

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
BIOLOGÍA**



Estandarización de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*. Ayacucho 2009.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO
CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
MICROBIOLOGÍA**

PRESENTADO POR: RIVERA VILLAR, JIME JACK

AYACUCHO, PERÚ

2011

*CON MUCHO AMOR Y CARIÑO PARA MI MADRE
RICARDINA VILLAR MEDINA POR SU APOYO
INCONDICIONAL EN MI VIDA PROFESIONAL
Y MI VIDA DIARIA.*

*A MI PADRE Y A MIS HERMANAS NILDA,
ANGELICA, EDITH Y LAYDY POR SU APOYO
Y COLABORACIÓN EN ESTE TRABAJO*

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme acogido y brindado la oportunidad de forjarme como profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, la Plana Docente del Departamento Académico de Ciencias Biológicas, la Escuela de Formación Profesional de Biología y al Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas, por su abnegada labor en la enseñanza.

Al Bigo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y Mg. Víctor Luis Cárdenas López, por su asesoría en el desarrollo de la presente investigación, otorgándome las facilidades académicas y técnicas.

Al Bigo. Omar Alberto Cáceres Rey, investigador de la División de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud en la ciudad de Lima.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | v |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II: MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| 2.1. Leishmania..... | 4 |
| 2.2. Taxonomía..... | 5 |
| 2.3. Ciclo Biológico..... | 6 |
| 2.4. Leishmaniasis..... | 8 |
| 2.5. Historia de la Leishmaniasis..... | 10 |
| 2.6. Tipos de Leishmaniasis..... | 13 |
| 2.7. Inmunidad..... | 19 |
| 2.8. Distribución geográfica..... | 22 |
| 2.9. Diagnóstico de la Leishmaniasis..... | 23 |
| 2.10. Tratamiento..... | 29 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 30 |
| 3.1. Ubicación..... | 30 |
| 3.2. Población..... | 30 |
| 3.3. Muestra..... | 30 |
| 3.4. Diseño Metodológico..... | 31 |
| IV. RESULTADOS..... | 40 |
| V. DISCUSIÓN..... | 48 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 53 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 55 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |
| ANEXOS..... | 59 |

Estandarización de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*. Ayacucho 2009.

Autor: Bach. RIVERA VILLAR, Jime Jack

Asesor: Blgo. MIRANDA TOMASEVICH, Tomás Yuret

RESUMEN

El presente estudio se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la UNSCH, planteándonos como objetivo general, estandarizar la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis* y objetivos específicos, realizar los cultivos *in vitro* de *Leishmania*, obtener ADN de buena calidad de pureza de estos hemoparásitos y determinar las condiciones físicas, concentraciones y volúmenes de los componentes del PCR para la amplificación del segmento de ADN del minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania*. Las cepas de *Leishmania* fueron cultivadas y mantenidas en medio bifásico a 28°C por 4 ó 6 días, se extrajo el ADN con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se cuantificó cualitativamente y cuantitativamente el ADN y se procesó el PCR probando diferentes concentraciones de los componentes y las temperaturas de hibridación. Con los resultados, llegamos a determinar que las condiciones adecuadas en la preparación del mix para una reacción fue: Buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer 13A 1,0 μM, primer 13B 1,0 μM, Taq polimerasa 1 U/μL, agua (NFW), ADN (200 ng/ μL) 2,0 μL, volumen final de 25 μL; el ciclaje fue: desnaturalización inicial (96°C por 3 minutos), 30 ciclos (96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos) y una extensión final (72°C por 6 minutos). Con estos resultados llegamos a determinar las condiciones físicas y químicas que nos permitieron obtener productos de PCR que se evidenciaron por la presencia de una banda de 120pb bastante nítida, compacta y muy resplandeciente luego de la tinción con bromuro de etidio expuesto en el transiluminador con UV.

Palabras clave: PCR *Leishmania*.

I. INTRODUCCIÓN

Los protozoos del género *Leishmania* causan un grupo de enfermedades denominadas leishmaniasis, cuyo aspecto va desde úlceras cutáneas que curan espontáneamente hasta graves afecciones viscerales que pueden comprometer la vida del paciente, existiendo entre estos dos polos una amplia gama de posibilidades clínicas.

La leishmaniasis representa un serio obstáculo para el desarrollo socioeconómico de 88 países, por lo cual la Organización Mundial de Salud (OMS) ha reconocido esta enfermedad como un problema de salud pública global. Son 72 países en vías de desarrollo afectados por esta enfermedad, entre ellos Perú. La literatura reporta que existen aproximadamente de 12 a 14 millones de personas infectadas en el mundo y 350 millones de persona en riesgo de contraer esta enfermedad, de las cuales 1,5 a 2 millones se infectarán anualmente. De este último grupo, se considera que 500,000 sufrirán leishmaniasis visceral y casi un millón y medio sufrirán leishmaniasis tegumentaria (cutánea). En Perú esta enfermedad constituye la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles después de la malaria y tuberculosis.

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza usando métodos microscópicos y cultivos *in vitro* e *in vivo* a partir de las biopsias de las lesiones, demostrando la presencia del parásito. Estos métodos son lentos, trabajosos y de limitada sensibilidad; además, requieren personal calificado. Numerosos intentos de diagnóstico fueron desarrollados con el fin de evitar procedimientos traumáticos y/o difíciles de realizar; de esta manera surgió el Test de Aglutinación Directa (DAT), el ELISA, el Inmunoblot y la Inmunofluorescencia, que permitieron una alternativa más rápida y menos costosa como herramienta de diagnóstico de la enfermedad, sin embargo su baja sensibilidad y especificidad, han hecho que estos métodos sean limitados, causando que estas técnicas no sean muy confiables, debido a la presencia de falsos positivos y a las reacciones cruzadas con otras enfermedades como la malaria, bartonelosis, enfermedad de Chagas, entre otras. Además la limitación se hace evidente cuando la parasitemia en las muestras clínicas es baja, en pacientes inmunosuprimidos o cuando se trata de una leishmaniasis cuya morfología es atípica (Cáceres y Montoya, 2002).

En las dos últimas décadas numerosas técnicas de detección basada en la tecnología del ADN recombinante, han mostrado ventajas sobre las técnicas convencionales. El uso de oligonucleótidos específicos para el ADN del minicírculo del kinetoplasto (ADNk) por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha superado los procedimientos de detección parasitológico convencional convirtiéndose en una herramienta útil para el diagnóstico de esta enfermedad. Además, el uso de la PCR como herramienta para el diagnóstico a demostrado ser muy específico, sensible y rápido comparado con el cultivo, IFI, ELISA e inoculación en animales, pudiendo ser usado en diferentes laboratorios, además de emplearlo también para la tipificación de las especies de leishmania (Cáceres y Montoya, 2002).

Basado en estas evidencias, nos hemos planteado desarrollar el presente estudio, con la finalidad de acondicionar y aplicar la técnica del PCR para la detección de *Leishmania (V) peruviana* (LC31) y *Leishmania (V) braziliensis* (LC56) recolectados de cultivos puros, puesto que si bien existen protocolos para este procedimiento, estos tienen que ser estandarizados a las condiciones del Laboratorio del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (U.N.S.C.H.), vale decir características técnicas de los equipos de laboratorio como el termociclador, fuente de poder, electroforesis, factores físicos ambientales como la temperatura, presión, tiempo y las concentraciones de los componentes químicos de la reacción como el buffer, la mezcla de los dioxinucleótidos trifosfato, los oligonucleótidos o primers, el MgCl₂, la enzima Taq Gold™ ADN Polimerasa y el ADN de la muestra. El propósito será desarrollar el diagnóstico de la leishmaniasis, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Por estas razones el trabajo de investigación se planteó como Objetivo general, estandarizar la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis* y objetivos específicos, realizar los cultivos *in vitro* de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, obtener ADN de buena calidad de pureza de estos hemoparásitos y determinar las condiciones físicas, concentraciones y volúmenes de los componentes del PCR para la amplificación del segmento de ADN del minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. LEISHMANIASIS

El género *Leishmania* comprende protozoarios parásitos pertenecientes a la Familia Trypanosomatidae y al Orden Kinetoplastida, cuya principal característica estructural es la de poseer un orgánulo citoplasmático: el kinetoplasto. La presencia de este último, es de capital importancia en la identificación morfológica de las fases evolutivas del género *leishmania*. Los especímenes de *leishmania* muestran dos morfologías durante su ciclo vital: Promastigote, alargada con un cilio o flagelo anterior, en el intestino del invertebrado vector. Amastigote, esférica y con un cilio muy corto, que no sobresale de la bolsa flagelar, de modo que sólo es visible en el microscopio electrónico, que se reproduce dentro de macrófagos y células del sistema retículoendotelial del hospedero vertebrado (INS, 2002).

La *Leishmania* tiene el ADN genómico que se encuentra en el núcleo, éste es un genoma haploide que tiene 34 Mb. Las *leishmania* tienen entre 34-36 cromosomas (tamaño de 0,3 a 2,5 Mb), aparte de constar de ADN extra cromosómico como es la mitocondria, maxicírculos y minicírculo. El ADN de éste minicírculo presenta regiones conservadas para el género *leishmania*, la misma

que es usada en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de las especies del complejo de Leishmania.

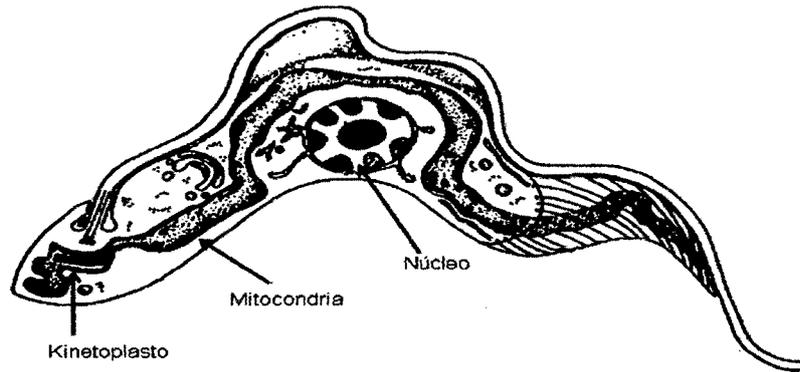


Figura Nº 01. Morfología de la Leishmania (www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm)

2.2. TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica de la Leishmania es:

Phylum: Protozoo

Subphylum:..... Sarcomastigosphora

Clase:..... Mastigophora.

Orden: Kinetoplastida

Familia:..... Trypanosomatidae

Género: Leishmania

Especies: *L. donovani*, *L. peruviana*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. tropica*,
L. mexicana, *L. braziliensis*, etc. (<http://www.daneprairie.com>).

2.3. CICLO BIOLÓGICO DE LA LEISHMANIA

Todas las leishmanias presentan un ciclo de vida similar y es importante conocer cada una de las etapas para poder entender y aplicar ciertas medidas de control (MINSA, 2000).

La leishmania es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos hospederos. Se pueden producir diferentes ciclos: Uno, principalmente silvestre, en el que la leishmania circula entre los reservorios naturales, y mantiene el ciclo con la participación de los vectores propios de la zona endémica. En un segundo ciclo, los vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peridomésticos. Se puede producir un tercer ciclo, en el que el propio enfermo con leishmaniasis se constituye en reservorio (MINSA, 2000).

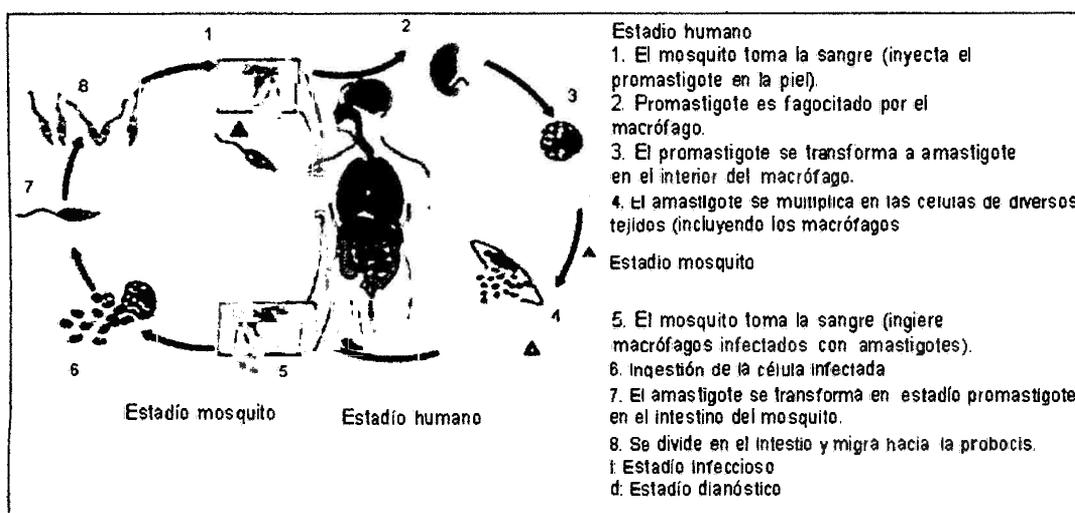


Figura N° 02. Ciclo de vida de las Leishmanias. Fuente: Centers for Disease Control & Prevention National Center for Infectious Diseases. Division of Parasitic Diseases.

