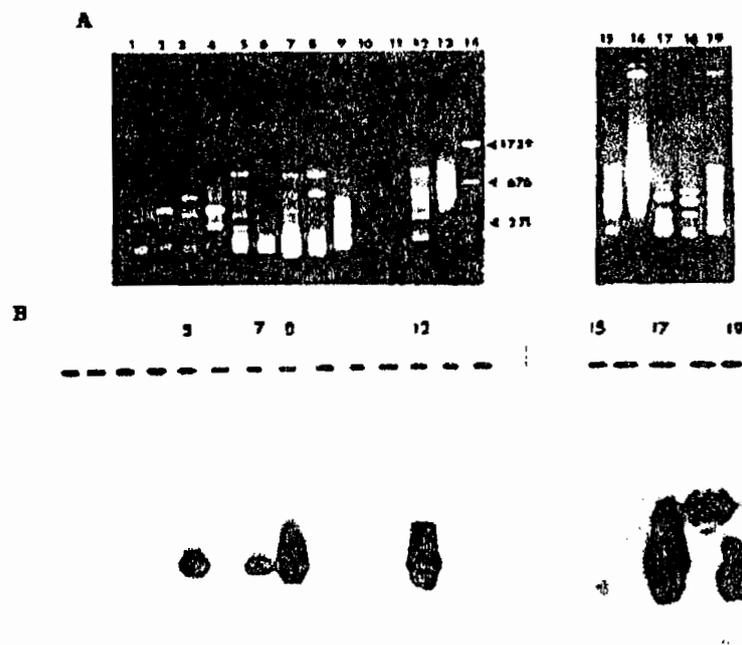


Figura 11 a): Amplificación de reservorios de Cajuata, gel de agarosa al 1,5%: 5(1959 *Olygoryzomys sp.*); 6(1948 *Conepatus chinga rex*); 7 (1961 *Akadon sp.*); 8(1953 *Olygoryzomys sp.*);9 (*cepa paraguaya*) 10(agua); 11(L 101); 12, 17, 19(M379);13 (CG); 14(Puc 19/Ras I). b): Hibridación con sonda *L. mexicana*.

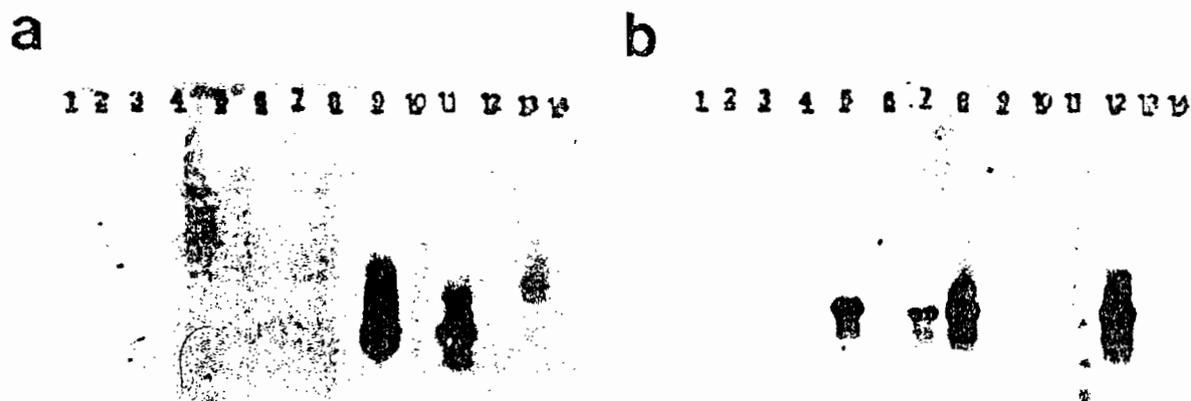


Figura 12 a):. Hibridación reservorios de Cajuata con sonda *L. chagasi*: 9(MOR5 cepa paraguaya); 11(L101). b: con sonda de paciente C16 (*L. amazonensis*)

### **2.2.2. CEPAS AISLADAS DE PACIENTES**

Se aisló cepas de lesiones activas de 6 pacientes de Cajuata (provincia Inquisivi), 1 paciente de Carrasco (provincia Caranavi) y 1 paciente de Rio La Paz del Departamento de La Paz.

Para cada cepa se obtuvo productos de PCR. Después de la transferencia de estos productos a membranas se observó una hibridación solamente con la sonda específica del complejo *L. mexicana* (figura 13).

### **2.3. CEPAS AISLADAS DE VECTORES**

Fue aislado previamente por un grupo de investigadores del IBBA 3 cepas de vectores pertenecientes a la especie *Lutzomyia nuñeztovari anglesi* cuya captura se hizo en Cajuata. Estas cepas fueron tipificadas por isoenzimas y caracterizadas como perteneciente a la especie *L. amazonensis*.

Los productos de PCR de cada extracción de DNA de estas cepas presentaron perfiles similares y la hibridación de uno de estos productos (CJA) confirmó la pertenencia de esta cepa al complejo *L. mexicana* (hibridación positiva solamente con la sonda *L. mexicana*) (figura 13).

### **2.2.4. SANGRE DE PACIENTES**

La muestra de sangre de un paciente de Cajuata (CJ28) fue amplificada por PCR. Un perfil de bandas se observó y el producto de amplificación fue reconocido solamente por la sonda específica del complejo *L. mexicana* (figura 13).

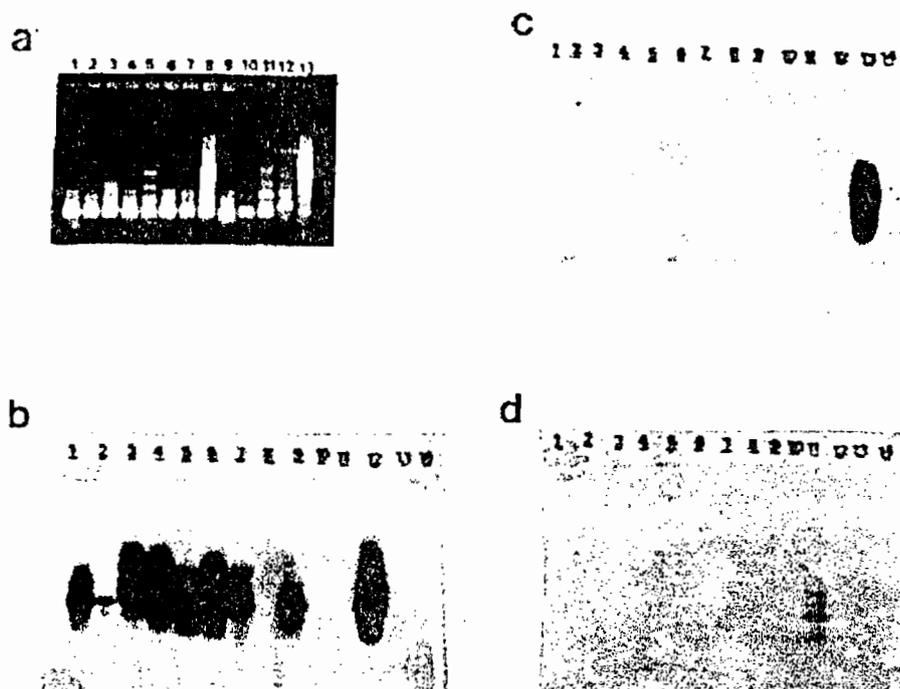


Figura 13 a):gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio: 1(CJ5); 2(CJ10); 3(CJ10); 4(EQZ); 5(CJ28); 6(CJ27); 7(CJA); 8(MR); 9(EN); 10( agua); 11(L101); 12(M379); 13(CG); 14(Puc 19/RSA I).