El ciclo empieza cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado, para alimentarse, e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes

dentro de la piel. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie de vector y de leishmania. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe. En el tubo digestivo de la hembra del vector, los promastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño que el cuerpo; el núcleo se localiza en el centro de la célula y el kinetoplasto entre el núcleo y la extremidad anterior somática; el rizonema parte del kinetoplasto y se continúa con el flagelo libre (De Gopugui y Ruiz, 2003).

Cuando el vector infectado pica a un hospedero le inyecta entre 10 y 100 promastigotes presentes en la proboscis y que penetran en la dermis. La saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados (De Gopugui, 2003; Hall, 1995 y Pearson, 1997).

En los vectores excesivamente infectados, la proboscis está congestionada, lo que hace difícil alimentarse, por lo que el mosquito realiza múltiples picaduras e inoculaciones. Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial, en un periodo de 3 a 4 horas en promedio, permanecen en

estadio estacionario por 36 horas aproximadamente y luego, empiezan a reproducirse (Hall, 1995).

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es una etapa fundamental para la invasión de las células del hospedero. Sobre la superficie de la leishmania han sido identificados numerosos receptores, entre los más importantes la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos (Tremblay y col., 1996).

Las especies de *Leishmania* han desarrollado varios mecanismos para resistir la actividad digestiva y antimicrobiana de las células fagocíticas. Los amastigotes son más resistentes que los promastigotes a los mecanismos antimicrobianos inducidos por citoquinas dependientes del oxígeno, lo que refleja una adaptación al crecimiento intracelular. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria dentro de vacuolas parasitóforas de los macrófagos. Primero, inician la división del cinetoplasto, uno de los fragmentos conserva el rizonema, mientras que el otro forma su propia estructura flagelar. Luego, sigue la división del núcleo por mitosis y concluye con la del citoplasma, en sentido anteroposterior. La cantidad de amastigotes puede llegar hasta 200, lo que ocasiona la distensión y ruptura del macrófago. Los amastigotes libres entran en nuevas células del sistema fagocitario mononuclear, donde se multiplican de nuevo. El ciclo se reanuda cuando el flebótomo pica a un hospedero para alimentarse de sangre (MINSAL, 2003; Bonfante y Barruela, 2002).

2.4. LEISHMANIASIS

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas, producidas por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *leishmania*. La enfermedad es transmitida por insectos dípteros hematófagos,

que corresponden a diferentes especies de flebótomos o lutzomyias, y el reservorio son animales vertebrados. Estas enfermedades se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de leishmania y la respuesta inmune del hospedero. Son enfermedades crónicas de patogenicidad baja y morbilidad relativa (MINSA, 1995 y MINSA, 2000).

La leishmaniasis es una enfermedad de prevalencia alta en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, tales como el este y sureste de Asia, Oriente Medio, norte y este de África, el sur de Europa (cuenca del Mediterráneo) y América Central y Sudamérica (Vidyashankar y Noel, 2002).

Es endémica en 88 países en áreas tropicales, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. Descrita en 24 países de América, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta el norte de Argentina. Se estima que la leishmaniasis afecta a 12 millones de personas en el mundo, con 1,5 a 2 millones de nuevos casos cada año (Neyra, 1997).

Existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección. La distribución geográfica de la leishmaniasis está limitada por la distribución del vector. El número de casos de leishmaniasis está aumentando debido principalmente a los cambios del medio ambiente generados por el hombre, lo que aumenta la exposición humana al vector (Vidyashankar y Noel, 2002).

En el Perú, la leishmaniasis constituye una endemia que afecta a 12 departamentos, es la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis. Se reporta anualmente un promedio de 7 000 a 9 000 casos probados. Para 1997 se estimó que la población en riesgo de infección era de 1 187 104 habitantes. La zona endémica comprende aproximadamente el 74% del área total del país (951

820 km²), se extiende a través de los Andes y los valles interandinos entre los 600 y los 3 000 metros sobre el nivel del mar, para la leishmaniasis cutánea, y a las zonas de selva alta y selva baja por debajo de los 2 000 metros, para la leishmaniasis mucocutánea (Lucas y col., 1998).

La importancia de la leishmaniasis en el Perú radica en que constituye una endemia de tipo tropical que produce un impacto negativo social y económico en la población económicamente deprimida. Además, las secuelas destructivas que ocasiona, particularmente, la forma mucocutánea provocan el aislamiento del individuo, por su irreversibilidad.

2.5. HISTORIA DE LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis en el Perú afecta ancestralmente a las poblaciones andina y selvática de nuestro país, desde antes de la llegada de los españoles. Un testimonio son los huacos antropomorfos encontrados en las zonas donde se desarrollaron las culturas Mochica (330 a.C.-500 d.C.) y Chimú (1000-1400 d.C.), que representan secuelas destructivas y deformantes de la leishmaniasis, como mutilaciones de los labios y de la nariz (León, 1979).



Registro fotográfico Nº 01. Huacos antropomorfos de la cultura mochica.

(www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm)

Las primeras descripciones clínicas de la leishmaniasis datan del siglo XVI, época de la conquista española. Fernando de Oviedo (1535), Pedro Pizarro (1571) y Fernando de Santillán (1572) 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 se cultiva la coca, enfermedad que destruye la nariz y las cavidades nasales. Las primeras descripciones de la presencia de la leishmaniasis en nuestro país se hacen en 1586, cuando Fray Rodrigo de Loayza hacía mención de la existencia de una enfermedad que afectaba la mucosa nasal de indios y españoles de los Andes, y hace referencia que la ocupación, el medio geográfico e inclusive, la inmunidad racial podrían estar asociados con la enfermedad. Diego de Morales (1602), Reginaldo Lizárraga (1605), Bartolomé de la Vega y el médico cronista Cosme Bueno hablan de la existencia de esta enfermedad en el Antiguo Perú (De Gopugui y Ruiz, 2003).

A finales del siglo XIX se identifica la leishmaniasis americana en el botón de Oriente (Bravo, en 1852, y Cerqueira, en 1885). Cunningham (1885), en la India, fue el primero en observar el microorganismo en los mononucleares de los casos de kala-azar. Firth, en 1891, confirmó este descubrimiento. Tamayo (1908) parece haber sido el primero en identificar lesiones características de UTA, denominación de la leishmaniasis cutánea andina en las cerámicas del Perú pre inca. En 1900 y 1903, Leishman y Donovan descubren, con coloración de Giemsa, un parásito ovalado en macrófagos de pacientes con leishmaniasis visceral. Wright (1903) describe el primer caso de infección por *Leishmania trópica*; Roger (1904) cultiva por primera vez una leishmania a partir del bazo de un paciente con leishmaniasis visceral; Presat (1905), por primera vez, sugiere que los flebótomos serían los transmisores del botón de Oriente; Nicolle (1908) cultivó *L. infantum* y *L. trópica* en el medio NNN (Nicolle Novy MacNeal) y,

posteriormente, en el medio semisólido para leptospiras de Noguchi. Nicolle y Moncuex (1909) inician inoculaciones experimentales en monos, perros, ratas, pericotes y zorros, Lindenberg (1909) encontró leishmanias en úlceras de pacientes en Sao Paulo (Brasil). Nicolle y Sergent sugieren que el perro sería el reservorio (www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm).

Gaspar Vianna (1910) sugiere que la terapia con antimoniales es efectiva para el tratamiento de la leishmaniasis en el Brasil. Splendore (1911) diagnostica la forma mucosa de la enfermedad y obtiene cultivos positivos a partir de lesiones mucosas. Vianna (1911) propone el nombre de *Leishmania braziliensis* para denominar al agente que produce la leishmaniasis tegumentaria americana, así la diferencia de la *L. trópica*. Pedroso, en Brasil (1913), reporta por primera vez un perro infectado por *Leishmania* (MINSa, 2000 y Pesce, 1995).

En el Perú, Escobel, en 1911, fue el primero que halló leishmanias en un caso de espundia y, en 1913, la Comisión de la Universidad de Harvard concluye que la UTA es una leishmaniasis de variedad cutánea y la espundia, una de tipo mucocutáneo. Herrer y Battistine producen la primera infección experimental en perros (Herrer, 1955).

En 1940, Geiman publica los hallazgos de *Leishmania braziliensis* en pacientes peruanos que presentaban UTA y la inoculación en un perro reproduce la típica lesión. Walton y col., en 1977, caracterizan como *Leishmania braziliensis* spp. a una cepa aislada de un paciente procedente de la región este del Perú que presentaba espundia. Lumbreras y Guerra (1985) escriben que la *L. braziliensis* y la *L. peruviana* son los agentes que causan la espundia. Llanos Cuentas y col. (1986) reportan la identificación de *Leishmania braziliensis* en pacientes con espundia (MINSa, 2000).

Lucas y col., en 1994, aíslan en el Perú la *leishmania (V) lainsoni*. (Lucas y col., 1998).

2.6. TIPOS DE LEISHMANIA

2.6.1. Leishmaniasis cutánea

La aparición de las lesiones cutáneas algunas veces se encuentra asociada con la picadura del insecto vector en sujetos que viven en áreas endémicas, penetran y permanecen en el nicho ecológico por breves días y luego presentan la enfermedad. En promedio, se puede hablar de un periodo de incubación entre 2 y 3 semanas (de 2 semanas a 2 meses o más). Después aparece una pequeña lesión inicial frecuentemente visible, pero no siempre, que tiene asiento en las partes descubiertas, principalmente en la cara y en las piernas. El aspecto típico de la lesión inicial es un leve enrojecimiento circunscrito, frecuentemente pruriginoso, seguido, a los pocos días, por una leve infiltración papulosa de unos 3 mm de diámetro y con mucha frecuencia con una o dos diminutas vesículas; puede dar lugar a una diminuta excoiación por el rascado, que se transforma en una exulceración y posible punto de partida de un proceso ulcerativo. Pero, algunas veces, la lesión regresa espontáneamente y origina una fase de silencio sintomático algo prolongado. Un trauma local puede activar una infección latente (Pesce, 1995).

Se ha observado como signo precoz en los casos de leishmaniasis cutánea la aparición de nódulos linfáticos, en la región correspondiente. El inicio de los signos linfáticos puede aparecer antes, al mismo tiempo o después de la ulceración y en casos muy raros, puede ser el único signo de infección de leishmaniasis. Más raros, son diminutos cordones linfáticos infiltrados, perceptibles a la palpación, entre la lesión primaria y el ganglio infartado. Esto

puede considerarse como un 'complejo primario' que la mayoría de veces pasa desapercibido por su escasa intensidad, o sea una verdadera, pero diminuta, úlcera primaria acompañada por la infiltración linfática regional correspondiente. Algunas veces se ha observado una lesión modular de tipo subdérmico, sin lesión cutánea visible como punto de partida de un infarto ganglionar manifiesto. Esto indica que el complejo ganglionar es la regla en la enfermedad, aunque no siempre pueda ser evidenciable (Pesce, 1995).

. Debajo de la costra, la lesión se extiende en superficie y profundidad. Pueden aparecer lesiones satélites que al unirse a la inicial, originan una úlcera grande. La úlcera característica de la leishmaniasis es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados y cortados en forma de sacabocado e indurada que recuerda la imagen de un cráter. Cuando se desprende la costra se observa un fondo granulo matoso, limpio, con exudado seroso no purulento, sin tendencia al sangrado, de color rojizo, a veces amarillento cuando hay depósito de fibrina. No hay signos inflamatorios, como edema o calor local. Si hay una infección bacteriana sobre agrega dable, la úlcera se torna dolorosa y exudativa. La piel alrededor de la lesión presenta aspecto y coloración normales (Tejada, 1973).



Registro fotográfica Nº 02. Úlcera de la leishmaniasis.

(www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm)

La localización de la úlcera es más frecuente en las partes expuestas del cuerpo, especialmente las extremidades y cara. En los primeros meses de evolución, la úlcera tiende a crecer hasta un tamaño máximo que está en función de la respuesta inmune del hospedero y de la especie de leishmania infectante. Pasan varios meses antes que la úlcera alcance varios centímetros de diámetro. Son afectados los ganglios linfáticos y se producen linfangitis y linfadenitis regionales. Las lesiones se estabilizan y a medida que empieza a prevalecer la respuesta inmune del hospedero, la enfermedad tiende a evolucionar a la curación espontánea, en un periodo de seis meses a tres años (MINSa, 2000).

Se ha descrito diversas formas clínicas de lesiones no ulceradas de leishmaniasis, como la papulosa, impetiginóide, verrucosa, nodular vegetante y mixtas. La leishmaniasis cutánea andina produce usualmente sólo lesiones cutáneas. Sin embargo, las membranas mucosas pueden estar ocasionalmente comprometidas y directamente relacionadas a la contigüidad de una lesión con la mucosa, en el caso de lesiones producidas en la cara (MINSa, 2000).

2.6.2. Leishmaniasis mucocutánea

Las manifestaciones clínicas de la forma mucocutánea se presentan muchos meses o años después haber cicatrizado la forma cutánea, ocasionalmente aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel. Frecuentemente el enfermo ya no se encuentra en la zona donde contrajo la enfermedad. Tejada, en Cusco y Madre de Dios encontró que el 48,8% de las manifestaciones mucosas se inició uno a dos años después de iniciada la enfermedad cutánea; el 24%, a los dos años y 20% entre los 3 y 5 años (Tejada, 2002).

Pessoa y col., en Brasil, afirman que el 70% de las lesiones surge en los primeros 5 años después de la aparición de la lesión cutánea. Se describe

aparición de lesiones mucosas entre los 20 y 30 años después de la resolución de la lesión primaria. En un tercio de los casos, las manifestaciones mucosas son primarias, sin antecedente de lesión cutánea. Posiblemente la infección primaria ha sido inaparente o se ha manifestado como una lesión mínima que pasó desapercibida para el paciente.

Las lesiones mucosas se inician principalmente a nivel del tabique nasal cartilaginoso (septum cartilaginoso) y raramente, en el piso de la nariz. Pero, pueden comenzar en otras partes de las vías aéreas superiores. Al inicio solo se aprecia una discreta secreción de moco, como si el enfermo tuviera una rinitis o un resfriado. Luego, se produce la inflamación de la mucosa, que se vuelve eritematosa, edematosa y dolorosa; la lesión se profundiza y produce una pericondritis. Hay hipertrofia vascular y de los orificios pilosebáceos, que produce abundante seborrea. Cuando las lesiones están avanzadas, se presenta exudación y ulceración de la mucosa. Luego, se compromete el cartílago y se produce la perforación del tabique, que si destruye parcial o totalmente el tabique determinará la caída de la punta de la nariz. El eritema, edema y la infiltración producen aumento del volumen de la punta de la nariz y el ala, que puede sobrepasar el surco nasogeniano. A esta nariz grande de la leishmaniasis se la conoce con el nombre de 'nariz de tapir'. La perforación del tabique nasal y el achatamiento de la nariz sin ulceración son propias de la leishmaniasis mucocutánea y no son observadas en la leishmaniasis cutánea andina, en la que de preferencia, las alas de la nariz son carcomidas (MINSA, 2000).

Los pacientes con compromiso nasal presentan, como sintomatología, catarro nasal, ardor, prurito y respiración forzada. Al examen, se aprecia la mucosa nasal congestionada, una costra hemorrágica o una úlcera granulomatosa infiltrada. Si hay infección sobre agregada, la secreción es purulenta. Si la enfermedad

progresa y se profundiza, el proceso se extiende del vestíbulo al labio superior, paladar, pilares, úvula y la garganta. El labio superior suele ulcerarse y destruirse poco a poco y compromete parte de la nariz. Las lesiones del paladar son más frecuentemente proliferativas que destructivas; la úvula suele hipertrofiarse, ulcerarse o destruirse; pero, las lesiones linguales son muy raras. Cuando se afecta la garganta, la voz es ronca y hay dificultad para respirar y deglutir los alimentos. También se puede hallar compromiso gingival e interdentario. Las lesiones de la hipofaringe, laringe y tráquea se caracterizan por un compromiso de los repliegues aritepiglóticos y aritenoides, que dan lesiones hipertrofiadas que producen disfonía, afonía y asfixia. La epiglotis también puede estar comprometida y las cuerdas vocales infiltradas. Si no hay tratamiento, la enfermedad puede llevar a la muerte (MINSA, 2000).

2.6.3. Leishmaniasis cutánea difusa

La leishmaniasis cutánea difusa ocurre en un hospedero enérgico con pobre respuesta inmune celular. La enfermedad se inicia bajo la forma de lesiones localizadas, de aspecto modular o en placa infiltrada, que poco a poco se diseminan a todo el cuerpo. La presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas, úlceras y algunas veces, lesiones verrugosas de límites imprecisos, que se confunden con la piel normal, dan el aspecto de la lepra lepromatosa. La enfermedad no invade órganos internos (Salazar y Castro, 200; Zangueza y Zangueza, 1993)

El examen histopatológico muestra frecuentemente atrofia de la epidermis y granulomas bien constituidos con predominio de células de citoplasma vacuolado llenas de parásitos, en la dermis. Las lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento (Grevelink y Lenner, 1996).

2.6.4. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral es una enfermedad parasitaria sistémica que compromete la vida, causada por el complejo *L. donovani* y transmitida por mosquitos flebótomos. La enfermedad es endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo. El complejo *Leishmania donovani* incluye a la *L. donovani* en el subcontinente Indio, Asia y África; a la *L. infantum*, en el mediterráneo y *L. chagasi*, en Sudamérica. En el Oriente medio se han encontrado cepas de *L. tropica* que causan enfermedad visceral. La leishmaniasis visceral ocurre esporádicamente en áreas endémicas rurales, pero epidemias en gran escala se han asociado al hambre, migraciones en masa y alteraciones ecológicas, las que han propiciado interacciones entre los reservorios, mosquitos y seres humanos (Rondón, 2001).

Después de la picadura del vector, existe un periodo de incubación que varía de 4 a 10 meses. En muy pocos casos se encuentran lesiones en la puerta de entrada, ya que la mayoría de las veces pasa desapercibida y tiene una evolución crónica. La progresión a leishmaniasis visceral típica usualmente ocurre entre los 3 y 8 meses después de la infección; aunque se han reportado casos tempranos, como de dos semanas. Sin embargo, después de la infección la mayoría de los casos permanece asintomática o está asociada con síntomas leves que, eventualmente, se resuelven en forma espontánea (Maltezou, 2000).

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral típica están asociadas con fiebre, la que casi siempre es progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos febriles, que también duran semanas. Posteriormente, la fiebre se torna persistente y ondulante. Existe progresivo deterioro del hospedero, palidez y hepatoesplenomegalia. En la fase

crónica, la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa iliaca derecha, con abultamiento considerable del abdomen. Existe una linfadenopatía generalizada, en especial de los ganglios mesentéricos, epistaxis, hemorragia gingival, edema y ascitis. La leishmaniasis visceral a menudo es fatal si no se efectúa tratamiento adecuado. Los hallazgos de laboratorio incluyen anemia normocítica normocrómica, neutropenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia y elevación de las transaminasas (Maltezou, 2000).

Desde el punto de vista inmunológico, se ha establecido que la leishmaniasis visceral está asociada con anergia celular, tal como lo indican las pruebas cutáneas negativas a antígenos de leishmania. La inducción del factor de transformación del crecimiento-beta y la IL-10 con propiedades inactivantes de los macrófagos puede ser la clave de esto. El control de la leishmaniasis visceral depende de la magnitud de la respuesta Th1 y de las citoquinas liberadas tempranamente en el curso de la infección (Botero, 1998).

2.7. INMUNIDAD

La inmunidad en la leishmaniasis depende de la forma clínica y la respuesta del hospedero. Se ha descrito un espectro de fenotipos que se correlacionan con la intensidad de la respuesta inmune. La inmunidad mediada por células tiene una influencia dominante en la determinación de la enfermedad (Díaz y col., 2002; Grevelink y Lerner, 1996)

Las leishmanias poseen una serie de estrategias complejas para atacar, infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. El hospedero falla para controlar la enfermedad debido a la habilidad que tienen algunas cepas de resistir a la acción microbicida de los macrófagos activados y a la caída de la respuesta inmunoprotectora del hospedero (Bonfante y Barruela, 2002).

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es fundamental para la invasión de las células del hospedero. La proteína sérica C3 del complemento se deposita en la superficie del protozoario y reconoce ciertos receptores de membrana del macrófago. Se han identificado otros receptores sobre la superficie de la leishmania, como la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos. Una vez que los promastigotes se fijan al macrófago son englobados en una vacuola parasitófora, que se une a los lisosomas y contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir las leishmanias (MINSA, 2002).

Los análisis del perfil de citoquinas sugieren que el sistema inmune del hospedero tiene un rol inmunorregulatorio en la expresión de la enfermedad. Así, en la leishmaniasis cutánea localizada, las principales citoquinas producidas son la IL-2 e IFN- γ , y en la mucocutánea y la cutánea difusa, la IL-4 e IL-10. Esto se correlaciona con los estudios en modelos murinos en los cuales la producción de IL-2 e IFN- γ (Th1) interviene en la curación de la enfermedad, mientras que las IL-4, IL-5 e IL-10 (Th2) están asociados con la progresión y diseminación de la enfermedad. Así dos subpoblaciones de células T helper en el sistema inmune murino son críticos en la inducción de la resistencia o la susceptibilidad a la infección (Sánchez y col., 2000).

El mayor mecanismo de defensa inmune que tiene el hospedero frente a la leishmania es la activación de los macrófagos por el IFN- γ derivado de las células T CD4+. La ausencia de IFN- γ es responsable del desarrollo de la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis cutánea difusa. En la leishmaniasis cutánea americana, los linfocitos T producen IFN- γ , en respuesta a antígenos de las leishmanias y activan el macrófago para destruir a las leishmanias. Es posible que el desarrollo de la enfermedad dependa de la desregulación

transitoria de la respuesta de las células T durante la fase inicial de la infección (Pearson y De Quiroz, 1996)

Recientes estudios están descubriendo la importancia de las interacciones entre los microorganismos y las células dendríticas (CD) y el rol central de estas células en la iniciación y regulación de la respuesta inmune antimicrobial. Las CD inmaduras en la piel captan el antígeno y lo procesan para su presentación a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Posteriormente, las CD migran por los nódulos linfáticos transportando el antígeno procesado a las áreas de las células T, diferenciándose en CD maduras con capacidad para estimular las células T en reposo, que da lugar a la producción de citoquinas, como IL-1, IL-6 o IL-12, las que modulan el desarrollo del tipo de respuesta de células T. En la leishmaniasis, los protozoarios son fagocitados por macrófagos, CD, neutrófilos y fibroblastos. Solo las CD migran por los nódulos linfáticos y transportan el antígeno desde la piel infectada hacia las áreas de las células T y son capaces de proporcionar la principal señal para la iniciación de la respuesta primaria de las células T leishmania específica. Además, las CD retienen los antígenos del parásito de una forma inmunogénica por periodos prolongados, debido al aumento de la estabilidad de complejos péptidos del MHC de clase II, y así permitir la estimulación sostenida de las células T parásito específicas, que mantiene la inmunidad protectora frente a las leishmanias. Estos hallazgos sugieren que la interacción de la leishmania con las CD es enfocada como iniciadores y reguladores de la respuesta inmune específica. Se ha determinado que la IL-12 en un estadio temprano de la infección es crucial para la determinación de la inmunidad innata, la actividad de las células natural killer (NK) para producir IFN-g y la respuesta adaptativa del

huésped vía inducción selectiva de la diferenciación de las células Th1 (Moll y Berberich, 2001).