b):Hibridación southern blot sobre cepas de Cajuata con sonda *L. mexicana*

c): hibridación con sonda *brasiliensis*

d): Hibridación con sonda *donovani*

### 2.3. ANALISIS DEL POLIMORFISMO DE LOS PRODUCTOS PCR POR ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

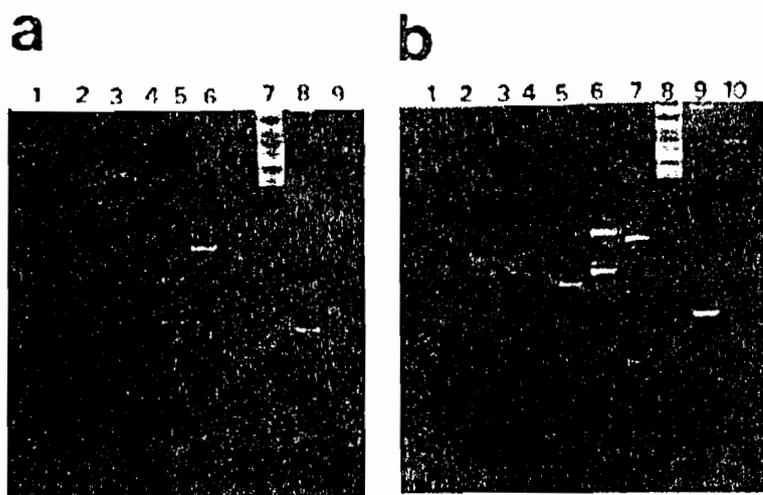


Fig.14 a: Electroforesis en gel de acrilamida de productos de PCR cepas: 1 (CJ A); 2 (EN); 3 (CJ18); 4 (EQZ); 5 (CB); 6 (M379) 8 (JM); 9(PP75) 10 (Puc 19 marcador molecular); b: 1 CJ10); 2 (CJ5); 3 (CJ11); 4 (CJ27); 5 (CJ28); 6 (1948); 7 (M379); 8 (JM); 9(PP75) 10 (Puc 19/Ras I marcador molecular)

Los perfiles de las *Leishmania* autóctonas son muy similares, solamente difiere el perfil de *Conepatus chinga rex*.

Mediante los esquemas de los perfiles (figura 15) se estableció el número de bandas comunes entre muestras de dos en dos, incluyendo las cepas de referencia, datos con los que se construyó una matriz de distancias de Jaccard.

La matriz de distancias fue visualizada por clasificación jerárquica ascendente (UPGMA) en un dendrograma (Figura 16).

El Dendrograma basado en las distancias de Jaccard confirma que las cepas de referencias pertenecientes a diferentes complejos son muy alejadas entre ellas. Todas las muestras autóctonas al excepción de la (1948) del zorrino, presentan distancias menores y se aglomeran en un grupo bien individualizado. Este grupo y la muestra del zorrino son más relacionados a la cepa de *Leishmania amazonensis*

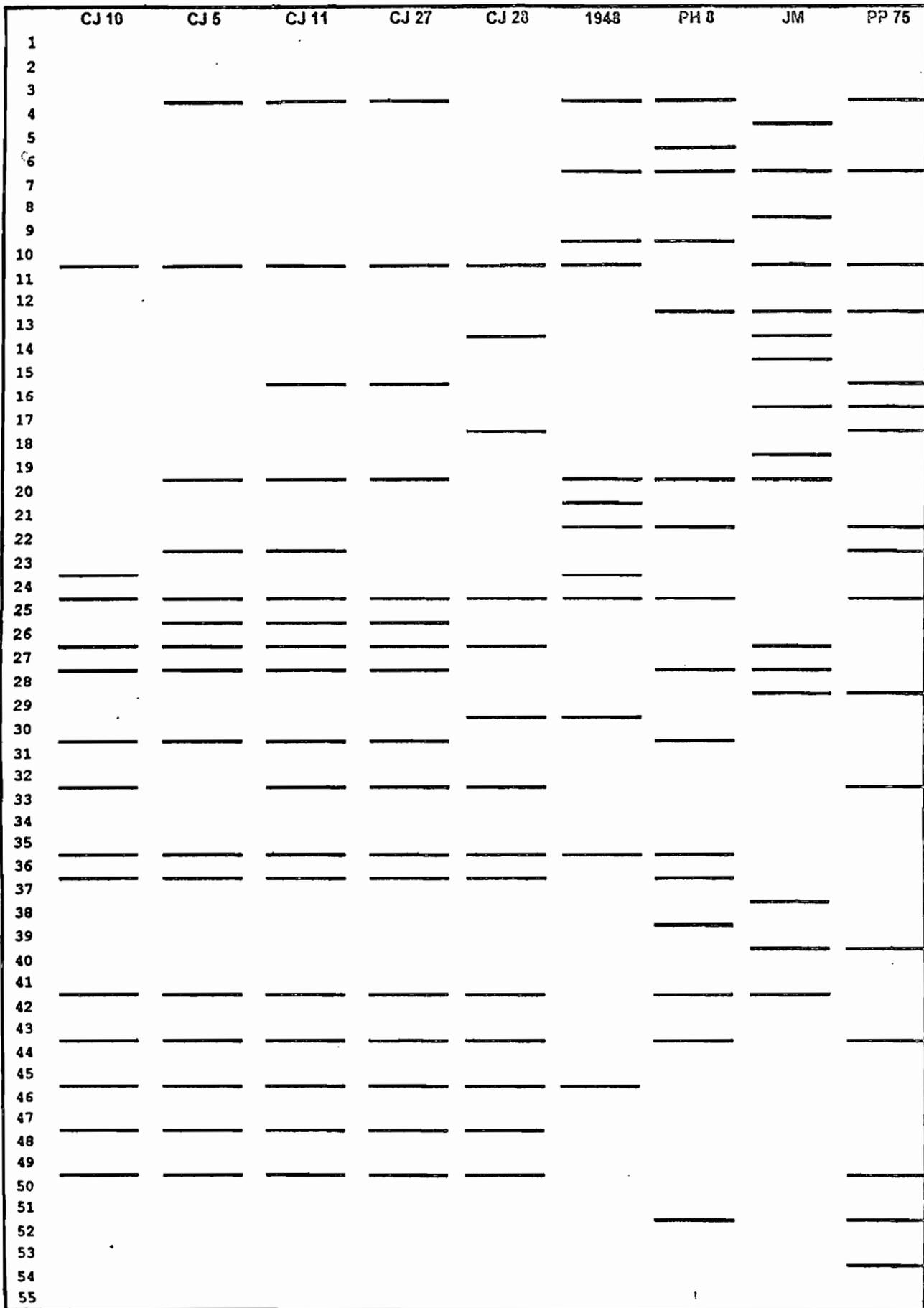


Figura 15: Esquema de perfiles presentados por cepas autóctonas en gel de acrilamida.