2.8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La leishmaniasis tiene de amplia distribución geográfica en el mundo y abarca zonas áridas, tropicales y subtropicales. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, hasta en un 500%, según la OMS (Helburn, 2000).

Ocurren alrededor de 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea cada año, de los cuales más del 90% se da en Afganistán, Argelia, Irán, Irak, Arabia Saudita y Siria; en América en Brasil y Perú. La leishmaniasis cutánea americana es endémica en América Central y América del Sur, con excepción de Chile y Uruguay (Neyra, 1997).

En el Perú, la leishmaniasis es endémica y constituye un grave problema de salud pública. La incidencia anual de todas las manifestaciones clínicas de leishmaniasis americana aumentó de 7,6 por 100 000 a 24,7 por 100 000, entre 1979 y 1989, según el Ministerio de Salud. Existen las formas cutáneo andina y la mucocutánea o selvática, que son endémicas en 12 departamentos del Perú: Ancash, Ucayali, Junín, Loreto, San Martín, Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Cerro de Pasco y Madre de Dios; primariamente en los Andes y en la amazonía. La población en riesgo es aproximadamente de 1,200 000 personas. La mayoría de los casos en el Perú es causada por *L. braziliensis* y por *L. peruviana* (Andersen y Burans, 2000; Bobbio, 2000)

La frecuencia es mayor en los adolescentes y adultos jóvenes. La forma cutáneo andina afecta predominantemente a los menores de 15 años en especial, a los niños menores de 5 años y la forma mucocutánea, al grupo mayor

de 15 años. La leishmaniasis es considerada como una enfermedad ocupacional en las personas que se trasladan por motivo de trabajo a las áreas endémicas. La transmisión de la forma mucocutánea se relaciona con la migración intermitente y la colonización de áreas poco exploradas de la Selva Alta y Baja, asociadas a actividades de extracción y explotación de oro, petróleo, madera y construcción de carreteras (Neyra, 1997).

No existe predilección por alguna raza ni sexo. Sin embargo, la incidencia es más alta en los hombres, posiblemente como resultado del contacto ocupacional (Stark y Wortmann, 2002; Kenner y Kauh, 2001)

2.9. DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS

La aproximación diagnóstica más exacta considera tres criterios que deberán abordarse en el siguiente orden:

1. Antecedentes epidemiológicos.
2. Cuadro clínico sugestivo de leishmaniasis.
3. Exámenes de laboratorio (Ampuero, 2001 y Rondón, 2001).

2.9.1. Antecedentes epidemiológicos

Es importante conocer el lugar de procedencia del paciente, las residencias anteriores, la permanencia o la visita a áreas endémicas de leishmaniasis, los antecedentes ocupacionales relacionados, como el trabajo en los lavaderos de oro, la recolección de café o de cacao en la selva del Perú. Además, es importante indagar sobre la presencia de lesiones cutáneas anteriores que puedan haber sido catalogadas como leishmaniasis o no y que, con el antecedente de haber permanecido en un área endémica, demoraron en la cicatrización (Cuba, 2000).

2.9.2. Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas son variables y están relacionadas en parte a la especie de *Leishmania*, al medio ambiente y a la respuesta inmune del hospedero. Las formas clínicas ya descritas corresponden a: leishmaniasis cutánea, mucocutánea, cutánea difusa y visceral. La última aún no ha sido reportada en el Perú (Rondón, 2001).

La localización y el diagnóstico clínico precoz previenen la aparición de complicaciones y secuelas destructivas.

Definición de casos de leishmaniasis:

- Caso probable: Caso de leishmaniasis diagnosticado bajo criterio clínico-epidemiológico, sin confirmación por exámenes de laboratorio.
- Caso confirmado: Caso probable que sometido a exámenes parasitológico, inmunológico e histopatológico o cultivo demuestra positividad a la infección por *leishmania* (Ampuero, 2001).

2.9.3. Diagnóstico de laboratorio

2.9.3.1. Métodos directos o parasitológicos

En el diagnóstico parasitológico hay dos alternativas. La primera es demostrar que el paciente está albergando la *leishmania*, mediante la visualización, en el frotis o en la histopatología, de amastigotes en tejidos infectados. La segunda opción es intentar el aislamiento directo de los promastigotes en cultivos *in vitro* de las lesiones (Ampuero, 2000).

Otro método empleado es la inoculación de animales de laboratorio (hámsters dorados) y ratones isogénicos y no isogénicos, a partir de los que se

puede aislar y caracterizar a la leishmania a través de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), anticuerpos monoclonales y/o electroforesis de isoenzimas. (www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm)

a. Investigación de amastigotes

En las lesiones cutáneas la úlcera es la más frecuente presentación clínica de la LTA. Independientemente de la especie de leishmania causante, las lesiones, por lo general, se encuentran contaminadas por hongos, bacterias o micobacterias. Por ello, se debe realizar una buena asepsia, previa a la toma de muestra. Cuando los parásitos circulantes en el área endémica pertenecen al subgénero *Viannia*, la visualización y aislamiento es menor en los frotises si se compara con las leishmanias del subgénero *Leishmania*, debido a las densidades parasitarias de 18 a 52% y de 30 a 40%, respectivamente (Cuba, 2000).

b. Investigación de promastigotes

De las fases evolutivas de leishmania, la forma promastigote es la más fácil de ser cultivada *in vitro*, en ella se hacen la mayoría de las investigaciones parasitológicas (Cuba, 2000).

Ya en la década del 70 era opinión generalizada que los parásitos pertenecientes al hoy, subgénero *Viannia* (complejo *braziliensis*), eran difíciles de cultivar. Este hecho era completamente opuesto a la facilidad con que se cultivaban las leishmanias del subgénero *Leishmania* (complejo *mexicana*) en cualquier medio agar sangre. Hoy sabemos que no existe un único medio de cultivo artificial capaz de reunir características tales que consiga cumplir los objetivos enunciados. Por tanto, es recomendable que cada área endémica de LTA, ensaye primero algunos medios conocidos por su sensibilidad. Esto

permitirá una mayor eficiencia futura en el aislamiento de los parásitos que circulan en el foco de transmisión. Los medios de cultivo empleados pueden ser monofásicos (Eagle, MEM, 19TC, el medio RPMI 1640 y el Schneider) o bifásicos (Agar sangre-NNN, Agar sangre USAMRU, medio de Senekjic) (Hendricks y Wright 1979).

c. Métodos de cultivo

Aislamiento primario de las lesiones cutáneas. La sensibilidad del método está directamente relacionada con la correcta selección que hagamos del medio más apropiado y con la habilidad del investigador para escoger el lugar de la lesión que sea la de mayor actividad parasitaria (la que sólo surge después de años de experiencia y práctica). Para la recolección de la muestra para el cultivo, podemos usar la técnica de aspiración de las lesiones por el procedimiento descrito por Hendricks o a través de una biopsia punch y posterior triturado en una solución de suero fisiológico y antibióticos. Es importante señalar que la excesiva presencia de sangre en las muestras colectadas es perjudicial para el desarrollo del parásito. Según Evans, la sangre contiene proteínas séricas altamente inhibitorias para el crecimiento de los promastigotes de leishmania (Evans, 1987).

2.9.3.2. Métodos indirectos

a. Métodos inmunológicos

Se basan en la detección de la enfermedad a través de la respuesta inmune celular (intradermorreacción de Montenegro o leishmania) y/o respuesta inmune humoral a través de anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la enfermedad (Elisa, e inmunofluorescencia indirecta (Ampuero, 2001)

b. Intradermorreacción de Montenegro

Es una reacción de hipersensibilidad tardía que evalúa la inmunidad mediada por células. Consiste en la aplicación de un antígeno extracto soluble preparado a partir de promastigotes procedentes de cultivo. Se aplica intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo izquierdo del paciente y se hace la lectura a las 48 a 72 horas. Se considera positiva si es mayor de 10 mm. La prueba aparece positiva 1 a 3 meses después de haber adquirido la infección y permanece positiva de por vida en pacientes con LCL y LCM, y es negativa en los pacientes con LCD, forma visceral y en inmunosuprimidos. Tiene un 96% de positividad en los tres primeros años de iniciada la enfermedad (Ampuero, 2001).

c. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y pruebas enzimáticas Elisa

Estas pruebas detectan anticuerpos antileishmania circulantes en el suero del paciente a títulos bajos. En las lesiones ulceradas por *L. (V) braziliensis* la sensibilidad a la IFI está en torno del 70% dentro del primer año de iniciada la enfermedad. Algunos pacientes son persistentemente negativos.

Las lesiones múltiples, tanto cutáneas como mucosas, están asociadas a títulos más altos. Las lesiones mucosas presentan títulos más altos que las lesiones cutáneas y muestran títulos elevados persistentemente (Cuba, 2001).

Después del tratamiento y la cura clínica en ambas formas de la enfermedad, los títulos caen o desaparecen completamente. Un tercio de los pacientes permanecen seropositivos después de los 30 años de enfermedad.

La primera muestra debe recolectarse en el primer contacto con el paciente, la segunda al mes, la tercera a los 3 meses, otra a los 6 y la última al año de la cicatrización de la lesión (Jones, Jonson y Barreto, 1987).

d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es un método que se está usando rutinariamente para confirmar el diagnóstico de leishmaniasis. La identificación puede ser hecha de una biopsia sin requerir necesariamente un cultivo. Los resultados comparativos entre la PCR y los métodos de detección parasitológicos muestran una mejor sensibilidad del primero para fines de diagnóstico (Jones, Jonson y Barreto, 1987).

Polymerase Chain Reaction (PCR) ó "Reacción en cadena de la Polimerasa". Esta técnica es muy útil para el diagnóstico de la leishmaniasis, el seguimiento de los pacientes durante y después del tratamiento y la identificación de la especie de leishmania.

La detección del ADN de la leishmania es posible en la médula ósea y los aspirados de los nódulos linfáticos al igual que en sangre (la sensibilidad podría ser menor con muestras de sangre). La sensibilidad y especificidad de este método es alta. La sensibilidad es tan alta que los parásitos pueden ser detectados en pacientes que han estado clínicamente sanos en varios años. Para la realización de estas pruebas es necesario un buen equipamiento de laboratorio como el empleo de técnicas avanzadas (López, Montoya y Arana 1988).

La detección de las diferentes especies clínicas de leishmania en el nuevo mundo, basado en PCR, han sido ampliamente estudiadas, simplificadas y modificadas a razón de los protocolos publicados. Una reacción de PCR multiplex ha sido desarrollada para la detección simultánea de los géneros de Leishmania y la identificación del complejo de *Leishmania braziliensis*. Ésta técnica de PCR, ha demostrado 100% de sensibilidad y 100% de especificidad, a comparación del examen microscópico (López y col., 01988).

El minicírculo del kinetoplasto presenta regiones conservadas de ADN para el complejo de Leishmania, que pueden ser amplificadas con los Primer 13A que tiene la siguiente secuencia (5'-ATTTTAGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3') y el Primer 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'), dando como resultado un producto de 120pb; otros cebadores como MP1L-MP3H da un producto de 70pb y el 13A-MP3H da un producto de 54pb. (INS, 2002).

2.10. TRATAMIENTO

Gaspar Vianna, en 1909, inicia el tratamiento específico de la leishmaniasis utilizando tártaro emético y obtiene la cura de pacientes con leishmaniasis cutánea y/o mucosa. Este medicamento ocasionaba severos efectos colaterales. Bramachari, en 1920, sintetiza el primer antimonial pentavalente, pero los antimoniales trivalentes fueron las drogas utilizadas, con efectos colaterales menos intensos que el tártaro emético, presentando toxicidad cardíaca, hepática y del sistema nervioso central. En la década de los 40 entra en el mercado farmacéutico los antimoniales pentavalentes, el estibogluconato de sodio (Repodral ®/Pentostan®) y N-metilglucamina (Helburn, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

Los cultivos *in vitro* de *Leishmania (V) peruviana* (LC31) y *Leishmania (V) braziliensis* (LC56) fueron realizados en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud en Lima; la obtención del ADN y la estandarización de la técnica de PCR se realizó en las condiciones del Laboratorio del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entre los meses de mayo a diciembre del 2009.

3.2. POBLACIÓN

La población para el presente estudio estuvo conformada por todas las especies del género *Leishmania* de la Región de América.

3.3. MUESTRA

La muestra estuvo constituida por los cultivo de las cepas de *Leishmania (V) peruviana* (LC31) y *Leishmania (V) braziliensis* (LC56) obtenidas en el Instituto Nacional de Salud en Lima.

3.4. DISEÑO METOLÓGICO

3.4.1. CULTIVO DE PARÁSITOS

Las cepas de *Leishmania* fueron cultivadas y mantenidas en medio bifásico el cual está constituido por una fase sólida y una líquida. La fase sólida está compuesto por 4% de w/v de agar base sangre suplementada con 15% de sangre desfibrinada de conejo obtenida por punción cardíaca, la fase líquida está compuesto por NaCl 0,85% estéril, el cual se agrega antes de cultivar a los parásitos. Para evitar el crecimiento bacteriano se agregó a la fase líquida una solución de antibióticos que constó en penicilina sódica y sulfato de estreptomicina ambos en una concentración de 750 µg/ml. Para evitar la contaminación de hongos o levaduras se utilizó 5-Fluorocitosina al 1%.

Los parásitos fueron cultivados y mantenidos a 28°C. Cada cuatro o seis días se renovaron los cultivos independientemente del crecimiento del parásito. Las cepas mantenidas en tubos de ensayo fueron crecidas en frascos de cultivo de 50mL conteniendo el medio bifásico (30 mL de agar sangre y 5 mL de sobrenadante de cultivo). Los cultivos fueron mantenidos por siete días hasta que los parásitos alcanzaron una fase estacionaria temprana de crecimiento (INS, 2002).

3.4.2. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS A PARTIR DE CULTIVO

A los parásitos crecidos en los frascos de cultivo, se les agregó 5 mL de solución salina estéril luego estos frascos se agitaron ligeramente para desprender los parásitos de la fase sólida. La fase líquida fue filtrada por una doble capa de gasa atrapar el debris del medio de cultivo, sobre tubos de centrifugación fríos. A los tubos se les agregó 5 mL de solución salina y después

se centrifugaron a 4°C a 5 000 r.p.m. por 15 min. El sobrenadante fue descartado agregándose al pellet 10 mL de solución salina fría, se volvió a suspender el pellet suavemente y se centrifugó como la vez anterior, este lavado se repitió por tres veces, luego del cual nuevamente se suspendió el pellet en 1 mL de solución salina fría, se centrifugó a 10 000 r.p.m. por 1min. Se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet a -70°C. (INS, 2002).

3.4.3. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE PARÁSITOS

El pellet del parásito fue descongelado y resuspendido en 1mL de buffer de digestión (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, pH 7,5 y 100 mM NaCl), se añadió SDS al 1% y proteinasa K a una concentración final de 1 mg/mL, la solución se incubó a 55°C por 5 horas en baño María con agitación suave ocasional.

Posteriormente se añadió ARNasa a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó a 50°C por dos horas más. A la solución anterior se añadió 100 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) mezclándose por inversión cuidadosamente. Se centrifugó a 12 000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, se repitió este paso una vez más y luego solamente con cloroformo. A la fase acuosa de la última extracción, trasvasada a otro tubo, se le agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3,0 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto helado. Se dejó precipitar el ADN a - 20°C por dos horas, luego los tubos se centrifugaron a 12 000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C. El pellet se lavó dos veces con etanol al 70% y se dejó secar a 40°C hasta que el alcohol se evapore. Finalmente, el pellet fue nuevamente suspendido en 10.mL de buffer TE (10 mM Tris-HCL, pH 8,0 y 1 mM EDTA) y almacenado a 4°C (Cáceres y Montoya, 2002).

3.4.4. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS

Se hizo un corrido de electroforesis en gel de agarosa a 1%, a 80 voltios durante 3 horas, para visualizar la presencia de bandas de ADN extraído de los cultivos de Leishmania.

3.4.5. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS CON RNAsa

Para este fin, se adicionó a cada tubo que contenía la muestra de ADN, 1 μ L de RNAsa a una concentración de 20 ng/mL, se incubó en baño María a una temperatura de 37°C durante 1 hora. Se hizo un nuevo corrido electroforético, para visualizar la desaparición de ARN y contar con la presencia de ADN.

3.4.6. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS

La concentración de ADN extraído fue cuantificado usándose un espectrofotómetro UV Nanodrop y el software ND-1000, V.3.7.1., seleccionando el analizador de ácidos nucleicos, se colocaron 2,0 μ l de agua PCR (NFW) en la platina y se esperó la lectura a cero, luego se colocaron 2,0 μ l de solución buffer TE (10mM Tris-HCL pH 8.0 y 1,0 mM EDTA) como solución blanco para llevar a 00,00 ng/ μ l. Posteriormente se colocó 2,0 μ l de la muestra de ADN, anotando el código de muestra, se seleccionó mesuare, dejando que lea la concentración de ADN, visualizando en la pantalla, se limpió la platina con papel lente. Así sucesivamente se procedió con la lectura de las siguientes muestras de ADN. Se grabaron los datos de cuantificación en el disco duro de la computadora, y se recuperaron los datos en Excel para hacer el análisis de los valores obtenidos.

3.4.7. CONTROL DE CALIDAD DE Taq polimerasa

Para verificar la actividad del Taq polimerasa, se realizó un PCR estandarizado para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, cuya fórmula del mix estuvo constituido por buffer (10X) 5,0 µL, dNTP mix (2,5 mM de cada dNTP) 4,0 µL, primer 1 INS-1 (50 ng/ µL) 5,0 µL, primer 2 INS-2 (50 ng/ µL) 5,0 µL, Taq polimerasa (5 U/µL) 0,25 µL, agua destilada 0,75 µL y 30 µL de ADN molde. El ciclaje para PCR fue: desnaturalización inicial (96°C por 3 minutos), 30 ciclos (96°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos) y una extensión final (72°C por 6 minutos). Se hizo el corrido electroforético en agarosa al 2%, a 130 voltios por 35 minutos para la detección de los productos del PCR.

3.4.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1. Pasos para la reacción en cadena de la polimerasa

En un tubo eppendorf estéril de 2,0 mL se preparó la mezcla para PCR "mix PCR", agregando los componentes de cada fórmula planteada para el presente estudio en el siguiente orden: agua PCR (NFW), Buffer, MgCl₂, dNTPs, Primer 13A (5'-ATTTTAGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3'), Primer 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'), y Taq polimerasa; se agitó el tubo del mix en un vórtex y se centrifugó ligeramente, luego se repartió el mix a cada tubo de PCR previamente rotulados. Se retiraron estos tubos de PCR fuera de la cabina de pre PCR, y en la mesa de trabajo se agregó el ADN molde respectivo a cada tubo. Se colocaron los tubos en el termociclador y programando el equipo con los datos planteados para cada caso, se puso en marcha la replicación de los fragmentos de ADN.

2. Volumen de los reactivos del "Mix PCR"

Tabla N° 01. Volumen de los componentes del "Mix PCR" para la detección de *Leishmania (V) peruviana*, a diferentes temperaturas de hibridación.

| STOCK | [C2] | 1Rx | 6Rx |
|---------------------------|---------|---------|---------|
| Buffer 10x | 1x | 2,5 µL | 15,0µL |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2,0mM | 1,0 µL | 6,0 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,2mM | 0,5 µL | 3,0 µL |
| 13A (10 µM) | 1,0 µM | 2,5 µL | 15,0 µL |
| 13B (10 µM) | 1,0 µM | 2,5 µL | 15,0 µL |
| Taq Pol (5U/ µL) | 1 U/ µL | 0,2 µL | 1,2 µL |
| NFW | | 13,8 µL | 82,8 µL |
| DNA (200 ng/µL) | 2,0 µL | | |

Volumen final de la reacción= 25 µL

Las temperaturas de hibridación fueron: 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 60°C y 62°C.

Tabla N° 02. Volumen de los componentes del "Mix PCR" para la detección de *Leishmania (V) braziliensis*, a diferentes temperaturas de hibridación.

| STOCK | [C2] | 1Rx | 6Rx |
|---------------------------|---------|----------|----------|
| Buffer 10x | 1x | 2,5 µL | 15,0 µL |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2,0mM | 1,0 µL | 6,0 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,13 mM | 0,32 µL | 1,92 µL |
| 13A (10 µM) | 0,5 µM | 1,25 µL | 7,5 µL |
| 13B (10 µM) | 0,5 µM | 1,25 µL | 7,5 µL |
| Taq Pol (5U/ µL) | 1 U/ µL | 0,2 µL | 1,2 µL |
| NFW | | 16,48 µL | 98,88 µL |
| DNA (200 ng/µL) | 2,0 µL | | |

Volumen final de la reacción = 25 µL

Las temperaturas de hibridación fueron: 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 60°C y 62°C.

Tabla N° 03. Volumen de los componentes del "Mix PCR" para la detección de *Leishmania (V) peruviana*, a diferentes temperaturas de hibridación y ADN sin diluir.

| STOCK | [C2] | 1Rx | 6Rx |
|---------------------------|---------|----------|----------|
| Buffer 10x | 1x | 2,5 µL | 15,0 µL |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2,0mM | 1,0 µL | 6,0 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,13 mM | 0,32 µL | 1,92 µL |
| 13A (10 µM) | 0,5 µM | 1,25 µL | 7,5 µL |
| 13B (10 µM) | 0,5 µM | 1,25 µL | 7,5 µL |
| Taq Pol (5U/ µL) | 1 U/ µL | 0,2 µL | 1,2 µL |
| NFW | | 16,48 µL | 98,88 µL |
| DNA sin diluir | 2,0 µL | | |

Volumen final de la reacción = 25 µL

Las temperaturas de hibridación fueron: 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 60°C y 62°C.

Tabla N° 04. Volumen de los componentes del "Mix PCR" para la detección de *Leishmania (V) peruviana*, a diferentes concentraciones de MgCl₂.

| STOCK | [C2] | 1Rx | 6Rx |
|---------------------------|---------|---------|---------|
| Buffer10x | 1x | 2,5 µL | 15,0µL |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2,0 mM | 1,0 µL | 6,0 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,2mM | 0,5 µL | 3,0 µL |
| 13A (10 µM) | 1,0 µM | 2,5 µL | 15,0 µL |
| 13B(10µM) | 1,0 µM | 2,5 µL | 15,0 µL |
| Taq Pol (5U/ µL) | 1 U/ µL | 0,2 µL | 1,2 µL |
| NFW | | 13,8 µL | 82,8 µL |
| DNA (200 ng/µL) | 2,0 µL | | |

Volumen final de la reacción = 25 µL

La temperatura de hibridación fue: 52°C.

3.4.9. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN EN LA CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1. Preparación de la cámara de electroforesis

Se instalaron todos los accesorios de la cámara electroforética sobre la mesa de trabajo, colocando la burbuja de nivel, que indicó la posición horizontal de la cámara de electroforesis, luego se colocó el peine con el número de pocillos requerido para el trabajo.

2. Preparación del gel de agarosa al 2%

Se pesó 2 g. de agarosa y se vertió en 100 ml de buffer TAE 1X agitándose ligeramente, luego se colocó en horno microondas por un minuto para su disolución, observando constantemente e impedir que ésta se derrame, se verificó que esté completamente disuelto, de no ser así se devolvió al horno microondas hasta una total disolución. Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta 50°C a 60° C aproximadamente y se vertió a la cámara electroforética previamente preparada.

3. Polimerización del gel

Una vez vertida el gel en la cámara se dejó a temperatura de ambiente hasta su total consistencia.

4. Instalación de la cámara de electroforesis

Cuando la agarosa estuvo totalmente polimerizada, se retiró cuidadosamente el peine y los accesorios laterales. Se llevó este dispositivo que contenía el gel a la cámara electroforética que contenía buffer TAE 1X en cantidad requerida.

5. Preparación de los productos de PCR amplificado

Sobre una lámina de parafilm se colocaron, por separado, 1 μL de buffer de corrido *loading* 6X por cada muestra de amplificado, luego sobre cada gota de *loading* se dejó caer 5 μL del respectivo producto de PCR, se mezcló individualmente con la ayuda de una micropipeta y se cargó 6 μL de ésta, a partir del pocillo nº 02, correlativamente para cada producto de PCR

6. Preparación de *ladder* 1kb

El marcador de tamaño molecular conocido como *ladder* nos indicó la distancia de migración de las bandas o fragmentos de ADN por cada 100 pb. Sobre una lámina de parafilm se colocó 3 μL de agua PCR, se agregó 1 μL de *loading* 6X y finalmente se agregó 2 μL de *ladder* 1Kb. Se mezcló bien usando la micropipeta y se cargó 6 μL en el pocillo nº 01 y en el pocillo que se designó según el caso.