# Caracterización por PCR-kDNA

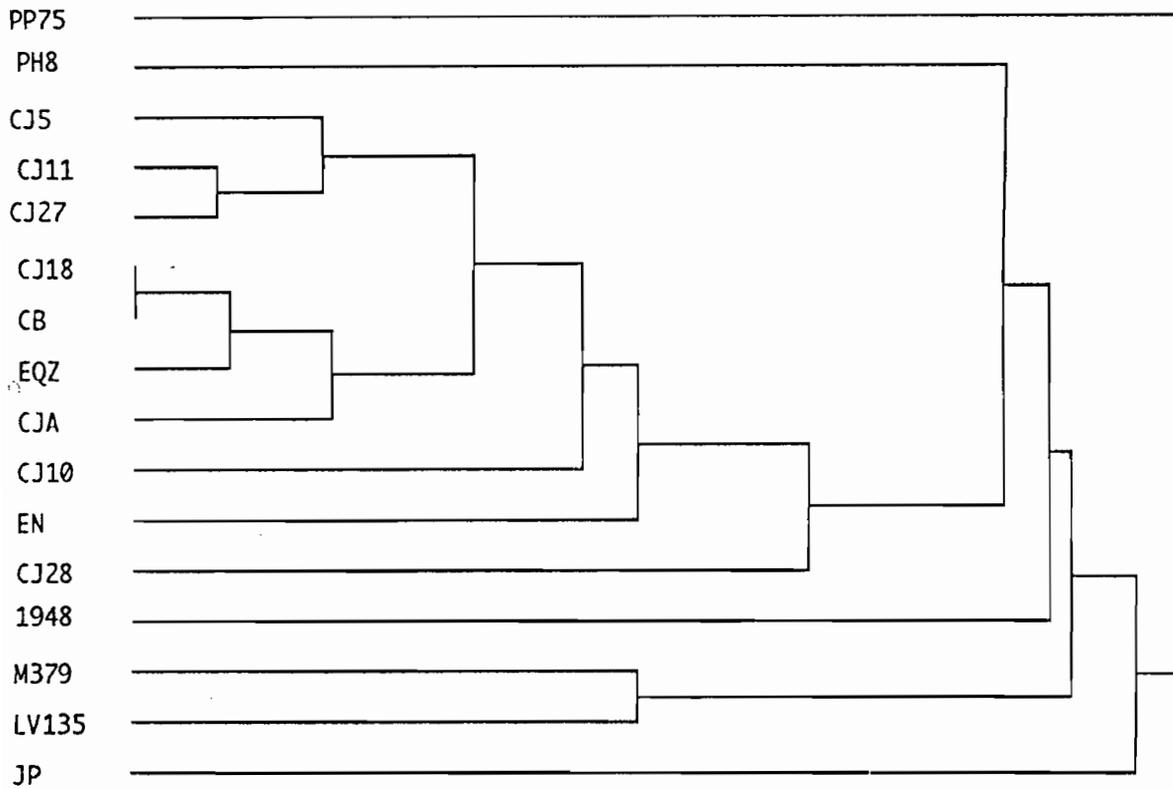


Fig. 16 Dendrograma construido a partir de distancias de Jaccard del panel de muestras amplificadas

(PH8) que a las otras cepas de referencia pero el polimorfismo es tan elevado que la jerarquización es de interpretación delicada.

#### **2.4. ESTUDIO COMPARATIVO CON EL ANALISIS ISOENZIMATICO DE LAS CEPAS AUTOCTONAS.**

Las cepas aisladas y cultivadas fueron caracterizadas también por isoenzimas (8 loci) usando como patrones cepas de referencia pertenecientes a diferentes complejos: MHOM/BR/74/Pp75 *L. chagasi* MNYC/VE/62/M379 *L. mexicana*; MHOM/BR/75/M2903. *L. braziliensis* MHOM/VE/57/LV135 *L. pifanoi*; IFLA/BR/67/pH8 *L. amazonensis*.

Dos matrices de distancias fueron establecidas.

Dos dendrogramas correspondientes a estas matrices fueron construidos por jerarquía ascendente.

El dendrograma que visualiza las distancias de Jaccard (fig.17) muestra que las cepas de referencia de *L. chagasi* y *L. braziliensis* son muy distantes entre ellas y de las otras cepas.

Las cepas autóctonas son aglomeradas juntas en un grupo que incluye la cepa *L. amazonensis*. Este grupo se distingue de las cepas *L. mexicana* y *L. pifanoi*. La variabilidad isoenzimática de las cepas autóctonas es menor que la del kDNA-PCR, varias cepas de Cajuata presentan el mismo genotipo.

Las cepas *L. chagasi* y *L. braziliensis* no comparten ningún alelo en común con algunas otras cepas y por consecuencias las distancias de Nei son infinitas. Consecuentemente, para la construcción del dendrograma a partir de la matriz de Nei solamente se tomo las cepas de referencia pertenecientes al complejo *L. mexicana*. El dendrograma (fig.18) confirma que las cepas autóctonas son netamente relacionadas a *L. amazonensis* diferenciándose de las cepas *L. mexicana* y *L. pifanoi*. La jerarquía de las cepas autóctonas es ligeramente diferente entre los dos dendrogramas, pero la aglomeración de los genotipo 1 (Cj5; Cj10; Cj11; Cj A; Cj28) y, 2 (Cj27; Cj18), en un sub-grupo es conservada en los dos análisis.

# Cepas autoctonas

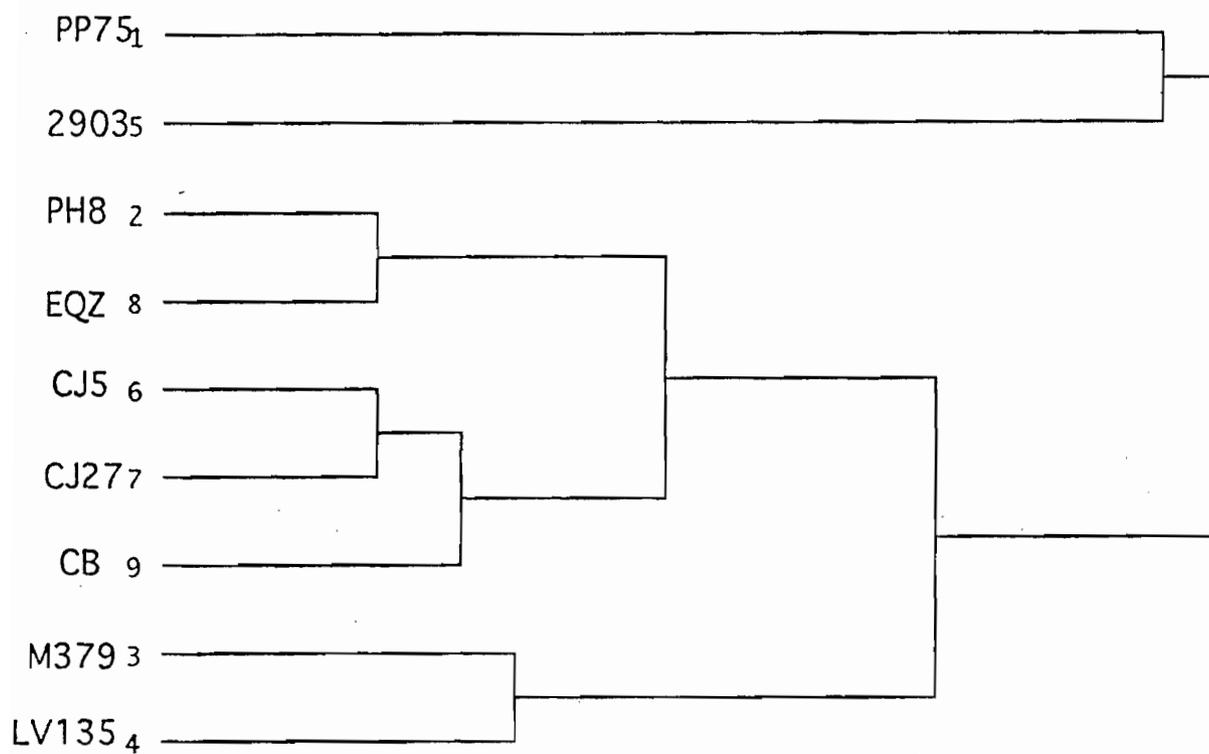


Fig. 17 Dendrograma isoenzimático - distancias de Jaccard

# CEPAS AUTOCTONAS

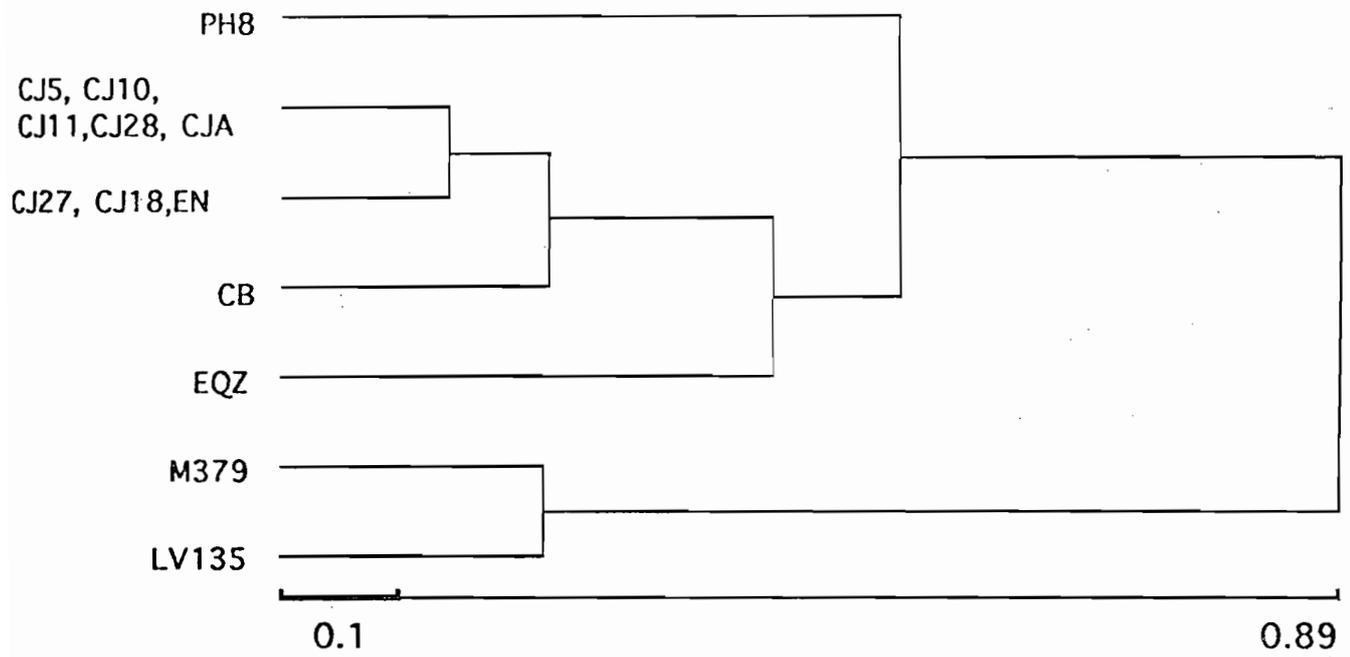


FIG. 18 Dendrograma isoenzimático de cepas autoctonas-distancias de Nei

## CONCLUSIONES

- El polimorfismo de partes variables de los minicírculos del kDNA se interpreta como una impresión digital de cada cepa, logrando una identificación muy fina de los genotipos.
- El polimorfismo kDNA-PCR es un marcador genético capaz de discriminar hasta especies de *Leishmania*.
- Las cepas autóctonas provenientes de la zona de Cajuata pertenecen al complejo *mexicana* y a la especie *Leishmania amazonensis*.
- Los reservorios mas probables de *Leishmania amazonensis* identificados en la zona de Cajuata son: *Akadon spp.* y *Olygoryzomis spp.*

## DISCUSION

### **1. El ADN de kinetoplasto blanco ideal para un diagnóstico parasitario por PCR**

La sensibilidad que hemos obtenido en muestras de sangre es bastante alta (100 fg), se puede detectar algunos parásitos y coincide con muchos trabajos realizados con cebadores que amplifican sobre kDNA de minicírculos (Barker et al, 1992; de Bruijn and Barker, 1992; 1993).

El DNA de kinetoplasto de los minicírculos de los Kinetoplastidae es muy útil como blanco de la PCR, debido al número de minicírculos que se encuentran, aproximadamente  $5 \cdot 10^3 - 10^4$  obteniéndose sensibilidad elevada.

Para explicar el polimorfismo que dan los cebadores utilizados, hemos hecho una búsqueda sistemática de las homologías entre los cebadores utilizados y las secuencias conocidas de todos los kinetoplastidae. Las secuencias de los cebadores solo comparten homologías con secuencias de minicírculos de cepas del complejo brasiliensis, no encontrándose en otros Kinetoplastidae.

No tenemos certeza que los productos de amplificación sean para los otros kinetoplastidae productos de minicírculos, pero el número de secuencias conocidas es reducido y la amplificación podría deberse a la presencia de secuencias homólogas pertenecientes a minicírculos poco frecuentes en estas cepas y no secuenciadas hasta ahora. Por otra parte estos cebadores no amplifican DNA de los huéspedes y serían específicos de kinetoplastidae.

### **2. Interés del polimorfismo kDNA-PCR**

El polimorfismo de los productos de la prueba kDNA-PCR en cepas de referencia fue representado en un dendrograma. El dendrograma individualiza claramente a cada cepa, la variabilidad es extensa y cepas que pertenecen a un mismo zimodema se distinguen. El polimorfismo kDNA-PCR observado se puede interpretar como una impresión digital de cada cepa (finger printing). Esta capacidad de discriminación es reportada por otros investigadores para cebadores que amplifican sobre DNA de Kinetoplasto (Rodríguez *et al*, 1994, de Bruijn and

Barker 1992, 1993).

Otros marcadores genéticos sin embargo, generalmente usando cebadores sobre DNA nuclear reportan que no distinguen especies dentro del complejo, las secuencias de espaciadores intergénicos ribosomales (da Silveira *et al*, 1992), Van Eys *et al*, (1991) mediante polimorfismo de fragmentos de restricción no discrimina hasta especie.