7. Conexión de la cámara de electroforesis y fuente de poder

Se tapó adecuadamente la cámara de electroforesis, verificando la posición correcta del polo positivo y negativo, luego se conectaron ambos cables a la fuente de poder. Se encendió el equipo programando los voltajes, miliamperios y tiempos requeridos para poner en marcha el corrido electroforético del ADN, transcurrido el tiempo se apagó el equipo y se procedió a retirar el gel de agarosa.

8. Coloración del gel de agarosa

Se retiró con mucho cuidado, el gel de agarosa de la cámara de electroforesis, utilizando una espátula plana y ancha, luego se colocó en un

recipiente destinado exclusivamente para este fin, se vertió cuidadosamente el bromuro de etidio (conservado en solución en un frasco de boca ancha y con tapa rosca) y se dejó en reposo por un periodo de 10 a 15 minutos. Se retiró el gel a otro envase que contenía agua corriente y se dejó en reposo durante 5 minutos (se repitió esta operación cambiando de agua una vez más). Este gel lavado con agua se colocó sobre el transiluminador ultravioleta utilizando una espátula ancha (espumadera de teflón).

9. Observación del gel en el transiluminador

Una vez colocado el gel sobre el transiluminador, se cubrió con la lámina filtro de ultravioleta y luego se encendió el equipo y reguló la intensidad de la luz ultravioleta en un ambiente oscuro.

Se visualizaron las bandas de los ácidos nucleicos (productos del PCR) en cada uno de los carriles, como manchas resplandecientes de color grosella. Se procedió a la interpretación de los resultados, comparando con el tamaño molecular del ladder. Se tomaron los registros fotográficos de los geles.

3.4.10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Se procedió a interpretar los registros fotográficos, producto del presente estudio, a razón de la presencia, ausencia e intensidad de las bandas de ácidos nucleicos.

IV. RESULTADOS



Registro fotográfico N° 03. Electroforesis de ácidos nucleicos obtenido de cultivos de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, coloreado con bromuro de etidio. Ayacucho 2009.

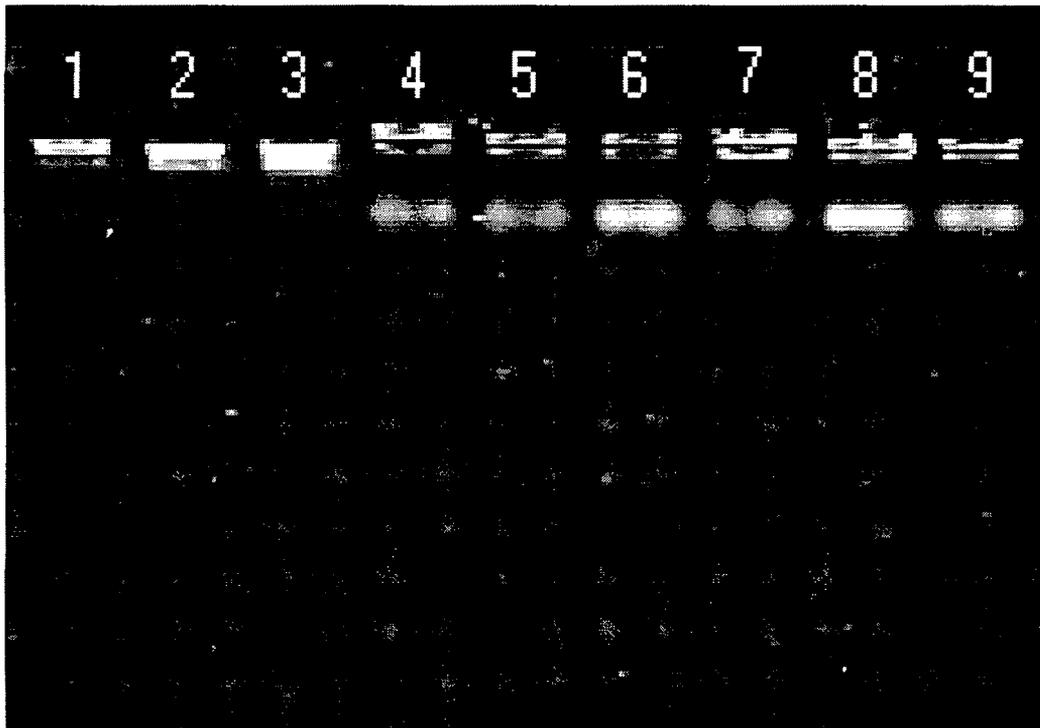
Leyenda:

1, 2 y 3: Marcadores de tamaño molecular *ladder* con 20,40 y 60 ng/ μ L, respectivamente.

4, 5, 6, 7 y 8: Ác. nucleicos extraído de cultivo de *Leishmaniasis (V) peruviana*.

9, 10,11 y 12: Ác. nucleicos extraído de cultivo de *Leishmania (V) braziliensis*

13, 14 y 15: Marcadores de tamaño molecular *ladder* con 20, 40 y 60 ng/ μ L, respectivamente.



Registro fotográfico N° 04. Electroforesis de ácidos nucleicos obtenido de cultivos de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, tratados con RNasa. Ayacucho, 2009.

Leyenda:

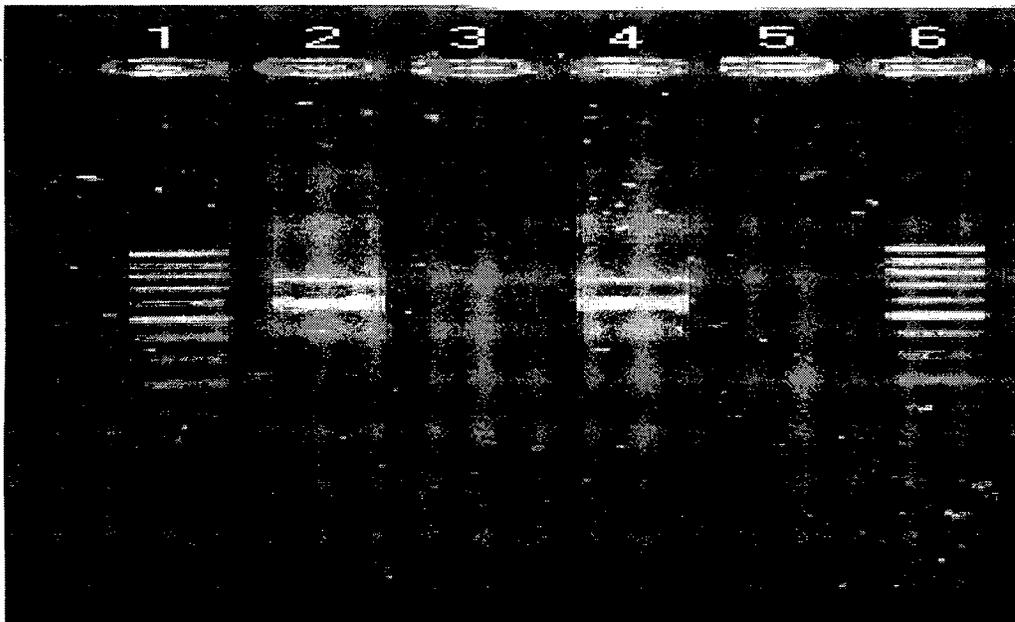
1, 2 y 3: Marcadores de tamaño molecular *ladder* con 20, 40 y 60 ng/μL, respectivamente.

4, 5 y 6: Ácidos nucleicos extraído de cultivo de *Leishmania (V) peruviana*.

7, 8 y 9: Ácidos nucleicos extraído de cultivo de *Leishmania (V) braziliensis*.

Tabla N° 05 cantidad de ADN obtenido de cultivos de *Leishmania peruviana* (V) y *Leishmania (V) braziliensis*, mediante espectrofotometría UV. Ayacucho, 2009.

| MUESTRA | LECTURA EN ESPECTROFOTÓMETRO UV | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | Concent. de ADN diluc. 1/10. ng/μL | Absorb. de ADN 260 nm | Absorb. de proteínas. 280 nm | Pureza de ADN 260/280 | Concent. final de ADN ng/μL |
| <i>Leishmania (V) peruviana</i> | 99,50 | 1,990 | 1,046 | 1,90 | 995,0 |
| <i>Leishmania (V) peruviana</i> | 146,27 | 2,925 | 1,393 | 2,10 | 1462,7 |
| <i>Leishmania (V) peruviana</i> | 313,07 | 6,261 | 2,971 | 2,11 | 3130,7 |
| <i>Leishmania (V) braziliensis</i> | 138,00 | 2,760 | 1,418 | 1,95 | 1380,0 |
| <i>Leishmania (V) braziliensis</i> | 331,82 | 6,636 | 3,293 | 2,02 | 3318,2 |
| <i>Leishmania (V) braziliensis</i> | 272,55 | 5,451 | 2,679 | 2,03 | 2725,5 |



Registro fotográfico N° 05. Electroforesis del control de calidad de Taq polimerasa con protocolo de PCR estandarizado para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*. Ayacucho, 2009.

Leyenda:

- 1: Marcador de tamaño molecular *ladder* de 1 Kb.
- 2: Taq polimerasa 1 U/ μ L
- 3: Taq polimerasa 2 U/ μ L
- 4: Taq polimerasa 1 U/ μ L
- 5: Control con H₂O_(d)
- 6: Marcador de tamaño molecular *ladder* de 1 Kb.



Registro fotográfico N° 06. Electroforesis de productos de PCR obtenidos de *Leishmania (V) peruviana* a diferentes temperaturas de hibridación. Ayacucho, 2009.

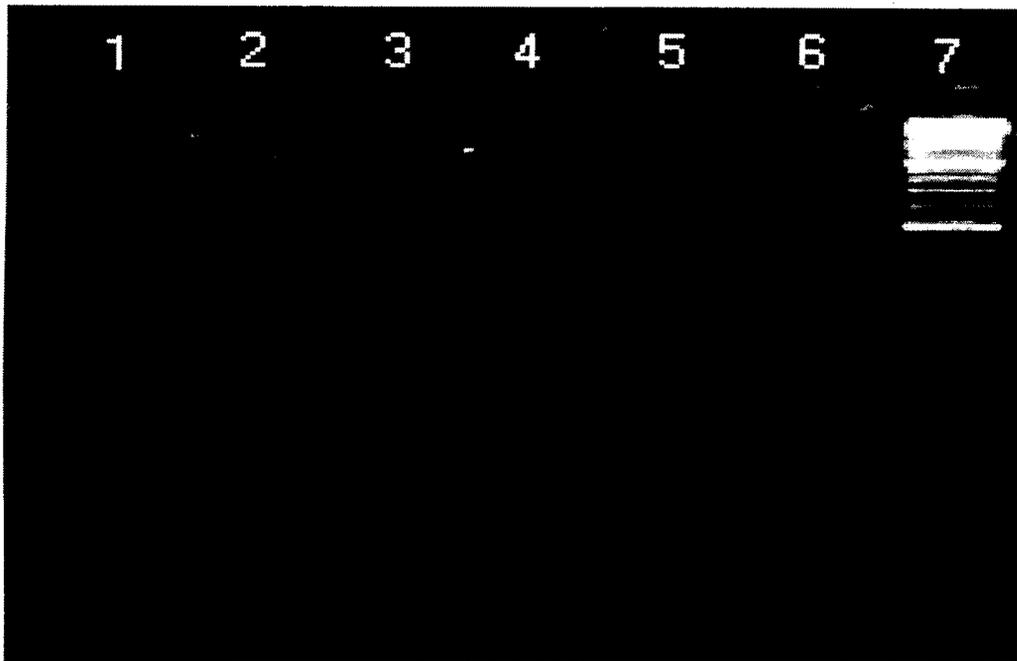
Leyenda:

1: Marcador de tamaño molecular *ladder* de 1 Kb.

2, 3, 4, 5, 6 y 7: Producto de PCR de 120 pb a diferentes temperaturas de hibridación.