De esta manera la interpretación genética tipo kDNA-PCR permite una identificación muy fina de los genotipo.

El análisis depende de las clases de secuencias de los minicírculos del kDNA, definidos por las secuencias de la región variable dentro de una sola red, y de los rápidos cambios de las secuencias del minicírculo que nos da una mayor diferencia entre las cepas.

El análisis comparativo de los dendrogramas obtenidos a partir de los datos isoenzimáticos y kDNA-PCR muestran distancias genéticas mayores entre las cepas de referencia con el marcador kDNA-PCR, existiendo mas variabilidad, pero respeta las aglomeraciones de las cepas en distintos complejos como el análisis isoenzimático Comparando también dos marcadores genéticos Tibayrenc *et al*, (1993) RAPD y MLEE reportó distancias muy similares entre ambos marcadores, observando aglomeración idéntica.

Esta mayor variabilidad que reportamos es probablemente debido al alto rango en los cambios y rearrreglos dentro de las regiones variables de los minicírculos.

### **3. Aplicación a la búsqueda de reservorios**

Hemos encontrado infectados con *Leishmania amazonensis* los mamíferos: un *Akodon spp.* y dos *Olygorizomys spp.*, coincide con estudios realizados por Lainson y Shaw (1973; 1979) y Lainson *et al*, (1981) donde afirman que roedores son los huéspedes mayores de este parásito.

Sin embargo, otros investigadores han encontrado diversas especies de animales infectados con *L. amazonensis* entre los que además de roedores hay

animales infectados con *L. amazonensis* entre los que además de roedores hay marsupiales y animales carnívoros, pero muchos se consideran reservorios accidentales (Arias y Naiff, 1981; Tikasing, 1975, Lainson y Shaw, 1978).

*Akadon spp.* y *Olygoryzomys spp.* cumplen con la mayoría de los criterios propuestos por la OMS para afirmar que un determinado mamífero es un reservorio, este tipo de roedores son abundantes en los huertos del área estudiada y están en intenso contacto con los flebótomos cuyo hábitat son los huertos y plantaciones de cafetales. Además representan el 56% y el 32% respectivamente de los roedores capturados en la localidad de Cajuata, de los cuales el 7% y el 25% resultaron infectados.

## PERSPECTIVAS

El marcador genético kDNA-PCR puede ser utilizado para identificar, vectores , reservorios, caracterizar cepas y aplicar directamente sobre muestras biológicas en otras regiones del País.

Actualmente en el Instituto Boliviano de Biología de Altura este trabajo tiene una continuidad en el proyecto "Epidemiología de la leishmaniasis" y en la búsqueda del reservorio de *Leishmania brasiliensis*.

Es necesario seguir un estudio exhaustivo para establecer las especies de flagelados circulantes en Cajuata que no fueron identificados por las sondas de los complejos de *Leishmania*.

Para establecer exactamente los lugares donde se alinean los cebadores de kDNA-PCR para dar un polimorfismo, es necesario realizar secuenciación de partes variables de los minicírculos en cepas de *Leishmania* pertenecientes a diferentes complejos.

## BIBLIOGRAFIA

Adler S y Theodor O 1927. The comportedment of cultures of *Leishmania s.p.* in the *Phlebotomus papatasi*. *Ann. trop. Med. Hyg.* vol.21, p.111-134.

Adler S y Theodor O, 1931. Investigations on Mediterranean Kala-azar. Infections of sandflies with *Leishmania infantum* Natural parasites of wild sandflies in Catania. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* vol. 108, p.481-483.

Arévalo J, Inga R, López M. PCR detection of *Leishmania braziliensis*.

Arias JR, Naiff RD, 1981. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 76, 279-286.

Arias JR, 1988. The present status of Leishmaniasis in Panamá. In: *Research on control strategies for the Leishmaniasis. Ottawa, Canada, IDRC*, vol.184, p. 128-134.

Arias JR, Freitas RA, Naiff ED, Barret TV, 1987. Observations on the parasite *Leishmania mexicana amazonensis* and natural infection on the sandflie *Lutzomyia olmeca nociva*. *Bull. Pan. Am. Health Organ* vol.vol. 21; p.48-54.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, 1985. Flagellate infections of Brazilian sandflies (Diptera :Psychodidae); isolation in vitro and Biochemical identification of *Endotripanum* and *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* vol. 34,p. 1098- 1108.

Arias JR, Naiff RD, 1981. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus; Central amazon of Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76, p. 279-286.

Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA, 1981. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupiala: Didelphidae) as a reservoir host of *Leishmania brasiliensis guyanensis* in the amazon Basin; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, p. 537-541.

Barker DC, Smyth AJ, Hassan Q, de Bruijn MHL, Adhya S, Mallik KK, 1991. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of Kala-azar patients

Barreto Cur C *et al.* 1985. *Leishmania mexicana* in *Proechimys iheringi*; *Denigratus moojen* (Rodentia Echimyidae) in a region endemic for América cutaneous leishmaniasis *Revista do Sociedade Brasileira de Medicina trópica* 18.

Biagi AM de B, Biagi FF, Melinari JL, 1965. Kala-azar en México Antropofilia y actividad horaria de *Phlebotomus longipalpis* Lutz y Neiva. *Rev.Inst. Salud. Enferm. Trop. (Mex.)* vol.25, p.13-19.

Biagi FF, Lopez R, Biagi A M de B, 1965. El kala-azar en México; problema ecológico por estudiar. *Rev. Ins. Salub. Enferm. trop. (Mex.)* vol. 25, p. 3-12.

Blanck C, Fuchs H, Rappersberger K ., 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cell in experimental cutaneous leishmaniasis. *J. Inf. Dis.* 167.

Borowsky PF., 1898. To the etiology of the Sertov's Protocols Pirogov Memorial Russian Surgical Society for St. Ptersburg.

Borst P, van der Ploeg M, van Hock J, Tas J, James J, 1982. On the ADN content and ploidy of Trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* vol. 6, p. 13-23.

Bowman JBR y Flynn IW., 1976. Oxidative Metabolism of trypanosomes. In: Biology of Kinetoplastida (W.H. R., Lumsden, D.A. Evans eds.) *Academic Press, London-New York* vol.1, p.436-476.

Bowman IBR, Tobie EJ, Von Brand T, 1978. CO<sub>2</sub> fixation studies with the culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 9, p. 105-114.

Bryce C, Walton, 1987. American Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis *The ,leishmaniasis* vol.2.

Bryceson ADM y Olliaro PL, 1993. Practical progress and new drugs changing patterns of Leishmaniasis. *Parasitology Today*; Vol 9.

Brucker G., 1989 Las Leishmaniasis en América Latina. *La Fondation Rhone Poulenc Santé* p. 8-30.

Chance ML, 1972. DNA-base composition differences between species of *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* vol. 66,p.352.

Da Silva R y Sacks DL, 1987. Metaciclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect immun* vol.55, 2802-6.

da Silveira JF, Guevara P, Alonso G, Mello M, Scorza JV, Añez N, Ramírez JL, 1992. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 56: 15-26.

De Bruijn MHL and Barker DC , 1992. Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania brasiliensis* complex by amplification of kinetoplast ADN, *Acta Trópica*, vol.52,p. 45-58.

De Bruijn MHL, Barker DC, Labrada LA, Amyth AJ, Santrich C, 1993. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected Leishmaniasis. *Trop. Med. Parasitol.* vol. 44,p. 201-207.

Deane M, Sousa M, Pereira N, Goncalves A, Momen H, Morel C, 1984. *Trypanosoma cruzi*; Inoculation schedules and reisolation methods select individual strains from double infected mice as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J. Protozool* 31.

Decker-Jackson JE, Schrot JR, Levin GV, 1977. Identification of *Leishmania s.p.* by radio respirometry. *J. Protozool.* vol. 24,p. 463-470.

Dedet JP, 1986. Leishmanioses, *Encyclopedie Médico-Chirurgicale* (Paris) 4, 8094 A10.

Dedet JP *et al.* 1989. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

Dedet JP *et al.* 1985. Natural hosts of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson and Shaw 1972 (Kinetoplastida Trypanosomatidae) in French Guiana *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*

Dedet JP. *et al.* 1993. Electrocardiografic alterations during treatment of mucocutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate and allopurinol *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

Dedet JP, David C, Dimier-David L., Vargas F, Torrez M , 1993. Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 87, p. 7-9.

Dedet JP, Dimier L, David C, Muñoz M, Vargas F, Bustillos R, Valda L , 1991. Clinical Biological and Epidemiological Features of mucocutaneous Leishmaniasis in Bolivia, according to a 221 patient sample. *Bull. Soc. Path.* vol.86, p. 106-111.

Dedet JP, Dimier-David L, Inofuentes A, Carrasco M, David C, Vargas F, Revollo S, 1991. Nouveau cas autochtone de Leishmaniose Vicerale en Bolivie. *ANN. Soc. beige Med. Trop.* vol. 17, p. 275-278.

Dedet JP, Pradinaud R, Desjeux P *et al.* 1985. Deux premiers cas de leishmaniose cutanéé a *Leishmania mexicana amazonensis* en Guyanne Française *Bull. Soc. Pathol. Exot;* 78, p. 64-70

De Muyneck A, Orellana H, Ribera B, Melgar B, Lagrava MS, 1978. Estudio epidemiológico y clínico de la leishmaniasis mucocutánea en Yapacani (Oriente Boliviano). *Bol. Inform. CENETROP* 4, p.155-167.

Desjeux P, 1974. Leishmaniose cutanéé et cutanéé-muqueuse. Etude de 113 cas observés en Bolivie. *Thèse doctorat de médecine Paris* p.132

Desjeux P, Aranda E, Aliaga O, Mollinedo S , 1983 Human visceral Leishmaniasis in Bolivia: first proven autochthonous case from "Los Yungas". *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* Vol. 77 No 6, p. 851-852.

Donovan C, 1903. On the possibility of the occurrence of the trypanosomiasis. *Inde Bull. Soc.Path. exot.* vol. 22, p. 252-253.

Dossier , 1990. Las aplicaciones de la PCR, *Mundo científico* No. 132 Vol. 13, p.173-185.

Englund PT, Ferguson M, Guilbride DL ., 1995. The replication of kinetoplast ADN. In Boothroyd J C, Komuniecki R, eds. *Molecular Approaches to Parasitology, MBL Lectures in Biology*. New York: Wiley-Liss 147.

Evans AT y Croft SL, 1987. Antileishmanial activity of harmaline and other derivatives *Phytother Res* 1, p. 25-27.

Fournet A *et al.*, 1995. Combattre la leishmaniose *La Recherche* abril.

Fournet A, Muñoz V, Manjon A, Angelo M, Hockemiller R, Cortes D, Cave A, Bruneton J, 1988. Active antiparasitaire alcaloides bisbenzylisoquinoléiques I: active in vitro sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*. *J. Ethnofarm* 24, p. 327- 335.

Frasch A, Gojman S, Cazzulo J, Stepani A 1981. Constant and variable regions in ADN minicicles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*; Applications to species and Stocks differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4

Gardener PJ, 1977. Taxonomic of the genus *Leishmania*. A review of nomenclature and classification. *Trop. Dis. Bull* vol.74, p. 1069-1088.

Garnham PCC, 1965. The leishmaniasis, with special reference to the role on animal reservoir. *Amm. Zool* vol. 5, p. 141-145.

Guerrini F, 1993. Génétique des populations et phylogénie des *Leishmania* du Nouveau Monde. Thesis Doctoral, Université Montpellier, Francia.

Hennig W, 1965. Phylogenetic systemic *Ann Rev. Entom.* vol 10, p. 97-116

Hertig M y Mc Connell E, 1963. Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* vol 14, p. 92-106.

Hooman Momen *et al.*, 1987. Human Canine and Equine leishmaniasis caused by *Leishmania brasiliensis brasiliensis* an endemic Area in the state of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro Vol 82 .

Hommel M, 1978. The genus *Leishmania*: biology of the parasites and clinical aspects. *Bull Inst Pasteur* vol. 75, p.5-102.

Janovi J, Lee KW y Brumbhaug JA, 1974. The differentiation of *Herpetomonas megaseliae* ultrastructural observation. *J. Protozool* 21.

Kilgoar V y Godfrey DG, 1973. Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes. *Nature New Biology* vol.244, p. 69-70.

Lainson R y Shaw JJ, 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In : Peters W, Killick-Kendric R. eds. The Leishmaniasis in *Biology and Medicine; London Academic Press*, p.1-120

Lainson R y Shaw JJ, 1972. Leishmaniasis in the New World: Taxonomic Problems. *BR. Med. Bull* vol.28, p, 4-8.

Lainson R, y Shaw JJ, 1973. *Leishmania* and leishmaniasis in the New World, with particular reference to Brazil. Bulletin of the Panamerican Health Organization 7, 1-19.

Lainson R y Shaw JJ, 1972. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *Brit. med. Bull.* vol. 28, p.44-48.

Lainson R y Shaw JJ, 1979. The role animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis, In *Biology in the Kinetoplastida*. (Lumnden W.H.R., Evans D.A., eds.) Academic Press. London/ New York/ San Francisco vol2,p. 1-116.

Lainson R, y Shaw JJ, 1982. Leishmaniasis in Brasil: XVII Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of the tropical Medicine and Hygiene* Vol. 76.

Lainson R. y Shaw JJ, 1981. Leishmaniasis in Brasil XVI Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammal, and man in North Par  State with particular reference to *L. brasiliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois"; *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higyene*

Lanotte G y Rioux JA, 1990. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Comptes Rendus de l Académie des Sciences*, Paris 310, p. 285-288.

Leishman WB., 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *B. Med.J.* vol.1,p. 79.

Le Pont F, Desjeux ,De Mollinedo S, Mu oz M, Hervas D, Yaksic N, Torres M, 1992. Leishmaniasis Visceral y Tegumentaria en ni os de dos zonas endémicas de Bolivia. *Parasitol. al D a* vol.16, p. 117-120..

Lopes UG, Momen H, Grimaldi GJR, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM, 1984. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous Leishmaniasis. *J. Parasitol.* vol 70,p. 89-98.

Lopes M, Montoya Y. Arana M, Cruzalegui F, Braga J, Llanos-Cuentas A, Romero G, Arevalo J, 1988. The use of nonradiative ADN probes for the characterization of *Leishmania* isolates from Peru *Am. J. trop. Med. Hyg.* vol. 38,p. 308-314.