Tabla. N° 06. Condiciones de temperatura y volúmenes del "Mix PCR"

| Carril | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------------|-----------|----|----|----|----|----|
| T hibridación °C | 50 | 52 | 54 | 56 | 60 | 62 |
| 13A (10 µM) | 1,0 µM | | | | | |
| 13B (10 µM) | 1,0 µM | | | | | |
| dNTPs (10 µM) | 0,2m M | | | | | |
| Taq Pol (5U/ µL) | 1U/ µL | | | | | |
| ADN | 200 ng/µL | | | | | |



Registro fotográfico Nº 07. Electroforesis de productos de PCR obtenidos de *Leishmania (V) braziliensis* a diferentes temperaturas de hibridación. Ayacucho, 2009.

Leyenda:

1,2,3,4,5, y 6: Producto de PCR de 120 pb a diferentes temperaturas de hibridación.

7: Marcadores de tamaño molecular *ladder* de 1 Kb.

Tabla. Nº 07. Condiciones de temperatura y volúmenes del "Mix PCR"

| Carril | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------|-----------|----|----|----|----|----|
| T hibridación °C | 50 | 52 | 54 | 56 | 60 | 62 |
| 13A (10 µM) | 0,5 µM | | | | | |
| 13B (10 µM) | 0,5 µM | | | | | |
| dNTPs (10 µM) | 0,13 mM | | | | | |
| Tag Poi (5U/ µL) | 1U/ µL | | | | | |
| ADN | 200 ng/µL | | | | | |



Registro fotográfico N° 08. Electroforesis de productos de PCR para la detección de *Leishmania (V) peruviana* a diferentes temperaturas de hibridación y ADN sin diluir. Ayacucho, 2009.

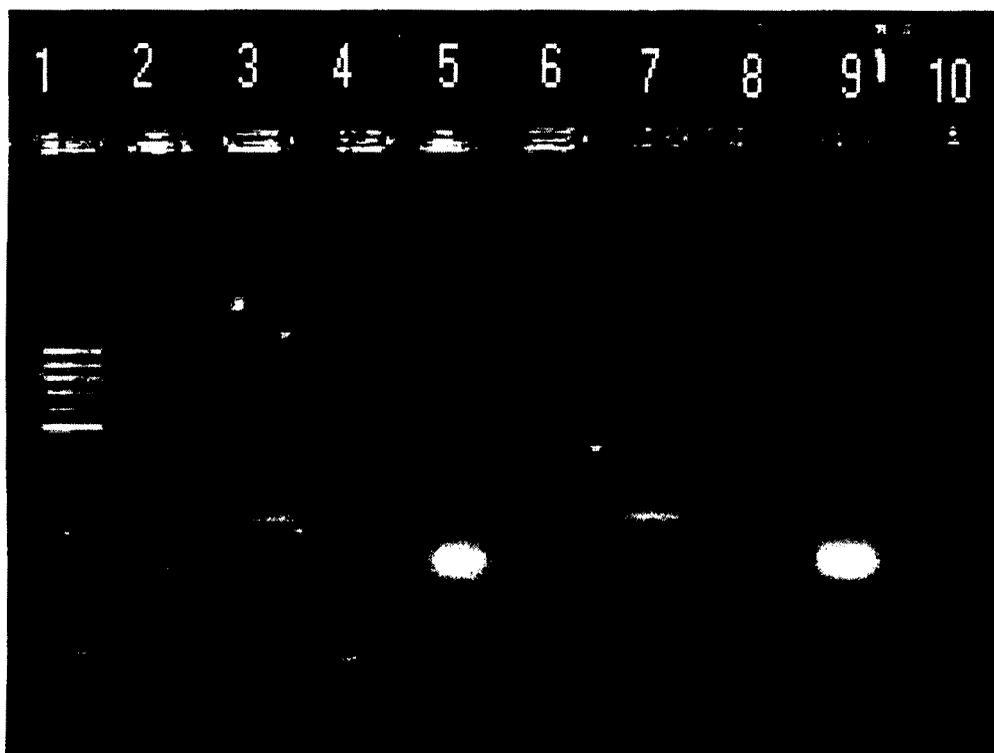
Leyenda:

1: Marcador de tamaño molecular *ladder* de 1 Kb.

2, 3, 4, 5, 6 y 7: Producto de PCR de 120 pb a diferentes temperaturas de hibridación.

Tabla. N° 08. Condiciones de temperatura y volúmenes del "Mix PCR"

| Carril | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------------------------|--------|----|----|----|----|----|
| T hibridación °C | 50 | 52 | 54 | 56 | 60 | 62 |
| 13A (10 µM) | 0,5 µM | | | | | |
| 13B (10 µM) | 0,5 µM | | | | | |
| dNTPs (10 µM) | 0,13mM | | | | | |
| Taq Pol (5U/ µL) | 1U/ µL | | | | | |
| ADN sin diluir (3130,7 ng/µL) | 2,0 µL | | | | | |



Registro fotográfico N° 09. Electroforesis de productos de PCR obtenidos del ADN de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis* a diferentes concentraciones de $MgCl_2$, a $52^\circ C$ de temperatura de hibridación. Ayacucho, 2009.

Leyenda:

- 1: Marcador de tamaño molecular *lambda* 10^4 bp.
- 2: Concentración de $MgCl_2$ a 1,5 mM. Para *Leishmania (V) peruviana*.
- 3: Concentración de $MgCl_2$ a 2,0 mM. Para *Leishmania (V) peruviana*.
- 4: Control sin $MgCl_2$ y sin dNTP. Para *Leishmania (V) peruviana*.
- 5: Control sin $MgCl_2$, pero con dNTP. Para *Leishmania (V) peruviana*.
- 6: Concentración de $MgCl_2$ a 1,5 mM. Para *Leishmania (V) braziliensis*.
- 7: Concentración de $MgCl_2$ a 2,0 mM. Para *Leishmania (V) braziliensis*.
- 8: Control sin $MgCl_2$ y sin dNTP. Para *Leishmania (V) braziliensis*.
- 9: Control sin $MgCl_2$, pero con dNTP. Para *Leishmania (V) braziliensis*.
- 10: Control de contaminante con $H_2O_{(d)}$.

V. DISCUSIÓN

En el año 2003 fueron reportados 6 318 casos de leishmaniasis cutánea en el Perú, la mayoría procedía de Ancash, seguida por Cusco y Madre de Dios, y 327 casos de leishmaniasis mucocutánea, en su mayoría del Cusco, seguida de Huánuco y Loreto. La tasa de incidencia acumulada nacional es de 23,62 por 100 000 habitantes, para la leishmaniasis cutánea, y de 1,22 por 100 000 habitantes, para la mucocutánea (MINSA, 2003).

El registro fotográfico N° 03, nos revela la presencia abundante de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de los paquetes celulares, corridos en un gel de agarosa, pudiéndose evaluar cualitativamente las intensidades de las bandas, comparándose con los estándares de marcadores de tamaño molecular *ladder* a concentraciones de 20, 40 y 60 ng/μL, mostrados en los carriles (1 y 13), (2 y 14) y (3 y 15), respectivamente; las bandas de los carriles 4, 5, 6, 7 y 8 pertenecen a *Leishmania (V) peruviana*, observándose que los carriles 4, 6 y 8 tienen mayor concentración, mientras que los carriles 9, 10, 11 y 12 pertenecen a *Leishmania (V) braziliensis*, de estos los carriles 9, 10 y 12 muestran mayor concentración de ácidos nucleicos, por lo que estas 6 muestras fueron seleccionadas para continuar con el desarrollo de la investigación.

El registro fotográfico N° 04, corresponde a las 6 muestras seleccionadas en el paso anterior, y que fueron sometidas a un tratamiento enzimático con RNasa para eliminar el ARN acompañante resultado del proceso anterior, con la finalidad de obtener ADN puro, siempre comparándose con los marcadores de tamaño molecular *ladder* de 20, 40 y 60 ng/ μ L, se observa que la muestra del carril 6 correspondiente a *Leishmania (V) peruviana* y el carril 8 correspondiente a *Leishmania (V) braziliensis*, son los que mostraron mejor calidad del producto de ADN.

Estas 6 muestras, fueron cuantificadas usándose un espectrofotómetro UV Nanodrop y el software ND-1000, V.3.7.1, en ella se determinó la concentración de ADN, así mismo las absorbancias a 260 nm para ADN y 280 para proteínas, y de la relación de estas dos últimas se determina la pureza del ADN, es así que todas las muestras se encuentran dentro del rango permisible para ser considerada buena calidad, que está entre 1,7 a 2,1 estos resultados se muestran en el Tabla N° 05, así mismo podemos apreciar que existe una relación coherente con las bandas de ADN mostrados en el registro fotográfico N° 04.

La enzima Taq polimerasa es la encargada de sintetizar la cadena complementaria del ADN molde denaturado, en la reacción en cadena de la polimerasa, razón por la que está debe encontrarse en buenas condiciones para cumplir con su función enzimática; es motivo por el que realizamos un control de calidad de esta enzima con un protocolo de PCR ya estandarizado para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, con los primers INS1 e INS2 que amplifican una secuencia de inserción IS6 110 del ADN genómico de esta bacteria, probada a concentración de 1 U/ μ L y 2 U/ μ L, y como control agua destilada, resultando mejor actividad a la concentración de 2 U/ μ L, tal como se muestra en el registro fotográfico N° 05. Este protocolo fue estandarizado por

VALER, 2008. En el laboratorio del Centro de Investigación en Biología molecular y Bioinformática de la UNSCH, motivo por el que nos resultaron bien los productos del PCR.

En el registro fotográfico N° 06 es el corrido electroforético de los productos de PCR para *Leishmania (V) peruviana* con diferentes temperaturas de hibridación, una concentración final de los primers 13A y 13B de 1,0 μM y la concentración final de los dNTPs fue 0,2 mM. y del ADN diluido a 200 ng/ μL , se determinó de manera cualitativa que los carriles 2, 3, 4 y 5 desarrollados con temperaturas de hibridación de 50, 52, 54 y 56 respectivamente, mostró las bandas más consistentes que los carriles 6 y 7 que fueron trabajados con temperaturas de hibridación de 60 y 62 °C respectivamente (Belli y col., 1998). Trabajando con estos mismos primers, tomo como temperatura de hibridación 52°C igual que el nuestro, pero la temperatura de desnaturalización inicial lo trabajó con 94°C y el nuestro a 96°C, para asegurar la desnaturalización total de nuestros ADN molde, ambos por 3 minutos. Cáceres y Montoya en el 2002, amplificando los segmentos del gen de la Histona H2B de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, con dos juegos de primers tomó a 61°C como temperatura de hibridación y de 95°C para la desnaturalización inicial por 10 minutos.

En el registro fotográfico N° 07, es el corrido electroforético de los productos de PCR para *Leishmania (V) braziliensis* con diferentes temperaturas de hibridación, una concentración final de los primers 13A y 13B de 0,5 μM y la concentración final de los dNTPs fue 0,13 mM, con ADN diluido a 200 ng/ μL , se determinó de manera cualitativa que los carriles 1, 2, 3 y 4 trabajados con temperaturas de hibridación de 50, 52, 54 y 56 respectivamente, las tonalidades son más fuertes que los carriles 5 y 6 que fueron trabajados con temperaturas

de hibridación de 60 y 62 °C respectivamente. Estos productos del PCR son todas en menor cantidad que las obtenidas para *Leishmania (V) peruviana*, bajo las mismas temperaturas y contrastadas de igual forma que en la anterior con Belli y col., 1998; Cáceres y Montoya 2002.

En el registro fotográfico Nº 08, es el corrido electroforético de los productos de PCR para *Leishmania (V) peruviana* con diferentes temperaturas de hibridación, una concentración final de los primers 13A y 13B de 0,5 µM y la concentración final de los dNTPs fue 0,13 mM., con ADN molde sin diluir, se determinó de manera cualitativa que la intensidad de la banda del carril 2 es menor que la del carril 3, y los carriles 4, 5, 6 y 7 no aparecen productos de PCR esto se debe a la concentración del ADN, ya éstas se encuentran con impurezas y su alta concentración permite la saturación en el proceso de replicación del ADN mediante el PCR. Belli y col. en 1998 no menciona la concentración que utilizó para el ADN molde; mientras que Cáceres y Montoya en 2002 evaluó la sensibilidad del sistema haciendo diluciones seriadas de ADN genómico purificado de *Leishmania (V) peruviana* desde 10 ng a 1fg y para evaluar la especificidad del PCR utilizó 1 ng de ADN purificado de *T. cruzi* y de humano.