Lumsden WHR, 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* vol. 68, p. 74-75.

Llanos-Cuentas EA, 1984. Estudio clínico evolutivo da leishmaniose em área endêmica de *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. Tres Bracos, Bahia Tese Fac. *Ciencia de Saude*, Brasilia 166.

Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF, 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2da. Ed.

Mauel J, 1990. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *J. Leuk. Biol.* vol.47, p. 187-192.

Mayrink W, 1995. Situação Atual Do desenvolvimento contra las leishmanioses: A experiencia do grupo mineiro.

Marsden PD, 1985. Clinical presentation of *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. *Parasitology Today* vol.1, p.129-133.

Marsden PD, 1986. Mucosal Leishmaniasis ("espundia"; Escomel 1911) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* vol.80, p. 859-876.

Mathis A and Deplazes P. 1995. PCR and In vitro Cultivation for Detection of *Leishmania* spp in Diagnostic Samples from Humans and Dogs *Journal of Clinical Microbiology*, p 1145-1149.

Mayrink W, 1979. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, p. 385-387.

Mayrink W, 1995. Situação Atual Do desenvolvimento contra las leishmanioses: A experiencia do grupo mineiro.

McMahon-Pratt D y David JR, 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* vol 291, p. 581-583.

MacMahon-Prat D, Jaffe CHL, Bennett E, Grimaldi JR, 1984 Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. *The Journal of immunology*.

McMahon-Prat D, Bennett E, David JR, 1982. Monoclonal antibodies that distinguish of *Leishmania brasiliensis* *The journal of Immunology*

Medina R y Romero J, 1957 Estudio sobre la Leishmaniasis Tegumentaria en Venezuela. *Dermatol Ven.* vol. 1, p.30-86.

Miles y Souza 1981. The opossum, *Didelphis marsupialis* (*Marsupialia:Didelphidae*) as a reservoir host of *Leishmania brasiliensis guyanensis* in the amazon Bosin of Brasil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*

Molineux DH y Killick-Kendrick R, 1987. Morphology, ultraestructure and life cycles. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London : Academic Press, p.121-176.*

Molineux D H y Killick-Kendrick R, 1987. Morphology, ultraestructure and life cycles In: Peters W, Killick-Kendrick R eds. *The leishmanises in Biology and Medicine* London: Academic press, p. 121-176.

Montenegro J, 1926. A cutis reacao na leishmaniose *Ann. Fac. Med. Sao Paulo*.

Morel C, Chairi E, Camargo E, Mattei D, Romanha A, Simpon L, 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircle *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* vol.77.

Morel C y Simpson L, 1980. Characterization of patogenic Tripanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast ADN minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hig.* 28.

Muniz J y Medina H, 1948. Leishmaniose Tegumentar do cobaio (*Leishmania enriettii n.s.p.*). *O Hospital Rio de Janeiro* vol. 33, p.7-23.

Naiff RD, Talhari S, Barret TV, 1988. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* vol. 83,p. 529-230.

Neghme A y Atías A, 1984. Parasitología Clínica 2da. Ed.Santiago: Mediterráneo cap. 27, p.235-237.

Nei M, 1975. Molecular Population genetics and evolution. In *Frontiers of biology* (Neuberger A. Tatum E.L. eds) North Holland *Publ. Co. Amsterdam* p. 288.

Nicolle C, 1908. Culture du parasite du bouton d'Orient. *C.r. Acad. Sc. Paris* vol.146, p. 842-843.

Ntambi J y Englund P, 1985. A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *J. Biol. Chem* 260.

OMS, 1990. Lucha contra la leishmaniasis. *Informe de un comité de expertos de la OMS*; Ginebra

OMS, 1984. Las leishmaniasis *Informe de un Comité de expertos de la OMS*.

Pifano F, 1960 Algunos aspectos en la patología comparada geográfica de la Leishmaniasis Tegumentaria en el trópico americano. *Gaceta Médica de Caracas* vol.28, p.1-3.

Piarroux R, Fontes M, Perasso R, Gambarelli F, Joblet G, Henry D, Quilici M, 1995. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73, 249-252

Preparation and Analysis of DNA 1994. *Current Protocols in Molecular Biology* Supplement 27.

Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F, 1995. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania Infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trópica* 59, 187,196.

Ray DS, 1987. Kinetoplast ADN Minicircles; High-Copy-Number Mitochondrial Plasmids

Rosane P Macau *et al.*, 1987. Infecção natural do Porco (*Sus Scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de Sao Luis, Maranhao. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro Vol. 82

Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J, 1994: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2246-2252.

Sampaio RR, Marsden PD, Llanos-Cuentas A, Cuba Cuba CA, Grimaldi GJR, 1985. *Leishmania mexicana amazonensis* isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol. 18, p. 273-274.

Sacks DL., 1990. Perspectivas histórica y nuevas tendencias en el desarrollo de una vacuna contra la leishmaniasis *Laboratorio de enfermedades parasitarias* Maryland; USA.

Shaw JJ y Lainson R, 1987. Leishmaniasis in Brasil. Observations on the morphology of *Leishmania* of the brasiliensis and mexicana complexes. *J. trop. Med. Hyg.* vol. 79, p. 9-13.

Shaw JJ, Mendoza-Le-n A, Tapia FJ, 1996. A guide for the Cutaneous Leishmaniasis Connoisseur, Molecular and Immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis 1ra ed., p., 2-22.

Sampaio RR, Marsden PD, Llanos-Cuentas A, Cuba Cuba CA, Grimaldi GJR, 1985. *Leishmania mexicana amazonensis* isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol. 18, p. 273-274.

Simpson L, 1987. The mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication and Evolution, *Ann Rev.*vol. 41,p. 363-382.

Schnur LF, 1982. The immunological identification and characterization of Leishmanial stocks and strains, with special reference to excreter factor serotyping. In : *Biochemical characterization of Leishmania* (Chance M.L. Walton B.C.. eds.) Genova, Switzerland vol.25,p. 47.

Schnur LF, Chance ML, Ebert F, Thomas S C, Peters W, 1981. The biochemical and serological taxonomy of vicerualizing *Leishmania*. *Ann. trop. Med. Sci* vol 8, p.932-942.

Serrano J L y García J M, 1990. Manual de Genética Molecular. Editorial Síntesis Madrid. Parasitology 105, 183-192.

Stauber LA, 1958. Host resistance to the Khartoun strain of *Leishmania donovani*. *Rice. Inst. Pamph.*vol. 45,p. 80-96.

Tasso Aires de Alencar, 1986. Participação do çao no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Municipio de Viana Estado do Espirito Santo, Brasil. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro Vol. 81.

Tibayrenc M, 1992. *Leishmania*: Sex, Kariotypes and population genetics. *Parasitol Today*, 8, p. 305-306.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Sckarecky D, Ayala F, 1993. Genetic characterization of six protozoa: Parity between random-primer DNA Typing and multilocus enzyme electrophoresis Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90. pp. 1335-1339.

Tibayrenc M, 1995. Populations Genetics of Parasitic Protozoa and other Microorganisms. *Advances in Parasitology* vol 36, p. 47-115.