En el registro fotográfico Nº 09, se trabajo con dos concentraciones de MgCl₂: una a concentración de 1,5 mM y otra de 2,0 mM donde se observó que en el carril 2 los productos de PCR se observa una banda tenue, mientras que en el carril 3 la intensidad de la banda de los productos de PCR es bastante claro y compacto la misma que se trabajo con una concentración de MgCl₂ de 2,0 mM; el carril 4 sirvió de control, sin MgCl₂ y sin dNTP, por lo cual no presenta banda alguna, mientras u en el carril 5 se hizo el control sin MgCl₂ y con dNTP, motivo por el que aparece una banda grande en el extremo terminal que corresponde a

los nucleótidos sueltos, todas estas fueron para el PCR con *Leishmania (V) peruviana*, se repite estos ensayos, respectivamente, en los carriles 6, 7, 8, y 9, pero con ADN molde de *Leishmania (V) braziliensis* y en el carril 10 se colocó agua destilada del uso en laboratorio como control de contaminación, el cual salió limpio. Todo fue procesado a la temperatura de hibridación de 52°C. La concentración de MgCl₂ de 2,0 mM, fue la más óptima para nuestro trabajo, coincidiendo con lo determinado por Belli y col. en 1998, mientras que para Cáceres y Montoya en 2002 fue mejor con 5,0 mM de MgCl₂.

Tomando en cuenta todos estos resultados, llegamos a determinar que las condiciones físicas y químicas que nos permitieron obtener productos de PCR que se evidenciaron por la presencia de una banda bastante nítida, compacta y muy resplandeciente luego de la tinción con bromuro de etidio expuesto en el transiluminador con UV fueron lo que detallamos a continuación. La preparación del mix para una reacción, Buffer (10X) a 1X, MgCl₂ (50 mM) a 2 mM, dNTP (10 mM) a 0,2 mM, primer 13A (10 μM) a 1,0 μM, primer 13B (10 μM) a 1,0 μM, Taq polimerasa (5U/μL) a 1 U/μL, completando con agua (NFW) 13,8 μL y el ADN a (200 ng/ μL) 2,0 μL, con un volumen final de reacción de 25 μL. Respecto a la temperatura de hibridación, la más óptima fue de 52°C. El ciclaje para el PCR fue: desnaturalización inicial (96°C por 3 minutos), 30 ciclos (96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos) y una extensión final (72°C por 6 minutos).

VI. CONCLUSIONES

1. Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permita la detección de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, en las condiciones del laboratorio del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la UNSCH, los componentes químicos del mix para una reacción debe contener: Buffer 1X, MgCl₂ 2,0 mM, dNTP 0,2 mM, primer 13A 1,0 μM, primer 13B 1,0 μM, Taq polimerasa 1 U/μL, agua (NFW), 2,0 μL del ADN molde a una concentración de 200 ng/ μL y un volumen final de la reacción de 25 μL.
2. Las condiciones físicas para la obtención de un producto de PCR de buena calidad, que permita la detección de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, con el mix anteriormente citado debe ser: desnaturalización inicial (96°C por 3 minutos), 30 ciclos (96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos) y una extensión final (72°C por 6 minutos).
3. La extracción orgánica con cloroformo/alcohol isoamílico, precipitado con acetato de sodio 3 M y etanol absoluto, permitieron la obtención de ADN de *Leishmania* de buena calidad de pureza (260/280) que va de 1,90 a 2,11.

4. Los cultivos *in vitro* de *Leishmania (V) peruviana* y *Leishmania (V) braziliensis*, nos permitieron obtener un buen paquete celular de estos hemoparásitos.

VII. RECOMENDACIONES

Al finalizar el presente estudio, podemos manifestar las siguientes recomendaciones:

1. Debe desarrollarse nuevas estandarizaciones de protocolos de PCR para la detección de género *Leishmania* con otro segmento del ADN.
2. Estandarizar las técnicas de PCR, para la identificar especies, que permita realizar proyectos de investigación de prevalencia por especies.

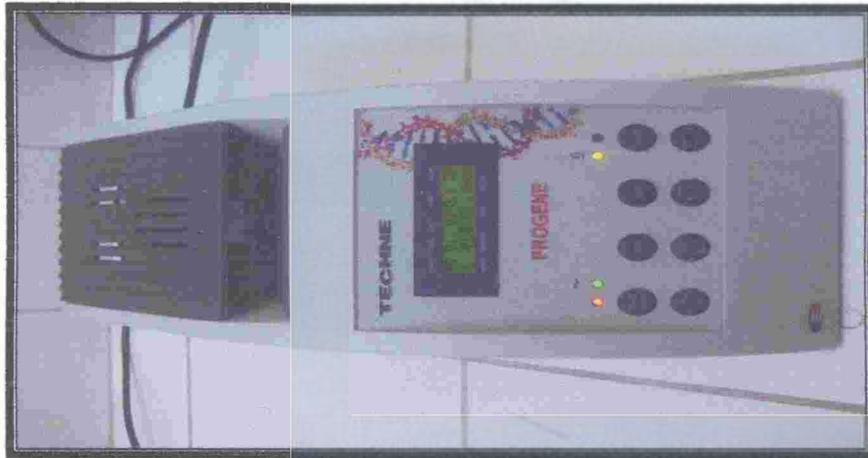
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ampuero, J.** Leishmaniasis. Ministerio de Salud Perú, INS, 2000; Temas Dermatológicos. Pautas diagnósticas y terapéuticas. Caracas: Tipografía Olímpica CA. 2001.
2. **Andersen, E. y Burans, J.** Leishmaniasis research in Lima, Peru. Navy Med 2001.
3. **Belli, A., Rodriguez, B., Avilés, H. y Harris, E.** Simplified Polymerase Chain Reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop Med Hyg.* 58(1), 1998.
4. **Bobbio, M.** Leishmaniasis cutáneo-andina en el distrito de Quinocay, provincia de Yauyos, Lima. *An Fac Med* 2000.
5. **Bonfante, R. y Barruela, S.** Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002
6. **Botero, R.** Parasitosis humana. 3ª ed. Medellín – Colombia. 1998.
7. **Cáceres, O. y Montoya, Y.** Diseño y evaluación de tres nucleótidos para la detección de *Leishmania* por PCR. *Revista Peruana de medicina Experimental-Salud Pública* 2002; 19(3).
8. **Cuba, C.** Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Rev Med Exp* 2000.
9. **De Gopugui, M. y Ruiz, R.** Leishmaniasis: a reemerging zoonosis. *Int Dermatol* 2003.
10. **Díaz, N., Zerpa, O. y Ponce, L.** Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp Dermatol* 2002.
11. **Evans, D.** *Leishmania. In vitro methods for parasite cultivation.* New York: Taylor AER& Baker Jr Eds. Academic Press, 1987.
12. **Grevelink, S. y Lerner, E.** Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 1996.
13. **Hall, L.** Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 1995.
14. **Helburn, N.** Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000.
15. **Herrer, A.** Simposium sobre leishmaniasis tegumentaria americana en el Perú. Consideraciones sobre el reservorio. *Rev Vier Med* 1955.

16. **Hendricks, L. y Wright, N.** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila medium. *Am J Trop Mod Hyg* 1979.
17. **Instituto Nacional de Salud**, *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud pública*. Lima, Perú. 2002.
18. **Jones, T., Jonson, D. y Barreto, A.** Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. *J Infect Dis* 1987.
19. **León, L.** Las Rinopatías en la leishmaniasis tegumentaria americana. Quito: Ed. Universitaria, 1979.
20. **López, M., Montoya, I. y Arana M.** The use of nonradioactive DNA probes for the characterization of leishmania isolates from Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1988.
21. **Lucas, C., Franke, A. y Cachay, M.** Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1998.
22. **Maltezou, H. Sifas, C., Mavrikou, M.** Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis* 2000
23. **Ministerio de Salud.** Oficina General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico Semanal 2003.
24. **Ministerio de Salud.** Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Perú. 2000.
25. **Moll, H. y Berberich, C.** Dendritic cell-based vaccination strategies: Induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunol* 2001.
26. **Neyra, D.** Las leishmaniasis en el Perú. *Folia Dermatol Peru* 1997.
27. **Pearson, R. y Queiroz, A.** Especies de *Leishmania*: Leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa. En: Mandell, Douglas, Bennett. *Enfermedades infecciosas, principios y práctica*. 4ta ed. Buenos Aires: Panamericana Ed, 1997.
28. **Pearson, R. y Quiroz, A.** Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996.
29. **Pesce, H.** Tropicales: Leishmaniasis tegumentaria. Separatas.1995.
30. **Rondón, A.** Leishmaniasis tegumentaria americana. Pautas diagnósticas y terapéuticas. Caracas: Tipografía Olímpica CA. 2001.

31. **Salazar, M. y Castro, E.** Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997-1999. *Dermatol Per* 2001.
32. **Sánchez, L., Sáenz, E. y Chávez, M.** Leishmaniasis en el Perú. En: Sociedad Peruana de Dermatología: Infectología y Piel. Lima: Mad Corp Editores e Impresores, 2000.
33. **Sanguenza, O. y Sanguenza, M.** et al. Mucocutaneous leishmaniasis. A clinicopathology classification. *J Am Acad Dermatol* 1993.
34. **Stark, C. y Wortmann, G.** Leishmaniasis. *eMed J* 2002.
35. **Tejada, A.** Leishmaniasis tegumentaria en el Perú. Investigación epidemiológica-clínica de la leishmaniasis tegumentaria en Cusco y Madre de Dios. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1973.
36. **Tremblay, M., Oliver, M. y Bernier, R.** Leishmania and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today* 1996.
37. **Valer, G.** Multidrogoresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* y detección de cadenas de transmisión mediante RFLP- IS6110 en el Valle del Río Apurímac y Ene. Tesis para optar el grado académico de Maestría en salud pública. Escuela de Postgrado UNSCH. 2008.
38. **Vidyashankar, C. y Noel, G.** Leishmaniasis. *eMedicine Journal* 2002.
39. www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm
40. <http://www.daneprairie.com>

ANEXOS



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 10. PROGRAMACION DE TIEMPOS DE CICLAJE DEL TERMOCICLADOR



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 11. PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA AL 2%



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 12. PREPARACION DE LA CAMARA ELECTROFORETICA



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 13. OBTENCION DE LOS POSILLO EN EL GEL DE AGAROSA



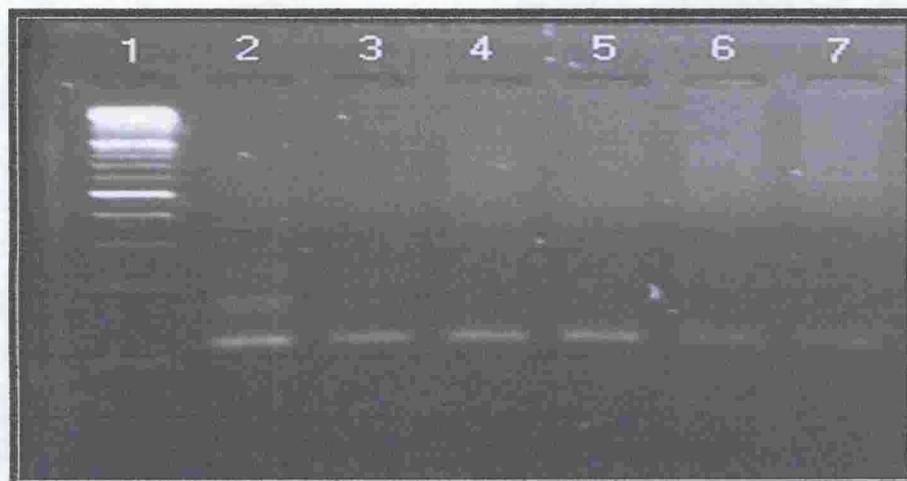
REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 14. COLORACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR CON LODING 6X



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 15. RECORRIDO DE LOS PRODUCTOS DE PCR EL GEL DE AGAROSA



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 16. COLORACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR CON BROMURO DE ETIDIO



REGISTRO FOTOGRÁFICO N° 17. PRODUCTOS DE PCR EL COLOREADOS CON BROMURO DE ETIDIO