Tikasingh ES, 1975. La leishmaniasis enzoontica de los roedores en Trinidad, Indias Occidentales, Boletín de la Oficina de Salud Panamericana 79, 312-317.

Van Wilsem EJG, Brevé J, Kleijmeer M. *et al* , 1994. Antigen- bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: Phenotype and kinetics of migration. *J. Invest. Dermatol.* 103.

Van Eys GJ, Guizani Y, Ligthart GS, Dellani K, 1991. A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Exp. Parasitol* 72. 459-463.

Vianna G, 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). *Brasil-Médico* vol.25, p. 41

Vikerman K, 1974. The ultrastructure of pathogenic flagellates In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas disease Ciba Foundation Symposium 20 *Scripta Medica* North Holland; *Associated Scientific Publisher* Amsterdam London New York p. 171-198.

Vincendeau P Lemestre JL, Sereno D, Daulouede S, Veyret B, Brajon N, 1997 *Leishmania spp.*: Nitric Oxide-Mediated Metabolic Inhibition of Promastigote and Axenically Grown Amastigote forms *Experimental Parasitology*

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990 *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

Wright CW y Phillipson JD, 1990. Natural product and the development of selective antiprotozoal Drugs.

Yakimoff WL, 1915. Contribution à l'étude de Leishmanioses de l'homme et du chien dans le Turkestan russe. *Bull. Soc. Path. exot.* vol.8, p. 474-503.

Yakimoff WL y Schockhor NI, 1914. La leishmaniose cutanée (Bouton d'orinet) spontanée du chien au Turkestan. *Bull. Soc. Path. exot.* vol. 7, p. 180-187.

## ANEXO 1

### MEDIO DE CULTIVO NNN

Na Cl	1,2 gr
Bacto Agar	2 gr
Sangre de conejo punción cardiaca	0,2 ml/3 ml de medio
Agua destilada	200 ml

Toda la manipulación se realiza bajo campana de flujo laminar. La extracción de sangre de conejo se realiza con anticoagulante (heparina).

En un Erlenmeyer calentar 200 ml. de agua destilada, se añade Bacto Agar y cloruro de sodio y dejar disolver por ebullición 1 a 2 minutos. Se deja enfriar y en cada tubo de cultivo estéril se coloca 0,2 ml de sangre de conejo y 3 ml. de agarosa tibia se mezcla y se deja secar inclinado por 10 minutos, colocando luego a 4 °C por 2 horas en posición vertical.

Posteriormente los tubos se colocan a 56 °C para desfibrinizar por 1 hora. Después se guardan a 4°C.

## MEDIO DE CULTIVO SCHNEIDER

Medio Schneider (SIGMA)	12,05 g
Glutamina	500 mg
Agua destilada	500 ml
Antibiótico	200 mg/ml
Suero fetal bovino	concentración requerida

Diluir por agitación en 400 ml. de agua destilada y a una temperatura no mayor de 40 °C, una vez disuelto se pasa por filtro estéril 0.22µ

Se añade antibiótico según la elección ( gentamicina 200 mg/ml de medio, o la combinación de penicilina y estreptomina, 200 mg/ml de cada una).

Del frasco estéril se toma una alícuota para control de esterilidad dejando a 26 °C por 48 horas.

Antes de usar se agrega suero fetal bovino a la concentración requerida.

**ANEXO 2****TAMPON TAE**

Concentración	1x
Tris acetato	0.04 M
EDTA	0.001 M

Ejemplo:

Concentración	50x
Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8)	100 ml.
agua destilada csp	1000 ml.

**TAMPON TBE**

Concentración	0.5x
Tris borato	0.045 M
EDTA	0.001 M

Ejemplo:

Concentración	5x
Tris base	54 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M (pH 8)	20 ml
Agua destilada csp	1000 ml

**ANEXO 3****ISOENZIMAS****TAMPONES DE REACCION**

<b>CODIGO</b>	<b>COMPOSICION</b>
1	Tris - HCl 1M pH 7.0
2	Tris - HCl 1M pH 8

**TAMPONES DE MIGRACION**

<b>CODIGO</b>	<b>COMPOSICION</b>
A	0.5M tris, ácido bórico 0,65M EDTA 0.016M. pH 8
B	Tris-barbital-Sodio Barbital (HR Helena) pH 9
C	0.1M Tris 0.1M ácido málico 0.01M EDTA 0.01 Mg Cl <sub>2</sub> pH 7.8

## CONDICIONES DE MIGRACION

ENZIMA	TAMPON	IMBIBICION	MIGRACION	VOLTAGE	TIEMPO
G6PD	B	PURO	PURO	200 V	20'
GPI	A	50/50	PURO	200 V	20'
MDH	B	PURO	PURO	200 v	30'
ME	A*	25/75	PURO	160 V	25'
PEP1	A	PURO	PURO	200 V	20'
PGM	A	25/75	PURO	200 V	20'
6PGD	C	25/75	25/75	200 V	25'
IDH	A	puro	puro	200 v	20'

\*Adición de 5% de Mg Cl<sub>2</sub>

## SOLUCIONES ESPECIFICAS DE REVELADO

ENZIMA	TR	SOLUCION DE REVELACION
G6PD	1(1/2)	D-glucosa 6-fosfato 5mg. MgCl <sub>2</sub> 50mg NAD 5 mg. MTT 1.2 mg. PMS 3 mg.
GPI	1(1/4)	Fructuosa 6-fosfato 10mg. glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 5UI. MgCl <sub>2</sub> 50 mg. NADP 5mg. MTT 1.2 mg. PMS 3mg
MDH	2(1/10)	Acido málico 1M pH7 0.9 ml. NAD 4 mg. MTT 1.2 mg. PMS 3mg.
ME	1(1/4)	Acido malico 1M pH7 0.6 ml. MgCl <sub>2</sub> 50 mg. NADP 5mg. MTT 1.2 mg. PMS 3mg
PEP1*	2(1/10)	L-leucina-leucina-leucina 5mg. L-amino ácido oxidasa 2mg. peroxidasa 1 mg. MgCl <sub>2</sub> 50mg 3-amino-9 etilcarbazole 10mg.
PGM	2(1/4)	D-glucosa 1-fosfato 20mg. glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 8UI. MgCl <sub>2</sub> 50 mg. NADP 5 mg. MTT 1.2 mg. PMS 3mg
6PGD	2(1/4)	6-fosfo gluconico 10 mg. MgCl <sub>2</sub> 50mg. NADP 5 mg. MTT 1.2 mg. PMS 3 mg.
IDH	2(1/10)	DI-ácido isocítrico 10 mg. Mg Cl <sub>2</sub> 50 mg. NADP 5 mg. MTT 1.2 mg. PMS 3mg.

TR= Dilución del tampón de reacción

\* El colorante debe ser diluído en 0,5 ml. etanol absoluto.

**NOMBRE DE PRODUCTOS QUIMICOS USADOS EN LA SOLUCION DE REVELADO**

---

<b>CODIGO</b>	<b>NOMBRE</b>
EDTA	Etilen diamino tetracetico
NAD	Beta-Nicotinamida Adenina dinucleótido
NADH	Beta-Nicotinamida Adenina dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida Adenina dinucleótido fosfato
MTT	Azul 4,5-dimetiltiazolyl
PMS	Metasulfato fenazina

---